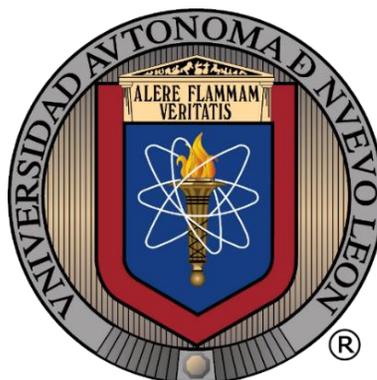


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMATERIALES
MESOESTRUCTURADOS POR LA TÉCNICA SOL-GEL Y
EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GENTAMICINA

Por

RODOLFO GONZÁLEZ GUERRERO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación
en Farmacia

Diciembre 2017

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
BIOMATERIALES MESOESTRUCTURADOS
POR LA TÉCNICA SOL-GEL Y EVALUACIÓN
DE LA LIBERACIÓN DE GENTAMICINA

Revisión de tesis:

Dra. Patricia Esquivel Ferriño

Director de tesis

Dra. Lucia Guadalupe Cantú Cárdenas

Codirector de tesis

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Comité tutorial

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo

Comité tutorial

Dra. Omar González Santiago

Comité tutorial

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
BIOMATERIALES MESOESTRUCTURADOS POR
LA TÉCNICA SOL-GEL Y EVALUACIÓN DE LA
LIBERACIÓN DE GENTAMICINA

Aprobación de tesis:

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

PRESIDENTE

SECRETARIA

VOCAL

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Rodolfo González Guerrero

Fecha de Graduación: Diciembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMATERIALES MESOESTRUCTURADOS POR LA TÉCNICA SOL-GEL Y EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GENTAMICINA

Número de páginas: 88

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: Los sistemas de liberación modificada representan una alternativa para tratar enfermedades que requieren mantener una concentración terapéutica en el sitio de interés, reduciendo la absorción sistémica y los efectos adversos asociados, esto resulta especialmente importante en el caso del tratamiento de enfermedades óseas, como la osteomielitis, que es una enfermedad ósea causada por la infección bacteriana de la cavidad medular, la cual puede ocurrir como una complicación de la cirugía ortopédica. El tratamiento de esta infección ósea representa un reto, debido a la poca penetración local del antibiótico. Considerando la problemática asociada al tratamiento de la osteomielitis, el desarrollo de un sistema de liberación modificada conteniendo gentamicina, representa una opción para mejorar el cumplimiento del régimen terapéutico, además de mantener las concentraciones plasmáticas del fármaco en el sitio de acción y reducir así sus efectos adversos sistémicos y el riesgo de desarrollo de bacterias resistentes.

Contribuciones y Conclusiones: En el presente trabajo de investigación se evaluaron las características de liberación del Sulfato de gentamicina incorporada en una matriz cerámica a base de SiO_2 a condiciones fisiológicas *in vitro*. La síntesis del biomaterial se realizó vía sol-gel a diferentes condiciones de pH y relación precursor/agua (Tetraetil ortosilicato (TEOS)). El material cerámico conteniendo la gentamicina fue caracterizado mediante técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas. Los resultados del análisis textural de los biomateriales sintetizados con el tensioactivo no iónico (Pluronic P-123) presentaron una mayor área superficial entre 478.03 y 631.02 m^2/g , el diámetro

de poro entre 4.97 y 7.62 nm y volumen del poro entre los 0.78 y 0.91 cc/g logrando obtener un material mesoporoso. En relación con el perfil de liberación, el biomaterial sintetizado con CTAB a la relación de precursor/agua 1:8, fue el que tuvo un mayor porcentaje de incorporación en comparación con los demás, así mismo, logró liberar un 71.7% del Sulfato de gentamicina incorporado. Este resultado concuerda con las características de volumen y diámetro de poros obtenidos para este biomaterial. De esta manera, el método de sol-gel permitió desarrollar materiales utilizando como precursor SiO_2 en forma de polvos capaz de incorporar por impregnación al Sulfato de gentamicina, con posibilidad de ser empleado como soporte de fármacos.

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño (Asesora)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo el apoyo y amor brindado durante toda mi vida

A la Dra. Paty y la Dra. Lucy por ser mis guías durante toda mi estancia en la UANL.

A cada uno de los maestros que de una alguna manera u otra influyeron en mi visión y permitieron enriquecer mi conocimiento. En especial a la Dra. Araceli, Dra. Elida, Dr. Omar.

Al Departamento de Ecomateriales y Energía, Facultad de Ingeniería Civil de la UANL, específicamente al Dr. Leonardo Ferriño y a la Dra. Leticia Torres por las facilidades brindadas para los estudios de caracterización.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, específicamente al Dr. Javier Morales por el apoyo brindado durante toda la estancia de investigación.

A la UANL y a Conacyt por financiar mis estudios del posgrado.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biomateriales	1
1.2 Materiales cerámicos	3
1.2.1 Sol-gel para la síntesis de materiales cerámicos	5
1.2.2 Sistema de liberación modificada para fármacos a partir de materiales cerámicos	7
1.3 Liberación modificada	8
1.3.1. Tipos de liberación modificada	8
1.4. Infecciones óseas	11
1.5. Sulfato de Gentamicina	13
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas	14
1.5.2 Mecanismo de acción	14
1.5.3 Farmacocinética	15
1.5.4 Formas comerciales	15
ANTECEDENTES	16
2.1 Proceso Sol-gel	16
2.2 Incorporación de fármacos en matrices poliméricas	17
2.2.1 Incorporación de Sulfato de gentamicina en biomateriales	21
2.3 Cuantificación de Sulfato de gentamicina	22
2.4 Justificación	22
2.5 Aportación científica	24
2.6 Hipótesis	24
2.7 Objetivo general	24
2.7.1 Objetivos específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Síntesis de los materiales	27
3.1.1 Síntesis de los materiales con el uso de tensioactivos	28
3.1.2 Síntesis de los materiales de referencia	30

3.1.3 Impregnación del fármaco Sulfato de Gentamicina	30
3.2 Caracterización de los materiales.....	31
3.2.1 Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD).....	31
3.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	32
3.2.3 Difracción de rayos X (DRX)	32
3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDX)	32
3.2.5 Análisis textural: BET (Brunauer-Emmett-Teller)-BJH (Barrett-Joyner- Halenda).....	33
3.3 Cuantificación de Sulfato de Gentamicina por UV-VIS	33
3.3.1 Curva de calibración y validación del método analítico	35
3.4 Pruebas de Extracción.....	36
3.5 Pruebas de liberación in vitro	37
3.6 Determinación de la liberación del Sulfato de gentamicina de los biomateriales a través de la actividad antibacteriana	38
3.7 Síntesis alternativa de nanopartículas de sílice y su funcionalización por el método de Arriagada y col.....	39
3.7.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa	39
3.7.2 Medición del tamaño de partícula y potencial zeta	42
3.7.3 Impregnación de las nanopartículas con sulfato de gentamicina	42
3.7.4 Curva de calibración y validación del método analítico	42
3.7.5 Cuantificación de Sulfato de gentamicina incorporado en las nanopartículas por HPLC-UV	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Síntesis de los materiales.....	44
4.2 Caracterización de los materiales antes y después de la impregnación..	46
4.2.1 Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD).....	46
4.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	49
4.2.3 Difracción de rayos X (DRX)	53
4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDX)	55
4.2.5 Análisis textural: BET-BJH	59
4.3 Determinación de Sulfato de gentamicina mediante la reacción colorimétrica con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.....	66

4.3.1 Curva de Calibración y validación del método analítico	66
4.4 Pruebas de Extracción.....	68
4.5 Pruebas de liberación in vitro en un sistema estático, utilizando como medio una solución de buffer de fosfatos a pH 7.1	69
4.6 Determinación de la liberación del Sulfato de gentamicina de los biomateriales a través de la prueba de actividad antibacteriana	72
4.6 Síntesis alternativa de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización	75
4.6.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.....	75
4.6.2 Medición del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas.....	75
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la gentamicina	14
Tabla 2. Formas comerciales de gentamicina.....	15
Tabla 3. Condiciones empleadas para la síntesis de los materiales por la vía sol-gel	28
Tabla 4. Estándares para la curva de calibración	35
Tabla 5. Condiciones empleadas para la extracción del Sulfato de gentamicina incorporada en biomateriales.....	37
Tabla 6. Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de los materiales.....	65
Tabla 7. Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de los biomateriales conteniendo Sulfato de gentamicina.	65
Tabla 8. Concentraciones y valores de absorbancia de la cuantificación de gentamicina por UV-Vis	66
Tabla 9. Parámetros generales de la validación del método colorimétrico con ninhidrina	68
Tabla 10. Porcentaje de Sulfato de gentamicina extraído partir de la extracción a 100 rpm.....	69
Tabla 11. Porcentaje de fármaco liberado en las pruebas de liberación in vitro en un sistema estático	71
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la cepa S. aureus por parte de los biomateriales sintetizados.....	73
Tabla 13. Cantidad de nanopartículas obtenidas.....	75
Tabla 14. Tamaños de partícula promedio obtenidos para los 4 tipos de nanopartículas	76
Tabla 15. Potencial zeta obtenido para nanopartículas porosas (sin y con Sulfato de gentamicina)	76
Tabla 16. Tiempos de retención obtenidos para los componentes del Sulfato de Gentamicina.....	78
Tabla 17. Datos estadísticos de la validación del método para la cuantificación de Sulfato de gentamicina por HPLC.....	79
Tabla 18. Cantidad de Sulfato de gentamicina incorporado en las nanopartículas	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los tipos de tensioactivos.....	4
Figura 2. Reacciones que intervienen durante el proceso sol-gel.....	6
Figura 3. Esquema general del proceso sol-gel.....	6
Figura 4. Gráfica comparativa entre la concentración plasmática del fármaco a través del tiempo de una forma de liberación inmediata contra una de liberación modificada	10
Figura 5. Diagrama de proceso de la síntesis del material	30
Figura 6. Mecanismo de la Reacción colorimétrica entre la ninhidrina y el Sulfato de gentamicina.....	34
Figura 7. Metodología de la reacción colorimétrica.....	34
Figura 8. Espectro de absorción de Sulfato de gentamicina (100 mg/L).....	36
Figura 9. Metodología empleada en el ensayo microbiológico.	39
Figura 10. Termogramas de los materiales sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8	47
Figura 11. Termogramas de los materiales sintetizados con CTAB	48
Figura 12. Termograma del Sulfato de gentamicina	49
Figura 13. Espectros de FTIR de materiales sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8	50
Figura 14. Espectros de FTIR de materiales sintetizados con CTAB.	51
Figura 15. Espectros de FTIR de los biomateriales (fármaco impregnado) P1.6, P1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.	52
Figura 16. Espectros de FTIR de los biomateriales (fármaco impregnado) C1.6, C1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.	52
Figura 17. Patrón DRX para los materiales sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8.....	54
Figura 18. Patrón DRX para los materiales sintetizados con CTAB.	54
Figura 19. Patrones de DRX para los biomateriales (fármaco impregnado) P1.6, P1.8, C1.6, C1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.	55
Figura 20. MEB-EDX de materiales sintetizados con Pluronic P-123.	57
Figura 21. MEB-EDX de materiales sintetizados con CTAB.....	57
Figura 22. MEB-EDX de biomateriales (fármaco impregnado) sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8.....	58
Figura 23. MEB-EDX de biomateriales (fármaco impregnado) sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8	58
Figura 24. Los seis tipos de isothermas de adsorción (fisisorción) según la clasificación de la IUPAC	59
Figura 25. Isothermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8	60

Figura 26. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8	61
Figura 27. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales con Pluronic P-123. A) P3 1.6 B) P3 1.8.....	62
Figura 28. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales sintetizados con CTAB. A) C9 1.6 B) C9 1.8	62
Figura 29. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales con Sulfato de gentamicina sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8.....	63
Figura 30. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de biomateriales con Sulfato de gentamicina sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8.	63
Figura 31. Púrpura de Ruthermann obtenido después de la reacción colorimétrica entre la ninhidrina y el Sulfato de gentamicina (estándar de 100 µg/mL).....	67
Figura 32. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación del Sulfato de gentamicina con ninhidrina por UV-Vis a una longitud de onda de 400 nm.	67
Figura 33. Pruebas de extracción de Sulfato de gentamicina a las 24 horas ...	69
Figura 34. Estudios de liberación in vitro en un sistema estático realizado por triplicado	71
Figura 35. Gráfica de la cinética de liberación in vitro del Sulfato de gentamicina	72
Figura 36. Cinética de liberación obtenida a partir del ensayo microbiológico..	74
Figura 37. Fotografías de las placas de 96 pocillos conteniendo el caldo nutritivo, la muestra o estándar y el inóculo de S. aureus.....	74
Figura 38. Cromatograma de Sulfato de gentamicina (estándar 1000 mg/L) ...	78
Figura 39. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación del Sulfato de gentamicina por medio de HPLC.	79

NOMENCLATURA

APTES: 3-amino-propiltriétoxisilano

ATD: Análisis térmico diferencial

ATG: Análisis termogravimétrico

BDDT: Brunauer, Deming, Deming y Teller

BET: Brunauer-Emmet-Teller

BJH: Barrett-Joyner-Halenda

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DRX: Difracción de Rayos-X

EDX: Espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X

EtOH: etanol

FTIR: Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MEB-EDX: Microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X.

PBS: Buffer de fosfatos

ppm: Partes por millón

rpm: Revoluciones por minuto

TEOS: Tetraetil ortosilicato

USP: Farmacopea de Estados Unidos

UV: Ultravioleta

Vis: Visible

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Biomateriales

Un biomaterial se define de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, como “cualquier sustancia o combinación de sustancias, además de fármacos, de origen sintético o natural, que pueden ser usados por un periodo de tiempo indefinido, y que mejora o reemplaza (parcial o totalmente) cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano, para poder mantener o mejorar la calidad de vida de la persona”. (Williams., 1999)

Así mismo, estos biomateriales pueden modificarse superficialmente, por medio de funcionalización (adición de grupos funcionales) o adición de tensioactivos para mejorar sus propiedades y extender así sus aplicaciones. Al adicionar tensioactivos, se obtienen materiales mesoestructurados, los cuales fueron sintetizados por primera vez a principios de la década de los 90 por investigadores de la compañía Mobil Oil. Estos materiales se caracterizan principalmente por tener una alta área superficial y poro uniforme en el rango de 2 a 50 nm (mesoporos). (Vadia y col., 2011)

En los últimos años, los materiales mesoestructurados han tomado gran relevancia debido a sus propiedades físicas y químicas, las cuales les han permitido nuevas aplicaciones en áreas como la medicina y la farmacia, siendo vehículos para la liberación de principios activos, facilitando su transporte hacia

el sitio de interés, logrando así una liberación modificada. Algunos de los materiales más utilizados para este fin, son el dióxido de titanio TiO_2 , dióxido de zirconio ZrO_2 , dióxido de silicio SiO_2 e hidróxidos dobles laminares. (Lariza y col., 2013)

Por otro lado, la estructura superficial de estos materiales puede ser modificada mediante funcionalización, que es un proceso posterior a la síntesis de los materiales, donde se busca cambiar la superficie de los mismos, mediante la adición de grupos funcionales que permiten el anclaje de las moléculas de interés según sea el objetivo. Entre los más estudiados para realizar este proceso, se encuentra el 3-amino-propiltrietoxisilano (APTES), el cual favorece la adición de grupos amino en la superficie. (Llinas y col., 2013)

Los biomateriales tienen diversas aplicaciones, entre las que destaca la elaboración de implantes, por ejemplo, los óseos, los cuales además de proveer un sistema de liberación local de fármacos, pueden llegar a regenerar este tejido. El uso de estos sistemas tiene ventajas importantes, por ejemplo, en una intervención quirúrgica, se presenta dolor e inflamación, además de un alto riesgo de infección, por lo cual, mediante la incorporación de fármacos en biomateriales que pueden ser implantados, el efecto del principio activo se dará de manera local sin afectar otras zonas del organismo, disminuyendo de manera importante los efectos secundarios sistémicos. (Bonilla y col., 2011)

1.2 Materiales cerámicos

Las nanopartículas cerámicas poseen propiedades fisicoquímicas y estructurales que las hacen ideales como agentes nanofarmacéuticos, tales como: el tamaño de partícula (menor a 50 nm), elevada superficie específica, además de una naturaleza porosa que no se afecta por cambios del pH, ni presenta hinchamiento. Por lo tanto, dichas nanopartículas, son capaces de proteger selectivamente a los principios activos, evitando la degradación inducida por cambios de pH y temperatura, además de ser biocompatibles, es decir, que el material tenga la habilidad de funcionar, causar una respuesta apropiada para el portador del mismo y sin causar toxicidad. (Villiers y col., 2010)

La factibilidad de que este tipo de materiales cerámicos puedan utilizarse como vehículos para la liberación de principios activos, por una parte, reside en el fenómeno de adsorción y desorción, lo que permite el alojamiento de los fármacos en el interior de los poros del material hasta su liberación bajo condiciones adecuadas. (Lariza y col., 2013)

Aunado a las características previamente mencionadas, el uso de tensioactivos durante la síntesis de los biomateriales logra ser un complemento para incrementar las propiedades texturales formando así una sílice mesoestructurada, la cual favorece en gran medida el alojamiento del fármaco.

Los sistemas tensioactivos poseen un enorme interés industrial debido a sus múltiples aplicaciones tecnológicas. Todos los sectores de la industria química los utilizan en la producción o en la aplicación de sus productos.

Son fundamentales en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, textil, de pigmentos, pinturas y lubricantes entre otras. Los tensioactivos, llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una naturaleza o estructura polar-no polar, con tendencia a adsorberse en las interfases, haciendo disminuir la tensión superficial. Según el carácter del extremo hidrófilo las moléculas tensioactivas se clasifican en aniónicas, catiónicas, no iónicas y anfóteras (Figura 1). (Martini y col., 1997)

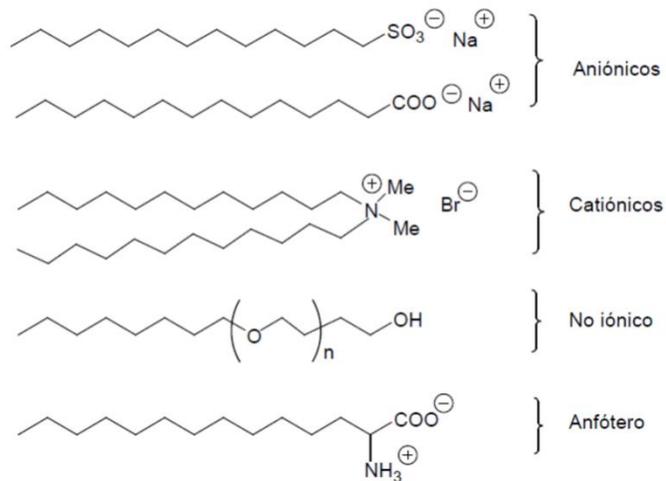


Figura 1. Representación esquemática de los tipos de tensioactivos

Estudios definidos para la sílice han determinado una gran importancia hacia la sílice mesoestructurada por su alta área superficial, porosidad, diversidad de topología de poro (hexagonal, cúbica, laminar, etc.) y su distribución de tamaño de poro relativamente uniforme. (Posada y col., 2011)

1.2.1 Sol-gel para la síntesis de materiales cerámicos

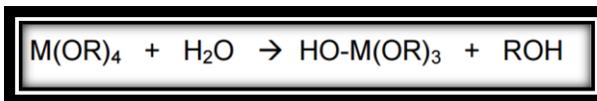
La técnica sol-gel se desarrolló desde hace más de 40 años como una alternativa tecnológica para la preparación de vidrios y cerámicos (Balu y col., 2012). El término "sol-gel" se usa con el fin de describir la síntesis de una red polimérica inorgánica de óxidos metálicos a través de las reacciones químicas de hidrólisis (o hidroxilación) y condensación de precursores moleculares sintéticos; estas reacciones ocurren en solución y a temperatura ambiente. (Carballo y col., 2001)

La primera etapa del proceso es la hidrólisis del alcóxido, y puede ser catalizada por medio de un ácido o una base, en esta etapa se obtienen soles, es decir una suspensión de aspecto similar a una disolución, que contiene partículas de tamaño inferior a 100 nm y se forman grupos silanol (Si-OH) al tiempo en que se libera el alcohol correspondiente (R-OH). Los grupos silanol comienzan a polimerizar por medio de la condensación, formando estructuras tridimensionales unidas por enlaces siloxano (Si-O-Si) al irse eliminando moléculas de agua y de alcohol. Al final de la condensación se inicia la etapa de gelificación caracterizada por la formación de una fase continua, compuesta por una matriz porosa interconectada extendida a todo el volumen de la dispersión coloidal, por lo cual retiene mecánicamente al solvente en su interior a través de fuerzas capilares e interacciones atractivas con la superficie. El paso de la estructura del gel hacia un material sólido poroso requiere la eliminación del solvente embebido en la matriz mediante el proceso de secado o por las técnicas

de extracción supercrítica, cada una de estas alternativas ofrece resultados diferentes sobre las propiedades físicas del sólido.

En la Figura 2 se muestran las reacciones involucradas en las dos etapas del proceso de sol-gel. En la Figura 3 se presenta un esquema del proceso de síntesis de los biomateriales por medio de sol-gel. (Carballo y col., 2001)

Hidrólisis



Condensación

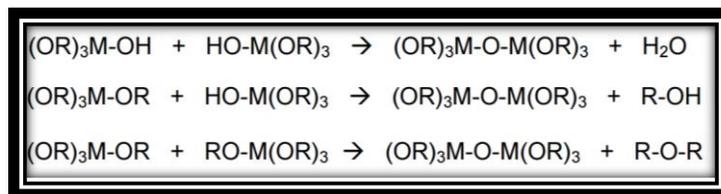


Figura 2. Reacciones que intervienen durante el proceso sol-gel

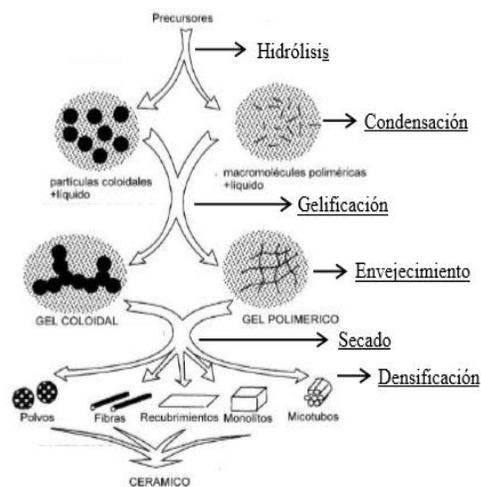


Figura 3. Esquema general del proceso sol-gel

La estructura obtenida finalmente, depende principalmente de las condiciones de reacción, como son la temperatura, el tipo de catalizador, la velocidad de las reacciones de hidrólisis y de condensación, así como el tiempo de secado y el envejecimiento ya que en esta etapa existe una contracción del gel, pudiendo ocurrir una disolución y precipitación de partículas. (Palma y col., 2010)

Una de las ventajas que ofrece el proceso sol-gel para la síntesis de materiales es, la gran variedad de estructuras que determinan diferentes y múltiples aplicaciones. El control de las condiciones de síntesis permite establecer la estructura y espesor de pared de poro; por lo que se pueden predeterminar las aplicaciones a las que someterá el producto final, entre los que se encuentran la preparación de películas delgadas, recubrimientos o polvos nanocristalinos y materiales ópticos de alta calidad. (Aragón y col., 2010)

1.2.2 Sistema de liberación modificada para fármacos a partir de materiales cerámicos

Estos sistemas surgieron de la necesidad de una terapia local efectiva, donde, actualmente están adquiriendo cada vez más importancia debido a las diversas ventajas que presentan. El empleo de biomateriales como soporte de fármacos de liberación modificada, constituye una importante aplicación, donde los materiales cerámicos han tomado relevancia en las últimas décadas. Como consecuencia, se han estudiado estos materiales cerámicos para su empleo en

la cirugía reconstructiva (maxilofacial, ortopedia, ortodoncia). Las primeras cerámicas utilizadas para aplicación médica fueron la alúmina y la zirconia, las cuales se usaron en un principio como prototipos, debido a que eran inertes, condición fundamental para su utilización en implantes. (Vallet-Regi., 2006)

1.3 Liberación modificada

El término liberación modificada es empleado por las Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopeia, USP) y Europea (PhEur) para referirse a cualquier forma de dosificación en la cual las características temporales de la liberación del principio activo y/o su ubicación son manipuladas para lograr determinados objetivos terapéuticos, de conveniencia o comodidad para el paciente.

1.3.1. Tipos de liberación modificada

Las formas de liberación modificada se clasifican en liberación retardada y controlada. En la primera, el principio activo es liberado en un momento distinto al de la administración, pero no se prolonga el efecto terapéutico. Por otro lado, en las formas de liberación controlada, el principio activo se libera escalonadamente en el tiempo (la velocidad de liberación es limitante en el proceso de absorción), extendiéndose el efecto terapéutico. Estas a su vez se subdividen en formas de liberación sostenida y prolongada.

En la liberación sostenida, el principio activo se libera a una velocidad constante con el objetivo de conseguir una velocidad de absorción también constante y así disminuir las fluctuaciones de los niveles plasmáticos del fármaco. Algunos ejemplos de principios activos que se han utilizado para este tipo de liberación son: el nifedipino y la teofilina. Así mismo, en la liberación prolongada, el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir su efecto, y después se libera de forma lenta a una velocidad no necesariamente constante, manteniendo la concentración efectiva durante más tiempo que con las formas de liberación inmediata. Uno de los ejemplos más comunes es el Dabex XR®, el cual consiste en tabletas de liberación prolongada que tienen como principio activo metformina. En la Figura 4 se presenta la comparación entre un perfil de liberación rápida contra uno de liberación modificada.

Existen diferentes tipos de formulaciones con el fin de prolongar la liberación de principio, como lo son el empleo de matrices inertes lipídicas o hidrofílicas, generalmente de naturaleza polimérica, que resisten la disgregación y regulan la liberación del principio activo, principalmente por difusión. También se han desarrollado microcápsulas, microgránulos o microesferas, las cuales se obtienen por aplicación de una fina cubierta de gelatina u otros materiales de naturaleza polimérica sobre pequeñas partículas que contienen uno o varios principios activos. La permeabilidad de las cubiertas condiciona la velocidad de liberación y a su vez las microesferas formuladas y revestidas para modificar la liberación, pueden comprimirse o introducirse en una cápsula de gelatina dura y presentarse en esta forma farmacéutica. (Paradero y col., 2007)

Entre las principales ventajas que presentan las formas de liberación modificada se encuentran, la disminución de la frecuencia de administración para mejorar el cumplimiento terapéutico, disminución de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas y control del sitio de liberación del fármaco.

Un ejemplo de sistema de liberación modificada es el caso de los implantes, los cuales se utilizan principalmente para administración parenteral. Los implantes pueden ser biodegradables o no biodegradables, además de existir bombas implantables que mediante estímulos externos son capaces de liberar el principio activo de manera modificada.

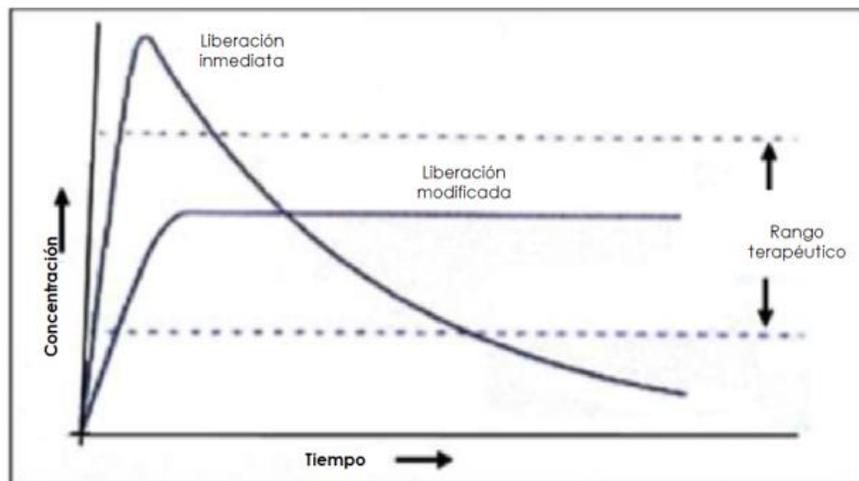


Figura 4. Gráfica comparativa entre la concentración plasmática del fármaco a través del tiempo de una forma de liberación inmediata contra una de liberación modificada

1.4. Infecciones óseas

Los huesos, como otras partes del cuerpo son susceptibles a infecciones, ya que las bacterias u otros microorganismos pueden llegar al hueso desde la piel cercana, músculos vecinos o a través del torrente sanguíneo.

Los factores de riesgo que propician la osteomielitis son variables, entre ellos se encuentran el uso de las prótesis articulares y los estabilizadores utilizados en cirugía ortopédica. Otra causa frecuente de infección es el traumatismo, principalmente cuando se presenta con una herida que favorece la contaminación del hueso o tejidos circundantes. Incluso en ausencia de una herida abierta o fractura expuesta, el tejido lesionado y la sangre extravasada reducen la circulación, estableciendo un medio favorable para el crecimiento de bacterias que llegan hasta la zona por una bacteriemia moderada desde la circulación venosa periférica. Así mismo, la diabetes es otros de los factores que contribuyen considerablemente a la osteomielitis debido a las complicaciones generadas por la hiperglucemia, hipoestesia, vasculopatía e insuficiencia renal. (Longo y col., 2012)

Una de las infecciones óseas más comunes es la osteomielitis, la cual es causada principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), esta enfermedad como en otras enfermedades infecciosas, el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno mejoran el pronóstico y minimizan el riesgo de la evolución a la cronicidad y las complicaciones. Los antibióticos más usados para el tratamiento de dicha enfermedad son el sulfato de gentamicina, cefalosporina,

rifampicina y la penicilina, los cuales generalmente se administran a altas dosis por vía parenteral. (Longo y col., 2012)

Los estudios de la bacteriemia por *S. aureus* indican que la frecuencia de osteomielitis metastásica es cercana al 28% en presencia de una prótesis articular. Esta se complica cuando participan cepas de *S. aureus* resistentes a la metililina (SARM).

En México, el 2.67% de los pacientes con osteopatías y condropatías, padecen de osteomielitis. Además, en el 61% de los casos, el género masculino, con edades superiores a los 40 años, es el más susceptible a esta enfermedad. (Instituto Nacional de Rehabilitación., 2011)

En Estados Unidos, la osteomielitis aguda tiene una frecuencia de 0.1 a 1.8% en la población sana de adultos. Después de una herida punzante en un pie, entre 30 y 40% de los adultos con diabetes padece osteomielitis. La neuropatía diabética facilita el avance de esta enfermedad, puesto que el paciente ignora la presencia de la infección mientras ésta se disemina en el hueso, terminando en una de las miles de amputaciones que se realizan cada año.

La inmunosupresión ocasionada por quimioterapia, tratamiento con glucocorticoides e inhibidor del factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), inhibe los mecanismos normales de defensa y por lo tanto predispone a infecciones más graves y frecuentes. (Longo y col., 2012)

Por lo anterior surge la necesidad de desarrollar alguna alternativa para el tratamiento o la profilaxis de infecciones óseas, ya que se necesitan formas farmacéuticas que liberen la concentración terapéutica del fármaco directamente en el sitio de acción, reduciendo los efectos adversos y evitando el riesgo de desarrollar cepas resistentes, al mantener concentraciones efectivas del antibiótico durante el curso del tratamiento.

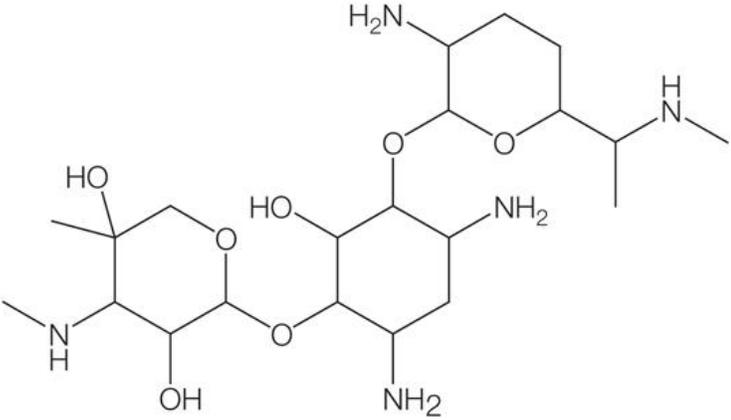
1.5. Sulfato de Gentamicina

Los aminoglucósidos son útiles contra las infecciones que involucran, bacterias gram-negativas y positivas, como *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*, así como algunas micobacterias, incluyendo las que causan la tuberculosis. Uno de los antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, es el sulfato de gentamicina, aislada a partir de *Micromonospora purpurea*, la cual es utilizada para el tratamiento de infecciones óseas, tales como la osteomielitis, ocasionada por *S. aureus*. Se utiliza con frecuencia en combinación con una penicilina o una cefalosporina para la terapia de diversas infecciones microbianas, entre las que se encuentran infecciones del tracto urinario, bacteriemia, quemaduras infectadas, osteomielitis, neumonía, peritonitis, y otitis. Algunas de las reacciones adversas más comunes del sulfato de gentamicina son la nefrotoxicidad, neurotoxicidad, depresión respiratoria, letargo, disminución del apetito, hipotensión e hipertensión (PLM: Diccionario de Especialidades Farmacéuticas., 2017)

1.5.1 Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas

La gentamicina tiene una fórmula molecular $C_{21}H_{43}N_5O_7$ y un peso molecular de 477.32 g/mol. Es un polvo incoloro a blanco, higroscópico y sin olor. Su solubilidad en agua es de 50 mg/mL. En la Tabla 1, se presentan las propiedades fisicoquímicas de la gentamicina. (DrugBank., 2017)

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la gentamicina

Categoría	
Aminoglucósidos	
Nombre IUPAC	2-[4,6-diamino-3- [3-amino-6-(1-metilaminoetil) tetrahidropiran-2-il] oxi-2-hidroxi-ciclohexoxi]-5metil-4-metilamino-tetrahidropiran-3,5-diol
Estructura química	
LogP	-3.1
Temperatura de fusión	218-237 °C
pKa	10.18
Unión a proteínas	Bajo (0-30%)

1.5.2 Mecanismo de acción

La gentamicina atraviesa por transporte activo la membrana celular de las bacterias susceptibles uniéndose a la subunidad ribosómica 30S, interfiriendo

en el inicio de la síntesis de proteína. Por lo tanto, produce una lectura errónea de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), dando lugar a la producción de proteínas anormales o no funcionales. (Goodman & Gilman., 2014)

1.5.3 Farmacocinética

La gentamicina se absorbe rápida y completamente por vía intramuscular. Sus concentraciones plasmáticas son máximas (4 a 6 µg /mL) en 60 a 90 minutos y son eficaces por un lapso de 4 horas. Las concentraciones plasmáticas son similares después de aplicar el medicamento intravenosamente. Se distribuye principalmente en el líquido extracelular y 30 minutos después de su aplicación se le encuentra en casi todos los tejidos, líquidos y cavidades orgánicas. La vida media de eliminación plasmática de gentamicina es generalmente 2-3 horas en adultos con función renal normal y se prolonga de 24 a 60 horas en adultos con insuficiencia renal grave. (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., 2017)

1.5.4 Formas comerciales

Los aminoglucósidos se administran en forma de sal, por lo que el catión es mínimamente absorbido en el tubo digestivo. Menos del 1% de una dosis se absorbe después de la administración oral o rectal, por lo que, la administración oral de la gentamicina no es utilizada, sin embargo, existen otras formas comerciales que se muestran en la Tabla 2. (Goodman & Gilman., 2014)

Tabla 2. Formas comerciales de gentamicina

Nombre	Forma comercial	Concentración	Vía de administración
Garamicina	Ungüento	3 mg/g	Oftálmica
Garamicina	Solución/gotas	3 mg/mL	Oftálmica
Gentamicina	Solución/Inyección	40 mg/mL	Intravenosa/Intramuscular

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Proceso Sol-gel

Las propiedades físicas de los coloides estuvieron bajo un intenso estudio por investigadores tales como: Becquerel, Faraday, Tyndall, Graham y Schulze; en 1846 Ebelmen preparó los primeros alcóxidos mediante la reacción entre tetracloruro de silicio y alcohol. En 1876, Troost y Hautefeuille hicieron derivados hidrolizados de silicio y alcóxidos. En 1884 Grimaux hidrolizó tetrametoxisilano para preparar soles de ácido silícico e hizo coloides de óxido de hierro a partir de alcóxidos de hierro. (Palma y col., 2010)

En el campo de la cirugía ortopédica, el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos empleando cerámicas sintetizadas por la técnica sol-gel ha tomado gran importancia, ya que han mostrado poseer excelentes propiedades respecto a su biocompatibilidad y bioactividad, es decir, su capacidad de unirse al hueso sin interposición de tejido fibroso, promoviendo de este modo la regeneración del mismo. Además, la adición de un antibiótico o un desinflamatorio, para lograr un efecto terapéutico localizado, permite afrontar un reto científico actual en la búsqueda de nuevas formas farmacéuticas.

Es conocido que manipulando las condiciones de síntesis en las matrices cerámicas, como puede ser pH, relación precursor/agua y el empleo de plantillas como los tensioactivos, es posible producir materiales mesoporosos con una

estructura con alta área superficial y un tamaño de poro adecuado al fármaco a incorporar, que permita la liberación modificada durante un cierto periodo de tiempo. (Vallet-Regi., 2006)

2.2 Incorporación de fármacos en matrices poliméricas

En el 2007, Ambrogi y colaboradores, estudiaron nanopartículas de sílice sintetizada con un tensioactivo de naturaleza catiónica para la liberación de piroxicam, un fármaco poco soluble en agua. En este caso utilizaron bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) utilizando un método de síntesis hidrotermal a 80°C. Ellos obtuvieron sílice de una alta área superficial y diámetros de poro mayores al tamaño de la molécula del piroxicam; al trabajar con un pH ácido de 1.2, se pudo liberar hasta 90% del piroxicam incorporado en la sílice en aproximadamente 5 minutos, en comparación con la disolución de su forma cristalina (menos del 56% en 120 minutos). De esta manera concluyeron que la tasa de disolución aumenta para el caso de las nanopartículas en un pH ácido, donde la solubilidad del piroxicam es baja. (Ambrogi y col., 2007)

En el 2009, Badiei y colaboradores, lograron sintetizar materiales mesoporosos con el tensioactivo Pluronic P-123 con el fin de probar la liberación controlada del ibuprofeno. Ellos compararon la liberación del fármaco, habiendo utilizado dos métodos de incorporación diferentes: durante la síntesis y después por impregnación. Encontraron que se logró incorporar un 30% y 100% del fármaco respectivamente en cada uno de los métodos antes mencionados,

además de que mostró una liberación del 90% del ibuprofeno cargado en 96 horas. (Badiei y col., 2009)

En 2015, Hanafi-Bojd y colaboradores, incrementaron la eficacia de Epirubicina (EPI) por medio de su encapsulación en partículas mesoporosa de sílice (MSNs), funcionalizándolas con polietilenglicol (PEG), fosfonato y polietiliminina-polietilenglicol (PEI-PEG). A su vez también utilizaron Pluronic F127 y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para elaborar un material mesoestructurado; donde la liberación del fármaco se dio de manera dependiente del pH del medio, comprobando que las nanopartículas MSN@PEI-PEG@EPI tenían una mayor eficacia comparada con la epirubicina no encapsulada después de 3 horas de la administración del fármaco de manera intravenosa en ratones. (Hanafi-bojd y col., 2015)

En 2011, Szegedi y colaboradores trabajaron con el fármaco ibuprofeno, incorporándolo a materiales de sílice con morfología esférica. Se compararon dos materiales, MCM-41 (sintetizado con el tensioactivo bromuro de cetiltrimetilamonio-CTAB) y SBA-15 (sintetizado con el tensioactivo Pluronic P-123) que fueron modificados en su superficie con grupos amino. Ellos observaron que el material SBA-15 sin adición de grupos amino lograba adsorber una cantidad mayor de fármaco (349 mg/g), en comparación con el material MCM-41 (368 mg/g), concluyendo que la adición de grupos amino a la superficie logra incrementar la cantidad de fármaco incorporada. (Szegedi y col., 2011)

En 2012, Shifeng Yan y colaboradores, trabajaron con 5-fluorouracilo, un fármaco anticanceroso, lograron funcionalizar microcápsulas de sílice con poliácido láctico co-glicólico (PLGA) y quitosán obteniendo una gran capacidad de carga del fármaco dentro de la matriz cerámica. Concluyeron que, mediante una variación del pH y concentración de sal, la capacidad de carga puede aumentar. El fármaco logró liberarse de manera controlada, especialmente en un ambiente ácido *in vitro*, llegando hasta una liberación del 93% durante 53 horas a pH fisiológico. (Yan y col., 2012)

En 2013, Ying Qu y colaboradores, realizaron la funcionalización de partículas mesoporosas de sílice (MSNs) con poli-p-vinileno (PPV), el cual se caracteriza por ser un polímero fluorescente conjugado; dicha funcionalización la hicieron por intercambio iónico y polimerización de la ruta *in situ* (Ruta Stöber). Este procedimiento se hizo sustentado en la técnica sol-gel e incorporando al ibuprofeno, logrando de esta manera una liberación sostenida en un fluido corporal simulado. Concluyeron que las partículas mostraron una morfología y mesoestructura eficiente para lograr una liberación sostenida, además de excelente fluorescencia para monitoreo del fármaco. (Qu y col., 2013)

En 2013, Martín, A. y colaboradores incorporaron la prednisolona dentro de soportes de sílice funcionalizados con grupos amino, específicamente la polietiliminina (PEI), encontraron que los soportes funcionalizados con PEI presentaron una mayor capacidad de adsorción del fármaco que los soportes de sílice puros. Concluyeron que la liberación de prednisolona *in vitro* a partir de los

soportes de sílice se produjo más rápido que la disolución del fármaco puro, como consecuencia de la baja solubilidad de la prednisolona en una solución de buffer con pH 7.2. (Martín y col., 2013)

En 2015, Da Huang y colaboradores, experimentaron con isoniazida conjugada con PLGA (poli-ácido láctico co-glicólico) y funcionalizada con grupos aldehído (4-carboxibenzaldehído). Los resultados demostraron que el sistema de administración de fármacos puede lograr simultáneamente la liberación controlada localizada de principios activos a largo plazo y la regeneración ósea, lo cual resulta prometedor para la mejora del tratamiento de la tuberculosis ósea. (Huang y col.,2015)

En 2014, Tatiana Adreani y colaboradores, demostraron que la adición de polietilenglicol (PEG) a la superficie de las nanopartículas de sílice permitió la estabilización de las mismas en fluidos gástricos e intestinales, mejorando así el transporte del fármaco. El estudio fue realizado con insulina, teniendo como resultado de la PEGilación, una liberación más rápida en condiciones gástricas e intestinales *in vitro* en comparación con la sílice sin recubrimiento, debido a la escasa interacción entre los grupos de la insulina y el silanol presente en la superficie de la sílice. Además, concluyeron que la presencia de PEG en la sílice no incremento la penetración de la insulina a través de la mucosa del intestino delgado. (Andreani y col., 2014)

2.2.1 Incorporación de Sulfato de gentamicina en biomateriales

La incorporación de fármacos en matrices poliméricas, con el objetivo de desarrollar nuevas formas farmacéuticas estables, seguras y eficaces, es una necesidad actual. Entre los antecedentes de incorporación de antibióticos como el Sulfato de gentamicina, se encuentra el realizado en el 2014, por Chi-Jen Shih y colaboradores, quienes prepararon polvos mesoporosos de fosfato de calcio a base de sílice; uno empleando el tensioactivo no iónico comercialmente conocido como Pluronic F-127 en comparación a uno sin él. En este estudio se comparó la capacidad de los dos materiales (polvos) para contener Sulfato de gentamicina, evaluando la capacidad de carga y encapsulación del Sulfato de gentamicina en estos polvos. El resultado determinó que la capacidad de encapsulación del biomaterial con Pluronic F-127 fue de 29.4%, mientras que para el control fue de 5.4%, concluyendo así que el biomaterial sintetizado con tensioactivo aumenta la capacidad de carga del fármaco, debido a la obtención de un área superficial mayor y un volumen de poro más grande, presentando máximo valor de encapsulación de Sulfato de gentamicina de 39.9 mg/g, partiendo de una concentración inicial de 50 mg/mL. (Shih y col., 2014)

En el 2014, Correa y colaboradores, realizaron la incorporación de Sulfato de gentamicina en matrices de sílice sintetizadas por la técnica sol-gel. Se estudiaron tres condiciones de síntesis: una consistió en la gelificación catalizada por medio ácido (ácido clorhídrico), gelificación catalizada por medio básico (hidróxido de amonio) y la tercera empleó la precipitación rápida en medio básico (hidróxido de amonio). Al determinar, la actividad antibacteriana de los

biomateriales sintetizados, el obtenido por la variante de precipitación con hidróxido de amonio demostró ser más activo, ya que logró una mayor cantidad de Sulfato de gentamicina encapsulada en comparación con los otros dos biomateriales.(Correa y col.,2014)

2.3 Cuantificación de Sulfato de gentamicina

En el 2000, Frutos y colaboradores, desarrollaron un método colorimétrico para la cuantificación de Sulfato de gentamicina basado en la reacción con ninhidrina. Este consiste en la reacción de ninhidrina con las aminas primarias y secundarias presentes en el Sulfato de gentamicina, dando como resultado el púrpura de Ruhemann. Los autores evaluaron diferentes factores como el pH, concentración de ninhidrina y tiempo de reacción para lograr la optimización método. Lograron cuantificar el Sulfato de gentamicina por espectrofotometría a 400 nm, encontrando una linealidad en un rango de 30 a 120 $\mu\text{g/mL}$.

2.4 Justificación

Todo lo anterior permite observar la relevancia del desarrollo de biomateriales con el propósito de buscar matrices poliméricas que conlleven a lograr una liberación modificada de fármacos y minimizar los efectos adversos causados por las formulaciones convencionales. En la revisión bibliográfica, se reporta que se ha logrado incorporar en matrices cerámicas, fármacos de diversa naturaleza y efecto terapéutico como: antineoplásicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticosteroides, antibióticos, antifúngicos, etc., lo cual demuestra que el potencial de estos biomateriales no se limita a un solo tipo de

fármacos, mostrando además es posible obtener un perfil de disolución de una formulación de liberación modificada de fármacos.

Su estructura porosa ordenada y tamaño de poro homogéneo favorece la reproducibilidad de los procesos de adsorción y liberación de biomoléculas. Además, en la superficie de la sílice existen grupos silanol susceptibles de reaccionar químicamente con moléculas orgánicas (funcionalización), lo que permite controlar la interacción biomolécula-matriz y así modular los procesos de adsorción y liberación. Conociendo que, si las matrices cerámicas poseen una elevada superficie específica y volumen de poro grande, favorecen su capacidad de adsorción, es por lo cual se da la búsqueda de estructuras ordenadas y homogéneas en los últimos años. Dichas estructuras, se han logrado por medio de la incorporación tensioactivos en la síntesis, tal y como lo demuestran Hanafi-Bojd y Chi-Jen Shih, los cuales lograron un porcentaje de incorporación mayor de fármacos antineoplásicos y antibióticos por medio tensioactivos catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y no iónicos como el Pluronic F-127.

En este contexto, nuestro grupo de investigación estudió las condiciones de síntesis de biomateriales a base de dióxido de silicio para contener un antibiótico que posteriormente se libere de manera gradual., en este proyecto se planteó determinar el tipo de tensioactivo, pH y la relación de precursor/agua que permita obtener biomateriales mesoestructurados, con potencial para ser empleados como vehículos de liberación modificada de Sulfato de gentamicina.

2.5 Aportación científica

La síntesis de un biomaterial a base de SiO₂ conteniendo Sulfato de gentamicina obtenido mediante la síntesis sol-gel, podrá tener potencial aplicación en la elaboración de implantes para la profilaxis y tratamiento localizado de infecciones óseas.

2.6 Hipótesis

Los biomateriales cerámicos a base de SiO₂ mesoestructurado con un tensioactivo catiónico y no iónico, conteniendo Sulfato de gentamicina provee una alternativa de liberación prolongada por 120 horas, con potencial aplicación en la elaboración de un implante con actividad antibacteriana.

2.7 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar materiales mesoestructurados utilizando dos tensioactivos diferentes mediante la técnica sol-gel y evaluar las características de liberación del Sulfato de gentamicina incorporado.

2.7.1 Objetivos específicos

- Sintetizar vía sol-gel los biomateriales mesoestructurado de SiO₂ conteniendo Sulfato de gentamicina incorporada por impregnación (20%) empleando dos diferentes tensioactivos (Bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB y Pluronic P-123) a diferentes relaciones TEOS/H₂O y pH.

- Caracterizar el material sintetizado antes y después de la impregnación mediante técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas.
- Evaluar *in vitro* la cinética de liberación de Sulfato de gentamicina en solución a pH 7.1, el cual corresponde al pH del tejido muscular.
- Determinar la liberación del fármaco a partir del biomaterial mesoestructurado en un cultivo de *S. aureus*.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). La metodología se dividió en las siguientes etapas:

- Síntesis de los materiales. Laboratorio de Biofarmacia, Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), UANL.
- Caracterización de los materiales. Se realizaron en los Laboratorios de FCQ y en el Departamento de Ecomateriales y Energía, Facultad de Ingeniería Civil (FIC), UANL.
- Pruebas de extracción y liberación *in vitro* de los biomateriales. Laboratorio de Biofarmacia, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
- Pruebas microbiológicas de liberación del fármaco. Laboratorio de Biotecnología, FCQ, UANL.

3.1 Síntesis de los materiales.

La síntesis de los materiales se realizó por medio del proceso sol-gel, empleando tensioactivos como “plantillas”, con la finalidad de mejorar el ordenamiento en la estructura del material e incrementar el área superficial y la formación de poros en ellos, en la búsqueda de materiales que puedan ser útiles como soporte de fármacos. La técnica sol-gel, consiste en llevar a cabo la hidrólisis y condensación del precursor que en este caso fue el alcóxido metálico, tetraetil ortosilicato (TEOS), y el empleo de dos tensioactivos, uno de naturaleza catiónica: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y el otro de carácter no iónico patentado como Pluronic P-123, que consiste en un copolímero tribloque compuesto por poli (óxido de etileno) (PEO) y poli (óxido de propileno) (PPO), que funcionaron como moldes con el fin de lograr un material mesoporoso y mesoestructurado.

Los reactivos utilizados para la síntesis de los materiales fueron: Tetraetil ortosilicato, TEOS (98%, Aldrich ®), alcohol etílico (96.6%, DEQ®) y agua nanopura (18.0 MΩ cm-1). Se llevaron a cabo bajo cuatro diferentes condiciones de síntesis (Tabla 3), donde las variantes fueron: la relación de TEOS/Agua (1:6 y 1:8) y el pH (3 y 9), así como los tensioactivos CTAB (Sigma-Aldrich ®) y Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich ®). Finalmente, a cada uno de los materiales sintetizados, secados y calcinados, se les incorporó por impregnación el antibiótico Sulfato de gentamicina (99%, Sigma-Aldrich ®) al 20% p/p.

Tabla 3. Condiciones empleadas para la síntesis de los materiales por la vía sol-gel

Tensioactivo	Relación TEOS/H ₂ O	pH	Secado	Calcinación
Pluronic P-123	1:6	3	70 °C	550 °C por 6 horas (rampa 10 °C/min)
	1:8			
CTAB	1:6	9		
	1:8			

3.1.1 Síntesis de los materiales con el uso de tensioactivos

La metodología empleada para la síntesis del material donde se empleó el tensioactivo Pluronic P-123 fue la siguiente: se disolvieron 17.4 g de Pluronic P-123 en 25 mL de etanol (EtOH) con agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm) por espacio de 1 hora hasta lograr la disolución completa del tensioactivo. A la solución del tensioactivo se agregaron según el caso, 17.89 mL (relación 1:6) ó 23.86 mL (relación 1:8) de agua destilada con 25 mL EtOH (dar al final 50 % de EtOH). El pH se ajustó a 3 con una solución 2 M de HCl, para después agregar gota a gota 37 mL de TEOS con agitación magnética por 2 horas.

Para lograr la sinéresis de los materiales sintetizados con este tensioactivo, los materiales se reposaron a temperatura ambiente, visualizándolos diariamente para observar la formación del gel. Lograda la gelificación, el material se secó a 70 °C durante 12 horas para la remoción de los solventes y con el fin de eliminar el tensioactivo, los materiales se calcinaron a

550 °C por 6 horas con una rampa de calentamiento de 10°C/min. Finalmente, los materiales fueron almacenados en un desecador para su próximo uso.

Para la síntesis del material con el CTAB, se disolvieron 7.6 g del tensioactivo en 25 mL de EtOH con agitación a 100 rpm por 1 hora para lograr su disolución completa. Después se agregaron a la solución según el caso, 17.89 mL (para la relación 1:6) o 23.86 mL (para la relación 1:8) de agua destilada con 25 mL EtOH. El pH se ajustó a 9 con una solución 2 M de NH₄OH, para después agregar gota a gota 37 mL de TEOS con agitación por 2 horas. Todos los materiales fueron sintetizados a temperatura ambiente.

Los materiales obtenidos se dejaron en reposo a temperatura ambiente, con el fin de permitir la maduración del gel antes de su secado. Concluido el tiempo este proceso, el material se secó a 70 °C durante 12 horas para eliminar los solventes, para finalmente realizar una calcinación a 550 °C por 6 horas con una rampa de calentamiento de 10°C/min, para remover el tensioactivo y lograr obtener el material. Este material se guardó en desecador para su próximo empleo. La metodología general para la síntesis de los materiales se muestra en la Figura 5.

3.1.2 Síntesis de los materiales de referencia

Una metodología similar fue empleada para la síntesis de materiales cuya variable fue la ausencia de tensioactivo, y emplearse como patrón de comparación y lograr determinar las diferencias estructurales en los materiales según las varias empleadas. (Figura 5).



Figura 5. Diagrama de proceso de la síntesis del material

3.1.3 Impregnación del fármaco Sulfato de Gentamicina

La incorporación del Sulfato de gentamicina en cada uno de los materiales se realizó por medio de la técnica de impregnación, donde se disolvieron 40 mg de fármaco en 3 mL buffer de fosfatos (PBS) preparado de acuerdo a la solución amortiguadora (SA) de Fosfatos pH 7.0 establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Una vez preparada la solución de Sulfato de

gentamicina, se procedió a sumergir 200 mg de material, agitando por 24 horas para después dejarlo reposar por otras 24 horas. Finalmente, los materiales fueron secados a 60 °C.

3.2 Caracterización de los materiales

Los materiales sintetizados fueron caracterizados por medio de las técnicas siguientes: análisis termogravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD), difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), microscopia electrónica de barrido (MEB) con sonda de dispersión de energía de rayos-X (EDX), además con los datos obtenidos a partir de las isothermas de adsorción de nitrógeno, se determinaron el área superficial con la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y por el método de Barrett-Joyner (BJH) la porosidad de los materiales sintetizados.

3.2.1 Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD)

El análisis térmico gravimétrico (ATG) permite evaluar la descomposición y estabilidad térmica del material mientras que el análisis (ATD), indica la temperatura a la que sucede un cambio energético en el material y si su proceso es de tipo exotérmico o endotérmico. Los materiales obtenidos fueron evaluados en el analizador térmico diferencial/termogravimétrico TA Instruments SDT 2960, realizándose las mediciones en un rango de 25-800 °C, con atmósfera de aire y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

3.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los estudios se realizaron en el espectrofotómetro infrarrojo Spectrum One Perkin Elmer. El barrido espectral se realizó en un intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . Por medio de esta técnica se buscó la presencia de las bandas características de los enlaces presentes tanto en la sílice como en el fármaco (Sulfato de gentamicina) presente en la matriz cerámica sintetizada como un medio de asegurarse el éxito de la síntesis.

3.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X, para el Sulfato de gentamicina y los materiales producto de la síntesis se realizaron con el difractómetro de rayos X Siemens D-500. La intensidad de difracción se midió en un intervalo 2θ de 5° a 90° , con un tamaño de paso de 0.02° .

3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDX)

Para conocer la morfología de los materiales, se realizaron análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), con el microscopio electrónico de barrido JSM-6701F acoplado con una sonda para EDX. Es una técnica donde el barrido de una muestra con un haz de electrones permite obtener imágenes en blanco y negro de alta resolución por encima de 100,000 aumentos, que posibilita estudiar detalles de su morfología. Además, esta técnica permite

conocer también el tamaño de partícula promedio de cada material en estudio. Para el caso de la sílice mesoporosa, se debe hacer una preparación de la muestra ya que no es un material conductor, por lo cual se utilizó un recubrimiento de oro-paladio y una cinta de cobre para fijarlos. Así mismo se empleó la sonda el EDX para conocer la composición de cada material.

3.2.5 Análisis textural: BET (Brunauer-Emmett-Teller)-BJH (Barrett-Joyner-Halenda)

Las isothermas de adsorción y desorción de Nitrógeno se obtuvieron usando el equipo Quantachrome Autosorb-1 AS-1C2. El área superficial se calculó por el método BET y el volumen de poro se determinó por el método BJH a partir de las isothermas de adsorción. Las muestras sin el fármaco, pero con tensioactivo y sin tensioactivo se desgasificaron al vacío a 300 °C y a 90 °C cuando se encontraban impregnadas con el Sulfato de gentamicina (fármaco).

3.3 Cuantificación de Sulfato de Gentamicina por UV-VIS

La cuantificación del Sulfato de gentamicina se hizo por medio de una reacción colorimétrica con ninhidrina, la cual al ser un oxidante fuerte es capaz de provocar la descarboxilación oxidativa y desaminación de la estructura del Sulfato de gentamicina. El método se basa en la reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) con las aminas primarias y secundarias a temperaturas elevadas, formándose amoniaco y anhídrido carbónico por reducción de la ninhidrina a hidrindantina. Al darse la reacción, se genera un compuesto de

coloración azul-púrpura, denominado púrpura de Ruthemann. El cromóforo para el caso del Sulfato de gentamicina puede ser detectado a 400 nm y 550 nm aproximadamente. (Frutos y col., 2000)

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción del Sulfato de gentamicina, se llevó a cabo el espectro de absorción UV-Vis en un espectrofotómetro (Perkin Elmer), realizando un barrido en el rango 600- 400 nm, encontrando que tiene un máximo de absorción a la longitud de onda de 400 nm. En la Figura 6 se muestra la reacción de la ninhidrina con el Sulfato de gentamicina. Así mismo en la Figura 7 se muestra la metodología a seguir para dicha reacción.

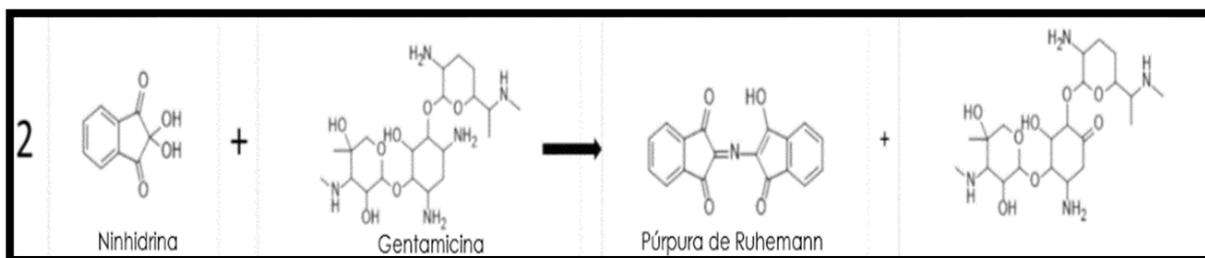


Figura 6. Mecanismo de la Reacción colorimétrica entre la ninhidrina y el Sulfato de gentamicina

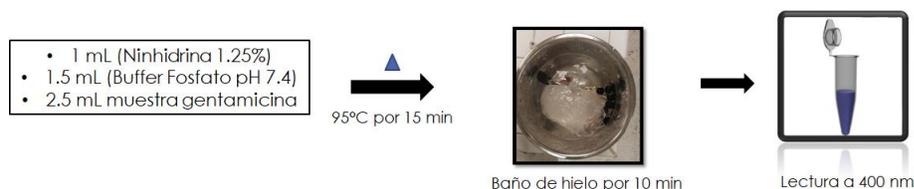


Figura 7. Metodología de la reacción colorimétrica

3.3.1 Curva de calibración y validación del método analítico

Después de establecer la longitud de máxima absorción del compuesto coloreado formado, así como los parámetros de temperatura y tiempo para la formación del compuesto púrpura de Ruthermann. Se procedió a la elaboración de la curva de calibración. Se prepararon 9 estándares (Tabla 4) partiendo de una solución stock de 300 mg/L de Sulfato de gentamicina, haciéndose las diluciones necesarias en matraces de aforación de 10 mL. Así mismo, se realizó la validación del método analítico por triplicado de acuerdo a lo planteado en la sección 7.4 de la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 4. Estándares para la curva de calibración

Estándar	Sulfato de gentamicina (mg/L)
1	10
2	30
3	60
4	90
5	120
6	150
7	200
8	260
9	300

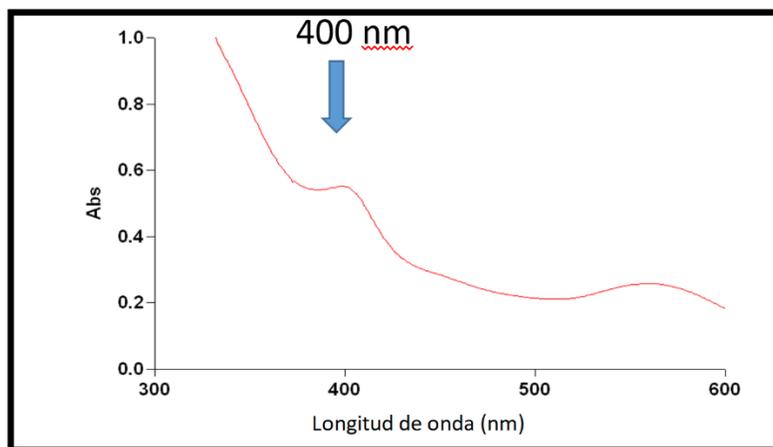


Figura 8. Espectro de absorción de Sulfato de gentamicina (100 mg/L)

La preparación de cada uno de los estándares se hizo por triplicado y se midieron a una longitud de onda de 400 nm. En la Figura 8 se muestra el espectro de absorción de un estándar de 100 mg/L de Sulfato de gentamicina, el cual se usó para confirmar la longitud de máxima absorbancia.

3.4 Pruebas de Extracción

Para determinar el porcentaje de Sulfato de gentamicina incorporada en cada uno de los cuatro biomateriales sintetizados vía sol-gel, se llevaron a cabo pruebas de extracción, en las cuales las muestras se sometieron a agitación mecánica en el equipo Incubator shaker LAB-LINE®. Se depositaron 50 mg de biomaterial en 50 mL de medio de disolución preparado de acuerdo a la solución amortiguadora (SA) de Fosfatos pH 7.1 establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM., 2017). Las condiciones de trabajo se observan en la Tabla 5. El tiempo de extracción fue de 24 horas, concluido este

tiempo, se tomó una alícuota de 2.5 mL de la disolución del material en turno y se filtró con Milipore Millex -HN Nylon 0.45 μ . Posteriormente se cuantificó la cantidad de Sulfato de gentamicina por el método colorimétrico con ninhidrina.

Tabla 5. Condiciones empleadas para la extracción del Sulfato de gentamicina incorporada en biomateriales

Medio de disolución	Agitación	Temperatura	Tiempo
Buffer de fosfatos pH 7.1	100 rpm	37 °C	24 horas

3.5 Pruebas de liberación *in vitro*

Para evaluar los perfiles de liberación del fármaco se llevaron a cabo pruebas *in vitro*. Se utilizaron vasos de precipitado de 250 mL, donde se colocaron 200 mg del biomaterial en un volumen de 150 mL del buffer de fosfatos a un pH 7.1 previamente desgasificado por medio de un baño de ultrasonido (modelo Branson 2510) por 20 minutos. Empleando como criterio de selección del pH del buffer empleado, utilizado la semejanza al del tejido muscular, por la posibilidad de una aplicación futura como implante. La prueba de liberación se realizó a una temperatura ambiente de 25 °C.

La cinética de la liberación del fármaco a partir del biomaterial se siguió tomando alícuotas a diferentes intervalos de tiempo. Los tiempos fueron de 1 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 120 h y 144 h. Se tomaron del medio de disolución, alícuotas de 2.5 mL con jeringa y posteriormente se filtraron con Milipore Millex -HN Nylon 0.45 μ . Se determinó la cantidad de Sulfato de gentamicina por medio

de espectroscopia Vis, empleando la reacción colorimétrica con ninhidrina (6.3). La disolución se realizó por triplicado.

3.6 Determinación de la liberación del Sulfato de gentamicina de los biomateriales a través de la actividad antibacteriana

Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923) proporcionada por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. El experimento se llevó a cabo empleando las medidas de seguridad en una campana de Bioseguridad No.1, todo el material, reactivos y medios de cultivos empleado fueron esterilizados en autoclave (All American 75X) a 15 psi y 120 °C por 15 minutos. El ensayo microbiológico se hizo en placas de 96 pocillos de acrílico estériles con fondo redondo. La determinación del perfil de liberación por el efecto antimicrobiano se inició a partir de un inóculo correspondiente a 1.5×10^8 bacterias/mL, ajustada por medio del tubo de Mc Farland 0.5. Se preparó caldo nutritivo, disolviendo 1.89 g de caldo Mueller Hinton en 90 mL de agua destilada. Primeramente, en la placa de 96 pocillos, cada pocillo se llenó con 100 μ L de caldo nutritivo, posteriormente se agregaron 50 μ L del inóculo de *S. aureus* y 50 μ L de la muestra o estándar a estudiar. Para el caso del control positivo, se reemplazaron los 50 μ L de la muestra con caldo nutritivo; para el caso del control negativo, se agregaron 100 μ L de caldo nutritivo, dando 200 μ L finales en cada pocillo. En la Figura 9, se muestra la metodología

realizada. Finalmente se midió la absorbancia por medio de un lector de placas.

La duración del experimento fue de 48 horas.

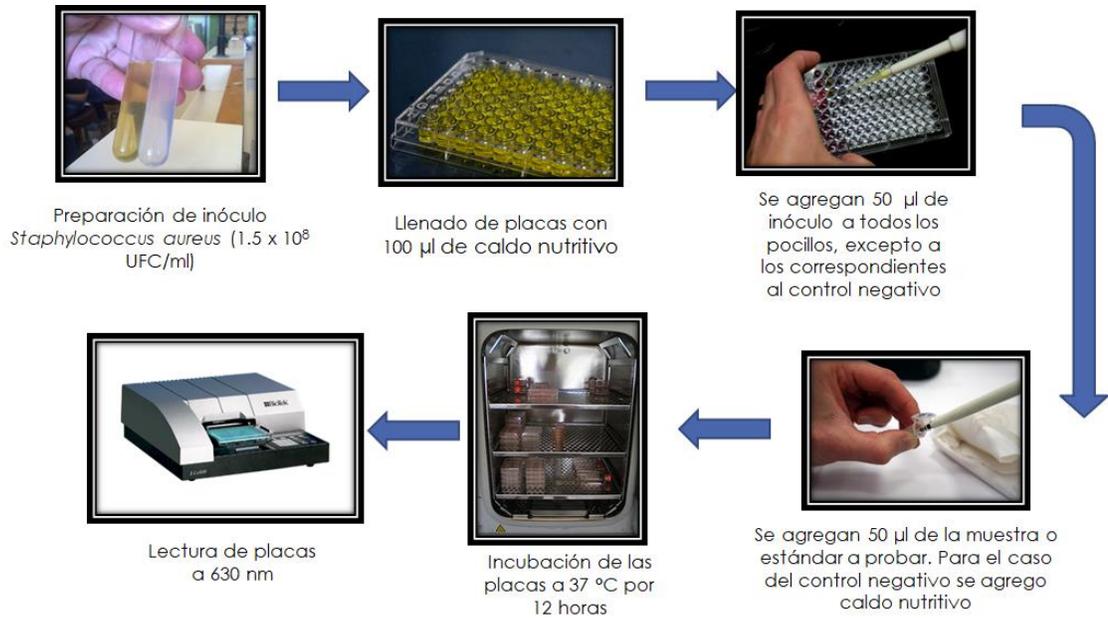


Figura 9. Metodología empleada en el ensayo microbiológico.

3.7 Síntesis alternativa de nanopartículas de sílice y su funcionalización por el método de Arriagada y col.

3.7.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa

Se sintetizaron cuatro tipos de nanopartículas de sílice: compactas (sin tensioactivo), porosas (con tensioactivo), y cada una de ellas funcionalizada con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES).

La metodología seguida para la síntesis de cada de una de las nanopartículas, se describe a continuación:

- Síntesis de nanopartículas compactas: en un matraz bola de 100 mL se mezclaron 44 mL de EtOH y 2.98 mL de H₂O con agitación magnética durante 5 minutos, donde se agregaron 1.28 mL de NH₄OH manteniendo la agitación, para posteriormente añadir 1.73 mL de TEOS gota a gota con agitación durante 3 horas. Una vez terminada la síntesis se procedió a realizar el lavado de las nanopartículas, distribuyendo el volumen procedente de la síntesis en 2 tubos falcon de 25 mL para centrifugar a 10000 rpm por 25 minutos cada uno. Después, se desechó el sobrenadante y las nanopartículas obtenidas se resuspendieron en 25 mL de agua miliq (se repitió el lavado 3 veces para cada tubo). Por último, se realizaron dos lavados con 25 mL de EtOH y, las nanopartículas obtenidas se dejaron suspendidas en 50 mL de etanol grado HPLC.
- Síntesis de nanopartículas porosas: Se pesaron 3 mg del tensioactivo (CTAB), se colocaron en un matraz bola de 100 mL, y se siguió con la metodología antes mencionada para el caso de la síntesis de nanopartículas compactas, solo que antes del lavado con EtOH, las nanopartículas obtenidas en líquido sobrenadante (agua miliq) se resuspendieron en un matraz conteniendo 3 mL de HCl, dejándolo en reflujo por toda la noche. Concluido el tiempo, se desechó el sobrenadante y las nanopartículas se lavaron con agua y etanol de la misma manera que

la síntesis de las nanopartículas compactas. Por último, se aforaron a un volumen de 50 mL con etanol grado HPLC.

- Síntesis de nanopartículas funcionalizadas compactas: el procedimiento de síntesis fue el mismo que para las nanopartículas compactas sin funcionalizar, sin embargo, después del lavado con etanol se procedió a lavar a 10000 rpm por 25 minutos con acetona grado reactivo (dos veces) y con acetona grado HPLC (una vez). Posteriormente las nanopartículas suspendidas en 5 mL de acetona grado HPLC fueron transferidas a un matraz bola, donde se agregaron 50 mL de tolueno. La solución se colocó en reflujo en baño de agua y se agregó gota a gota 800 μ L de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) con agitación por 3 horas. Una vez pasado el tiempo, las nanopartículas se resuspendieron y se centrifugaron a 10000 rpm por 25 minutos. Posteriormente se lavaron en este orden con series de: Tolueno, posteriormente otra vez con Tolueno, después dos veces con Tolueno/Acetona, continuando después con Acetona, y luego Acetona/Etanol y finalmente con Etanol. Por último, se almacenaron en etanol grado HPLC.
- Síntesis de nanopartículas funcionalizadas porosas: el procedimiento fue el mismo que para el caso de las funcionalizadas compactas, a excepción que desde al inicio se agregaron 3 mg de tensioactivo durante la síntesis.

Por último, se tomó una alícuota de 2 mL de cada tipo de nanopartícula en suspensión, para secarlas y obtener el peso de las mismas.

3.7.2 Medición del tamaño de partícula y potencial zeta

Se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el tamaño promedio de las nanopartículas, así como el potencial zeta y el índice de polidispersión de las mismas, utilizando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90. El tamaño promedio fue obtenido para los cuatro tipos de nanopartículas sin sulfato de gentamicina. El potencial zeta fue medido (con y sin sulfato de gentamicina impregnado) para el tipo de nanopartículas que logró incorporar una mayor cantidad de fármaco en base al análisis cuantitativo por HPLC, para determinar su comportamiento en agua, pH 3, pH 7.4 y pH 8.

3.7.3 Impregnación de las nanopartículas con sulfato de gentamicina

Se tomaron 20 mL de la suspensión de cada tipo de nanopartículas previamente sintetizadas; se impregnaron con una solución de Sulfato de gentamicina (20 mg en 5 mL de agua milliq). La mezcla resultante se agitó a 100 rpm por 48 horas, dejándolas en reposo por 24 horas.

3.7.4 Curva de calibración y validación del método analítico

Se preparó una solución stock de 2000 mg/L de Sulfato de gentamicina en agua milliq. En base a esta, se prepararon cinco estándares por triplicado: 50, 100, 400, 800 y 1000 mg/L, para realizar la curva de calibración correspondiente al método de cuantificación por HPLC. Así mismo, se realizó la validación del método analítico por triplicado de acuerdo con lo planteado en la sección 7.4 de la NOM-177-SSA1-2013.

3.7.5 Cuantificación de Sulfato de gentamicina incorporado en las nanopartículas por HPLC-UV

Después de la incorporación del fármaco en las nanopartículas, se distribuyó cada volumen de las nanopartículas en suspensión en 3 tubos tipo falcon (una tercera parte se guardó como referencia) y los 2 tubos restantes se centrifugaron a 10000 rpm por 35 minutos para obtener alícuotas del sobrenadante de cada tipo de nanopartícula impregnada y determinar así la concentración del fármaco residual mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); la diferencia con la cantidad de Sulfato de gentamicina añadido en un inicio, corresponde a la cantidad de antibiótico adsorbido por las nanopartículas de sílice.

La cuantificación del Sulfato de gentamicina se realizó por medio de HPLC con detección UV (HPLC Shimadzu 20A System). El método de cuantificación seguido fue el establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se realizó por HPLC en fase reversa con una columna C18 (150 x 4.6 mm). La fase móvil fue la mezcla compuesta por 70:25:5 (metanol:agua:ácido acético glacial) y 5 g de 1-heptano sulfonato sódico, previamente filtrada y desgasificada. El volumen de inyección fue de 10 μ L, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. El sistema se calibró en un rango de presión entre 50-60 BAR. Los datos obtenidos se analizaron a través del software Excel.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis de los materiales

Se obtuvieron ochos materiales sintetizados por la técnica sol-gel, de acuerdo a las condiciones establecidas en el capítulo 3 (3.1.2 y 3.1.3): Cuatro materiales fueron sintetizados con los tensioactivos Pluronic P-123 y CTAB y los restantes sin ellos.

Los materiales que fueron sintetizados con Pluronic P-123, se denominaron P1.6 y P1.8, mientras que los obtenidos con CTAB se refirieron como C1.6 y C1.8. Además, a los materiales sintetizados sin tensioactivo, se denominaron P3 1.6 y P3 1.8 para el caso del medio ácido a pH 3, mientras que para el medio básico a pH 9 se denominaron P9 1.6 y P9 1.8. Para todos los materiales se utilizó la clave 1.6 y 1.8, refiriéndose a la relación de precursor/agua que se utilizó durante la síntesis.

Para el caso de los materiales P1.6 y P1.8, el tiempo de gelificación fue de 8 y 6 días respectivamente. Los resultados muestran que a pH 3 el tiempo de gelificación es más corto, comparado con el requerido en condiciones básicas, así mismo se observa que los tensioactivos reducen el tiempo de gelificación, lo cual es mas notorio en el caso del Pluronic, que ocasiona una reducción aproximada del 50%, mientras que el efecto del CTAB es menor, resultando en una disminución promedio de 13%. Lo anterior puede explicarse, en relación al pH, ya que en medio ácido la reacción de hidrolisis se lleva a cabo más rápido

que la reacción de condensación, lo cual da como resultado que el tiempo de relación sea menor y por lo tanto las partículas se forman más rápido y con menor tamaño.

Esta condición resultó en un tiempo de gelificación corto, en comparación con los materiales sintetizados a pH básico C1.6 y C1.8, los cuales gelificaron en 35 y 30 días respectivamente, proponiendo que se favoreció principalmente la etapa de hidrólisis frente a la de condensación, resultando en tiempos de gelificación mayores, donde a pH básico los precursores se hidrolizan, por el ataque nucleofílico del anión hidroxilo (OH) sobre el sílice (Si). (Buckley y col., 1994). Por último, los materiales P3 1.6 y P3 1.8 gelificaron en 15 y 12 días respectivamente, mientras que los P9 1.6 y P9 1.8 lo hicieron en 40 y 35 días; mostrando así que la adición de un tensioactivo afecta directamente el tiempo de gelificación de la red formada.

Con respecto a los tensioactivos, la diferencia puede deberse a la acción de los mismos sobre las moléculas de alcohol producido, ya que pueden interactuar mediante fuerzas de Van der Waals en ambos casos y a través de puentes de hidrógeno y atracción ion dipolo para el Pluronic y CTAB respectivamente, ocasionando menor disponibilidad del etanol como nucleófilo, favoreciendo así la formación de grupos silanol y consecuentemente la reacción entre ellos en la condensación.

La diferencia entre las relaciones molares, donde la mayor relación TEOS/H₂O favorece la gelificación, puede explicarse por la competencia en la

condensación entre los nucleófilos silanol y etanol generados en la reacción de hidrólisis, donde el etanol retrasa la reacción y el silanol la acelera.

4.2 Caracterización de los materiales antes y después de la impregnación

4.2.1 Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD)

El análisis Termogravimétrico (ATG) está basado en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se le somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser una pérdida o una ganancia de masa, mientras que el Análisis térmico diferencial (ATD) es una técnica cualitativa que permite detectar si se dan procesos endotérmicos o exotérmicos en la muestra, indicando la temperatura a la cual se dan estos cambios energéticos.

Los análisis anteriormente descritos, se realizaron a los materiales sintetizados con tensioactivos, aún sin calcinar (fresco), como también al fármaco (Sulfato de gentamicina) empleado en este estudio.

En la curva termogravimétrica (Figura 10), del material sintetizado con Pluronic P-123, se visualiza un pico endotérmico (disminución en la temperatura) de la curva del ATD, que sucede aproximadamente a los 90°C, y corresponde a una pérdida del 3 y 7 % del peso en la curva ATG para los materiales P1.6 y P1.8, lo cual se debe a la eliminación del agua fisisorbida y solventes residuales, siendo mayor para la relación 1:8, que contiene una mayor cantidad de agua. (Zhao y col., 1998). Posteriormente, se observa un pico exotérmico a 200 °C en la curva

de ATD, el cual evidencia cambios de energía debido a la combustión de especies orgánicas, en este caso los tensioactivos utilizados, correspondiendo a una pérdida de peso de 45 y 50% para cada uno de los materiales.

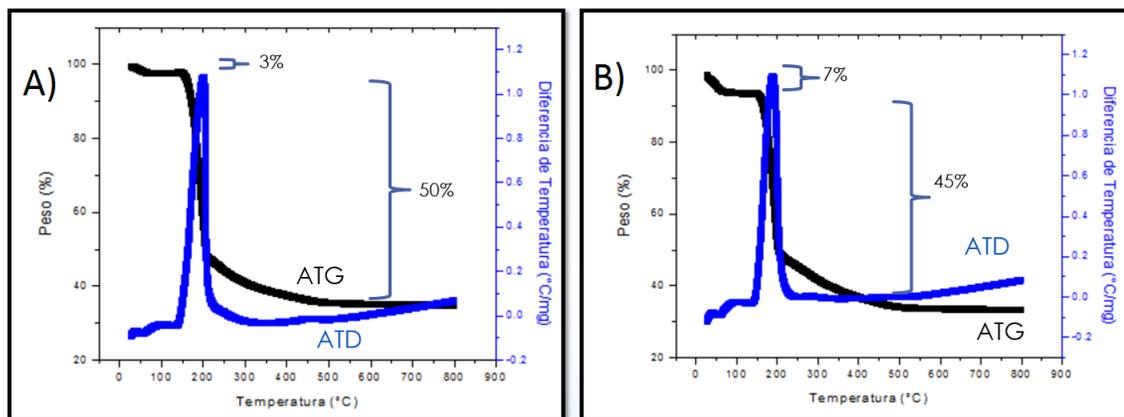


Figura 10. Termogramas de los materiales sintetizados con Pluronic P-123.
A) P1.6 B) P1.8

Los resultados de los termogramas de los materiales cerámicos sintetizados con el tensioactivo CTAB (Figura 11), muestran una primera pérdida de peso del 7% en la curva del ATG aproximadamente a los 100 °C, donde a su vez la curva de ATD a esos rangos de temperatura muestra una serie de picos endo-exotérmicos terminando con un pico endotérmico. La siguiente pérdida de peso de aproximadamente el 35% (ATG), se da a partir de los 300 °C, donde se observa un pico endotérmico seguido de uno exotérmico en la curva ATD, correspondiente a la combustión del tensioactivo y a la eliminación de agua proveniente de la reacción de condensación de los grupos silanol. Zhao y col. han reportado que estos termogramas son típicos de los sistemas mesoporosos de sílice en los cuales la primera pérdida de peso corresponde a la evaporación del agua y gases físicamente adsorbidos, la segunda pérdida es debida a la

descomposición y combustión de especies orgánicas remanentes (tensoactivo) y por último se da la eliminación de agua por condensación de grupos silanol para formar enlaces de siloxano.

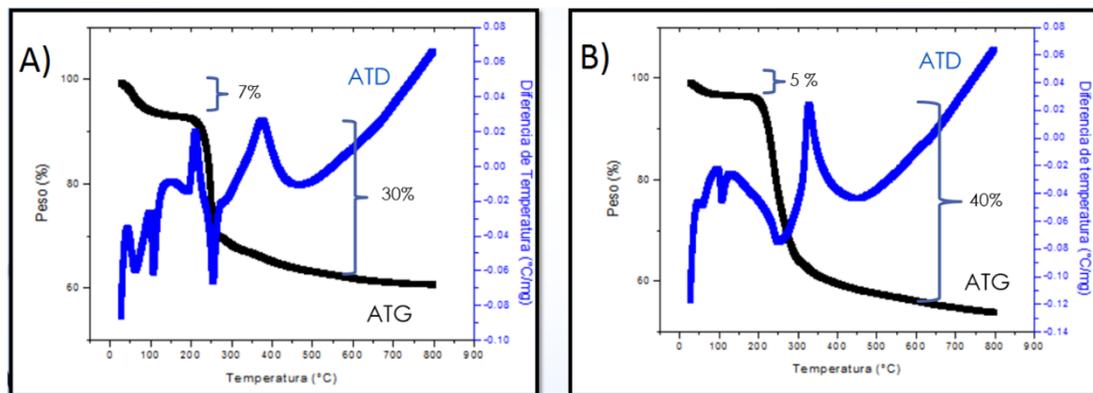


Figura 11. Termogramas de los materiales sintetizados con CTAB
A) C1.6 B) C1.8

Como parte de la caracterización del fármaco (Sulfato de gentamicina), el estudio ATG-ATD, se presenta en la Figura 12, donde se pueden observar dos picos endotérmicos en la curva de ATD a aproximadamente 100°C y 240°C. El primero corresponde a la evaporación de agua del fármaco, ya que, esta sustancia es muy higroscópica, coincidiendo así con una pérdida del 18% en la curva de ATG. El segundo pico endotérmico corresponde a la temperatura de fusión del fármaco (237 °C), ocasionando una pérdida de peso del 20%. El pico exotérmico que se presenta entre los 300-350°C en la curva de ATD, corresponde a la descomposición total del fármaco, con una pérdida del 100% del peso (ATG) a los 600 °C.

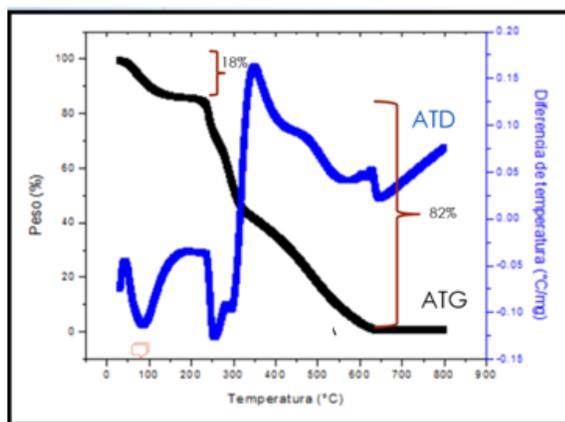


Figura 12. Termograma del Sulfato de gentamicina

4.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales de los materiales cerámicos sintetizados fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo. Las bandas observadas permitieron la caracterización de los mismos. Los espectros FTIR registrados para los materiales sintetizados con Pluronic P-123 y CTAB, se muestran en las Figuras 13 y 14 respectivamente. Para el primer caso (Figura 13), en los espectros se observan las bandas características de los enlaces del SiO₂: O-Si-O (1064 y 793 cm⁻¹) y Si-OH (939 cm⁻¹). También en el espectro del material fresco se puede observar una banda ancha a 3500-3000 cm⁻¹ y otra a 1650 cm⁻¹, las cuales están relacionadas con los grupos hidroxilo del agua adsorbida y con los grupos silanol; Zhang y col. publicaron en el año 2009 resultados similares, atribuyendo las bandas alrededor de 3400 cm⁻¹ y 1630 cm⁻¹ a los grupos silanol y al agua adsorbida. El espectro correspondiente al material calcinado a 550 °C en comparación con el del tensioactivo, muestra que desaparecen las bandas C-H de estiramiento (2900-2800 cm⁻¹) y C-H de flexión (2900-2800 cm⁻¹),

características del mismo, asegurando la remoción total del Pluronic P-123, por el tratamiento térmico que se le realizó a la muestra. Espectros similares presentan las dos relaciones de síntesis.

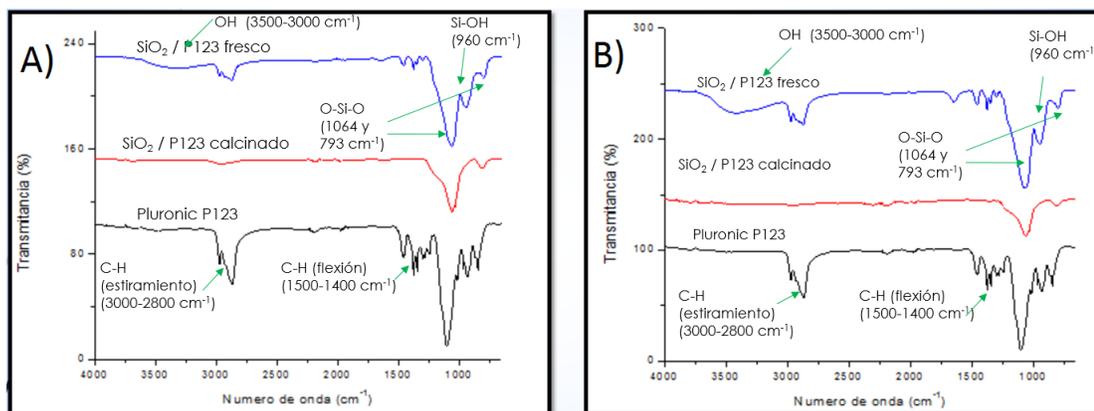


Figura 13. Espectros de FTIR de materiales sintetizados con Pluronic P-123.
A) P1.6 B) P1.8

La Figura 14 muestra los espectros obtenidos de los materiales sintetizados con el tensioactivo CTAB, bajo las dos relaciones de precursor/agua. En dichos espectros se muestran las bandas características de los enlaces del SiO₂ previamente comentadas propias de la sílice. En la comparación del material sintetizado calcinado con el espectro del CTAB puro, se puede observar como desaparecieron las bandas del tensioactivo, concluyendo que la calcinación a 550°C fue efectiva, al eliminar totalmente al CTAB. Como comentario adicional, en el espectro del CTAB, aparecen bandas principales como son: C-H de estiramiento (3000-2800 cm⁻¹) y C-H de flexión (1500-1400 cm⁻¹), además de la presentada por la vibración del enlace C-N (3000-2900 cm⁻¹) correspondiente a la cabeza de la estructura del tensioactivo catiónico. (Viana y col., 2012)

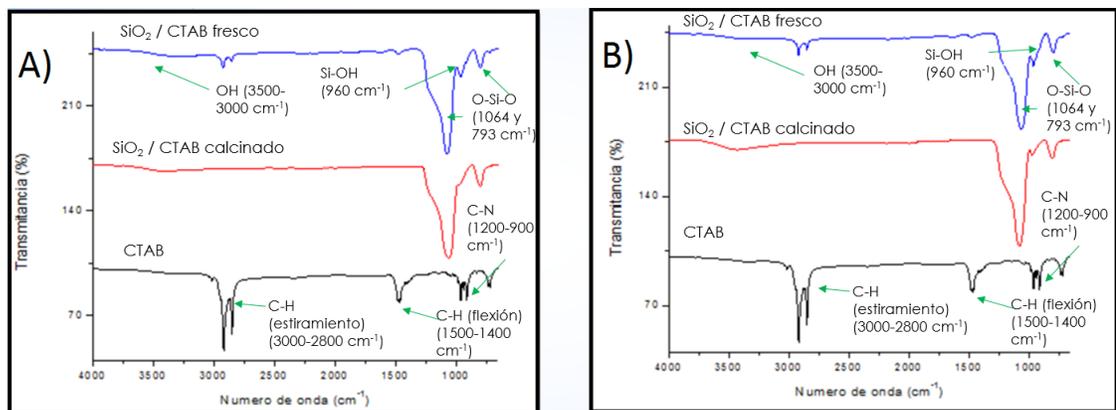


Figura 14. Espectros de FTIR de materiales sintetizados con CTAB.

A) C1.6 B) C1.8

En la Figura 15, se muestra el espectro de los materiales sintetizados con Pluronic P-123, calcinados e impregnados con Sulfato de gentamicina, además del espectro del antibiótico puro. Se puede observar que los materiales sintetizados conservan sus bandas características de los enlaces del SiO₂: O-Si-O (1064 y 793 cm⁻¹) y Si-OH (939 cm⁻¹), además muestran una banda de S-O de estiramiento (1037 cm⁻¹) característica del fármaco (Sulfato de gentamicina) correspondiente al azufre que se traslapa con las bandas de O-Si-O de la sílice. Además, también se observan las bandas correspondientes a los enlaces N-H de las aminas (1523 cm⁻¹ y 1621 cm⁻¹) presentes en el espectro del Sulfato de gentamicina puro reportadas previamente por Mcmanamon y col., en el año 2016. En los materiales sintetizados con la relación precursor/agua 1:8, dichas bandas se observan con mayor claridad.

Los espectros de los biomateriales sintetizados con el tensioactivo CTAB y el del Sulfato de gentamicina puro, se visualizan en la Figura 16, los cuales

presentan una similitud con los espectros de los sintetizados con el Pluronic P-123, lo cual se esperaba obtener, ya que ambos tensioactivos se deben eliminar durante la calcinación. La similitud incluye también ser más notoria la banda del Sulfato de gentamicina en el biomaterial de la relación 1:8 de precursor/agua.

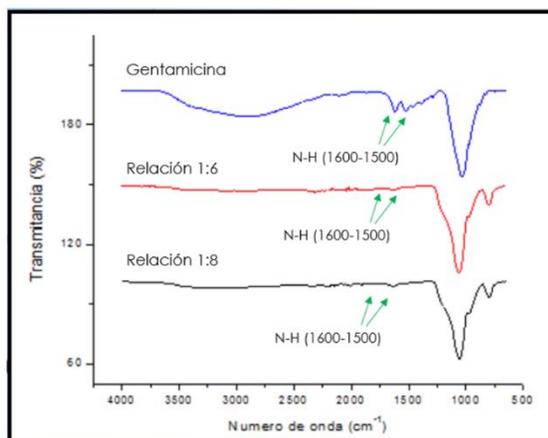


Figura 15. Espectros de FTIR de los biomateriales (fármaco impregnado) P1.6, P1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.

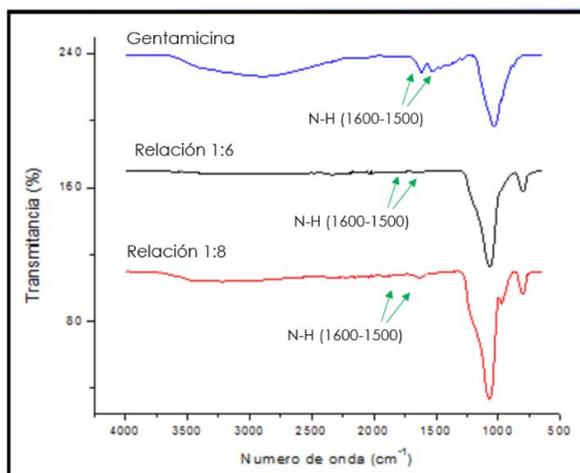


Figura 16. Espectros de FTIR de los biomateriales (fármaco impregnado) C1.6, C1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.

4.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X para los materiales sintetizados con Pluronic P-123, muestran la reflexión más intensa en el ángulo 2θ de 23° , que corresponde a la sílice (SiO_2) amorfa, lo cual coincide con lo reportado por Garnica-Romo en el año 2007. Con respecto a los difractogramas analizados, se observa que el pico de difracción del soporte sin calcinar es menos intenso que el calcinado, lo que puede ser interpretado como un bajo ordenamiento de los canales mesoporosos, prediciendo un aumento en el arreglo de los mesoporos durante la calcinación.

Además, Marín Astorga publicó en el 2004, que cuando en los espectros de Difracción de Rayos X, se observa un solo pico ancho a bajos ángulos de 2θ , tal como se observa en las Figuras 17 A y B, las isothermas de adsorción y desorción de N_2 , revelan una isoterma de tipo IV, característica de los sólidos adsorbentes mesoporosos según la clasificación BDDT (Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W.S., y Teller, E., también referenciada como clasificación Brunauer). Este punto se profundizará en el estudio de adsorción y desorción de N_2 .

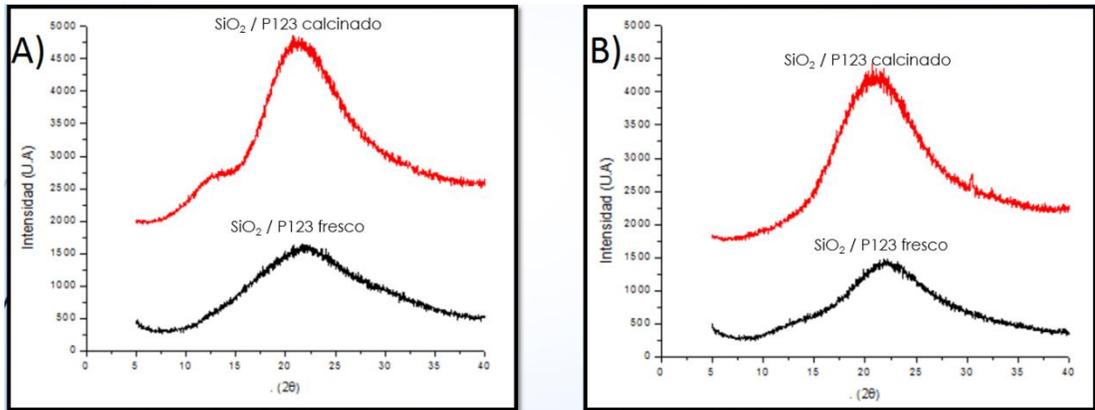


Figura 17. Patrón DRX para los materiales sintetizados con Pluronic P-123.
A) P1.6 B) P1.8

Para el caso de los materiales sintetizados con CTAB (Figura 18 A y B), los patrones de difracción de Rayos X muestran diferencias entre el material calcinado en comparación con el fresco, ya que en este último se observan las reflexiones características del CTAB, principalmente a 17° , 22° y 25° del ángulo 2θ , reportadas por Ding y col. en el año 2017. En ambos difractogramas se visualizan los picos característicos de la sílice a los 23° del ángulo 2θ .

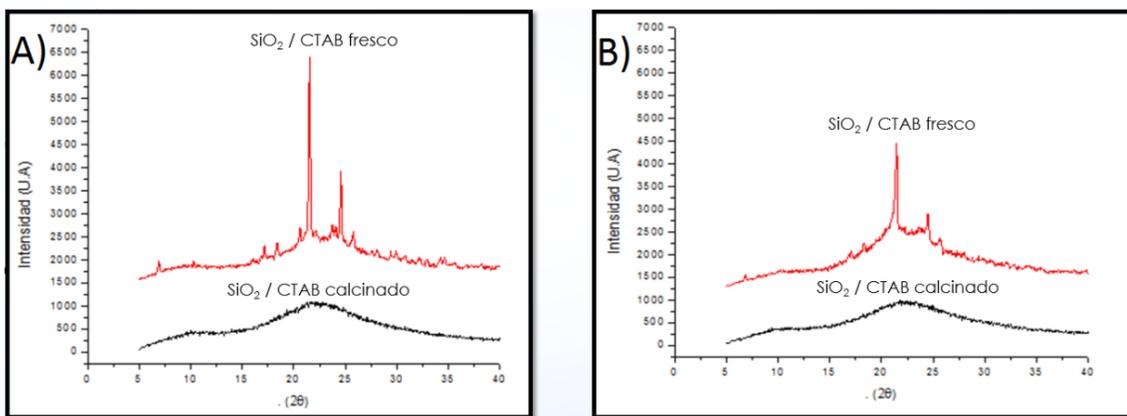


Figura 18. Patrón DRX para los materiales sintetizados con CTAB.
A) C1.6 B) C1.8

La Figura 19 muestra los difractogramas de los biomateriales cerámicos sintetizados con diferente tensioactivo, relación precursor/agua, e impregnados con Sulfato de gentamicina. Como se observa en cada difractograma, las reflexiones intensas y definidas en el ángulo 2θ de 23° correspondientes a la sílice (SiO_2), se encuentran presentes, pero además se resaltan nuevas reflexiones en aproximadamente el ángulo 2θ de 45° correspondientes, a los picos más intensos del fármaco (comparación con el difractograma de Sulfato de gentamicina), lo cual indica la presencia de este fármaco en los biomateriales.

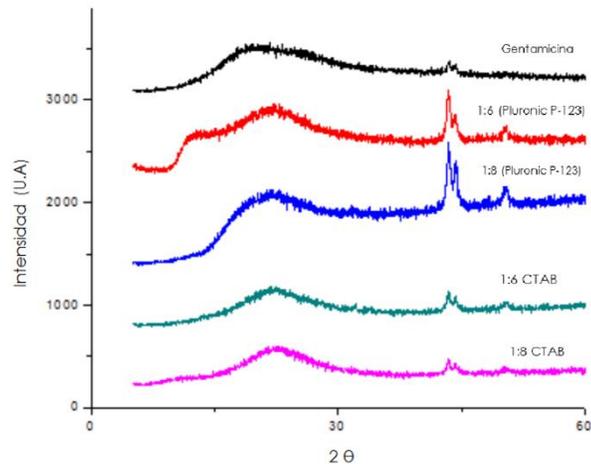


Figura 19. Patrones de DRX para los biomateriales (fármaco impregnado) P1.6, P1.8, C1.6, C1.8 y del Sulfato de gentamicina puro.

4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDX)

En la Figura 20 se presentan las micrografías para los materiales sintetizados usando Pluronic P-123, en las cuales se pueden observar partículas esféricas, presentando un rango de 240 a 480 nm en el tamaño de partícula para la relación 1:6 y de 130 a 197 nm para la 1:8. El estudio de espectroscopía de

dispersión de energía de rayos-X (EDX), determinó que la composición del material era dióxido de silicio.

Los materiales sintetizados empleando el surfactante catiónico, CTAB, presentan dominios esféricos mucho más predominantes en comparación con los sintetizados a partir de Pluronic P-123 (Figura 21). La micrografía permitió determinar que el tamaño de partícula se encontraba en el rango de 460 a 840 nm, para la relación 1:6, mientras que para la 1:8 el rango fue de 640 a 920 nm. Estos resultados indican que el uso de Pluronic P-123 favorece la formación de materiales más homogéneos con menores tamaños de partícula en comparación con el efecto presentando por el CTAB; para ambos tensioactivos el menor tamaño de partícula se obtuvo en los materiales sintetizados a la relación 1:8.

En relación con el tamaño de partícula obtenido en los materiales sintetizados con CTAB, el resultado concuerda con el estudio realizado por Vázquez y col., quienes sintetizaron partículas de sílice con CTAB, determinando que el tamaño de las partículas se encontraba en un rango entre los 600 y 800 nm, teniendo una morfología esférica, al igual que las obtenidas en el presente trabajo. Además, Vázquez y col., concluyeron que a una concentración baja del tensioactivo catiónico CTAB, se obtienen partículas esféricas con tamaños de partícula poco homogéneos, siendo esta un área de oportunidad para las siguientes investigaciones.

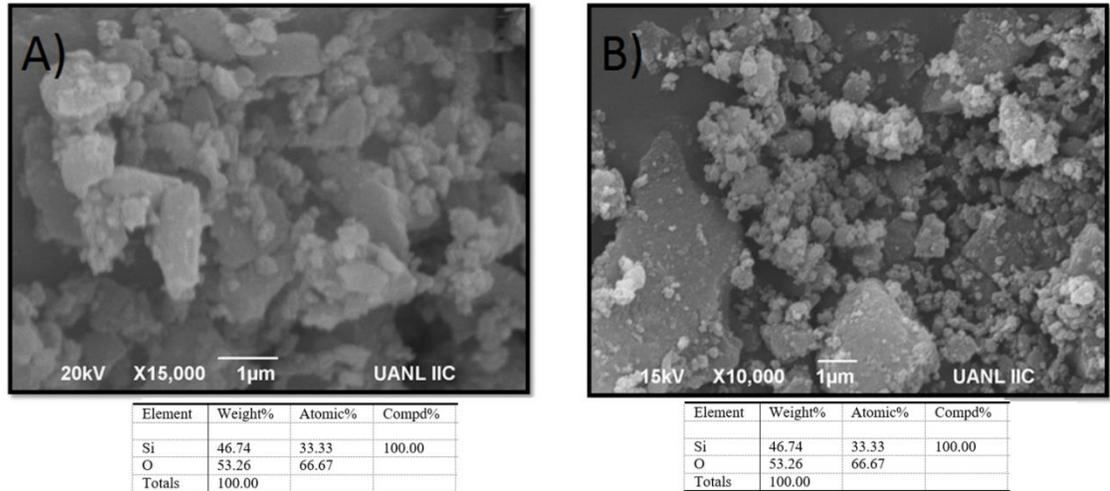


Figura 20. MEB-EDX de materiales sintetizados con Pluronic P-123.

A) P1.6 B) P1.8.

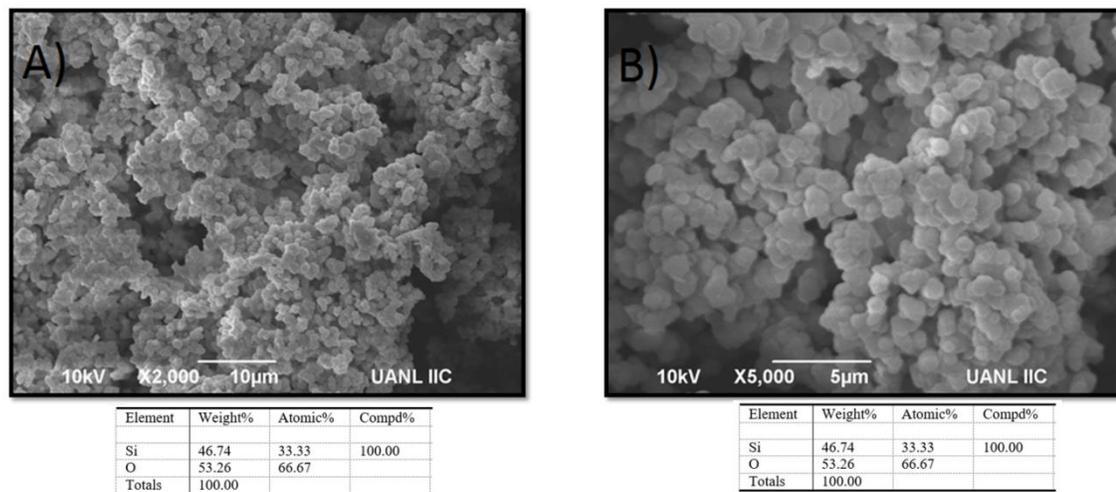


Figura 21. MEB-EDX de materiales sintetizados con CTAB.

A) C1.6 B) C1.8

El análisis de MEB-EDX, de los biomateriales (material cerámico poroso conteniendo al antibiótico), mostró que el tamaño de partícula promedio no sufrió cambios después de la impregnación tanto para los biomateriales sintetizados

con Pluronic P-123 (Figura 22) como los obtenidos con CTAB (Figura 23), sin embargo, en la tabla del análisis químico se indica la presencia de carbono y azufre en el EDX, correspondientes al Sulfato de gentamicina, lo que confirma la presencia del fármaco en los materiales.

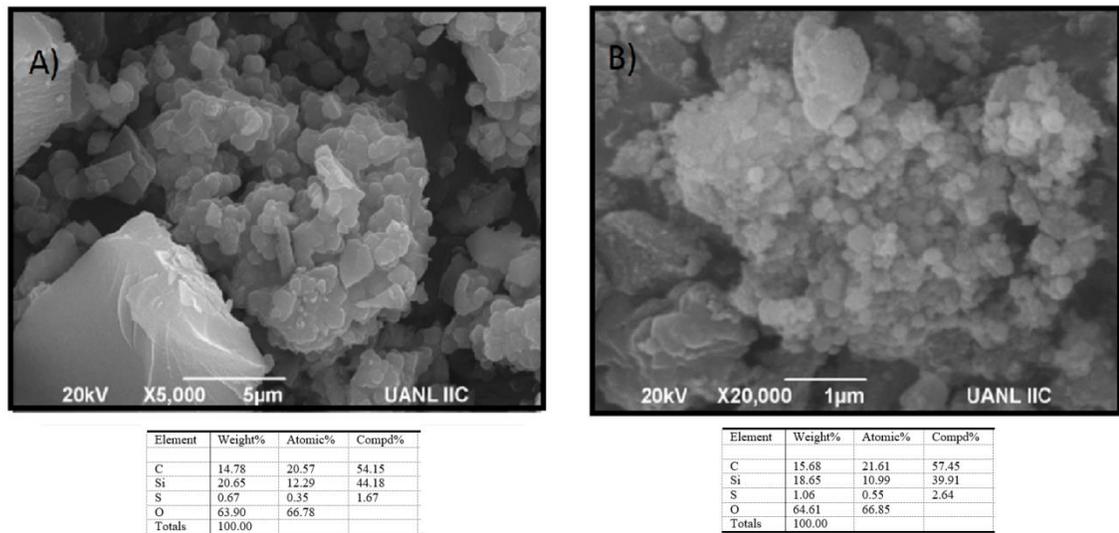


Figura 22. MEB-EDX de biomateriales (fármaco impregnado) sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8

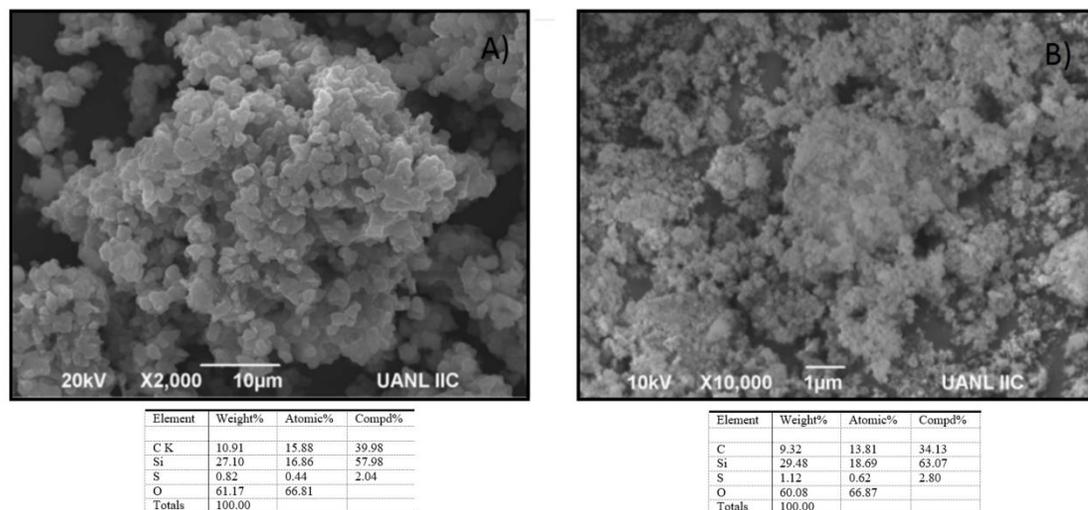


Figura 23. MEB-EDX de biomateriales (fármaco impregnado) sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8

4.2.5 Análisis textural: BET-BJH

Para clasificar los tipos de isothermas, estas son agrupadas en seis clases según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Los primeros cinco tipos de la clasificación (I a V), fueron propuestos originalmente por Brunauer S., Deming, L.S. Deming, W. S., y Teller, E. y esta clasificación es conocida como BDDT (Figura 24), también referenciada como clasificación de Brunauer. La isoterma del tipo VI se conoce como isoterma escalonada, y es una clase poco común. (Brunauer y col., 1940)

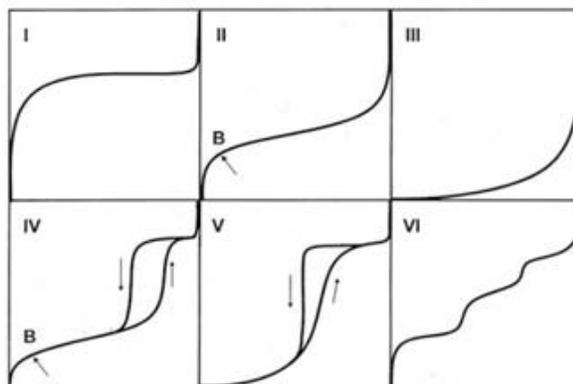


Figura 24. Los seis tipos de isothermas de adsorción (fisisorción) según la clasificación de la IUPAC

En las Figuras 25 A y B, se observan las isothermas de adsorción y desorción de N_2 de los materiales sintetizados con el tensioactivo no iónico (Pluronic P-123) empleando la relación 1:6 y 1:8, donde se revelan en ambas figuras, las características de las isothermas del tipo IV (Figura 24), indicando la formación de un sólido mesoporoso, en el que aparece un ciclo de histéresis H_1 que se debe a que el proceso de llenado de los mesoporos está gobernado por

fenómenos de condensación capilar y por las propiedades percolativas del sólido.
(Martín., 1990)

En las Figuras 26 A y B, se muestran las isothermas de los materiales sintetizados con el tensioactivo CTAB, dichos materiales presentaron isothermas de adsorción-desorción de N₂, que corresponden a las características del tipo III según la clasificación BDDT, que se caracteriza por ser convexa respecto al eje de la presión relativa (p/p_0) en todo el rango de presión y por presentar interacciones débiles entre el adsorbato y el adsorbente. (Martín., 1990)

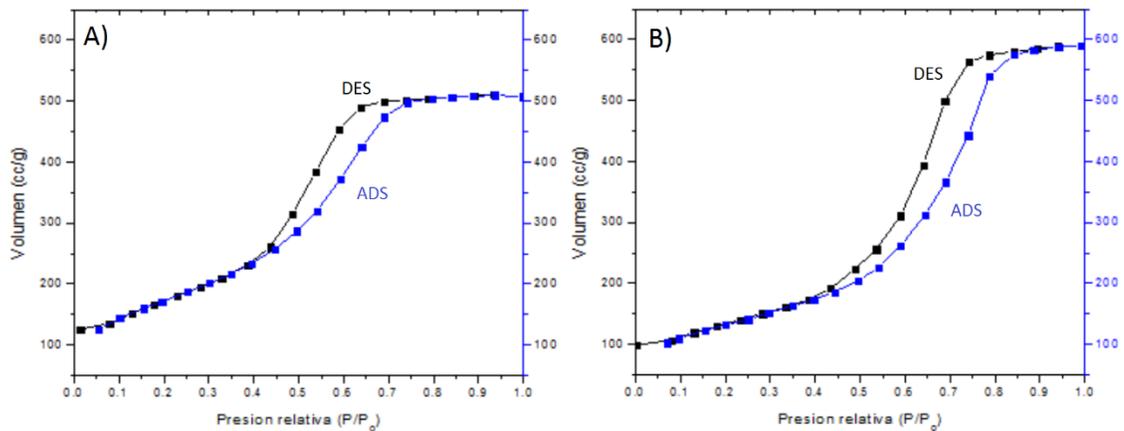


Figura 25. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de biomateriales sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8

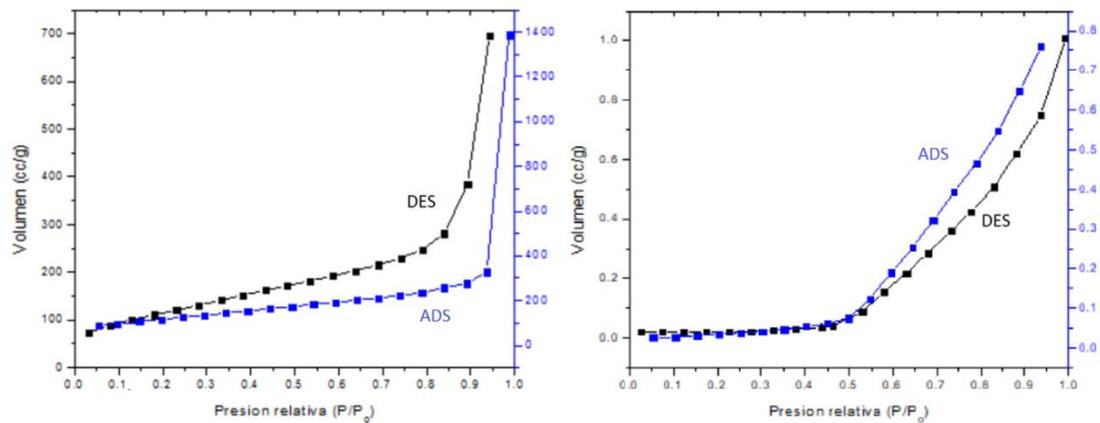


Figura 26. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de biomateriales sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8

Las isothermas adsorción-desorción de N₂ de los materiales sintetizados en ausencia de tensioactivo (Figura 27), muestran un comportamiento variable tipo I y II a pH 3 para las proporciones 1:6 y 1:8 respectivamente. Para los materiales obtenidos a pH 9 (Figura 28), el tipo de isoterma, en ambas proporciones de precursor/agua, corresponde al tipo III.

Lo anterior indica que el Pluronic P-123, ocasiona un aumento en la homogeneidad del material conduciendo a isothermas tipo IV, características de sólidos mesoporosos. Este efecto no se observa con el uso del CTAB, ya que el tipo de isoterma se conserva en presencia o ausencia del tensioactivo, atribuyendo las características del biomaterial al pH de la síntesis.

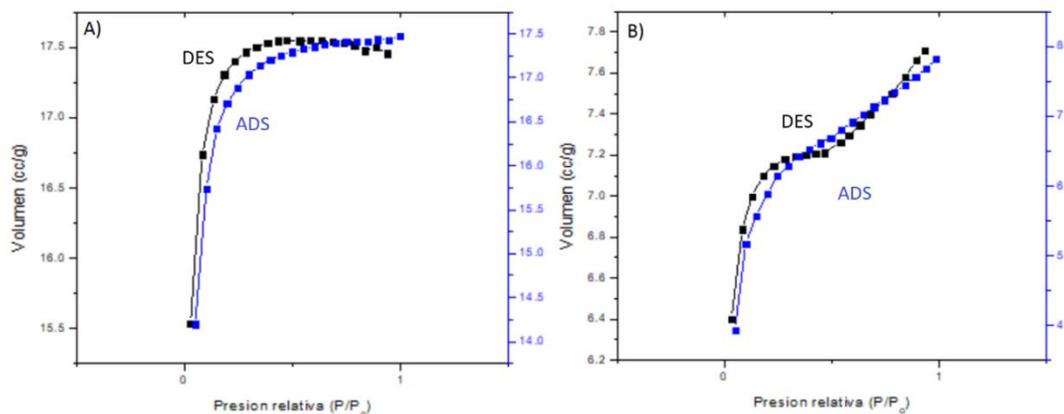


Figura 27. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de biomateriales con Pluronic P-123. A) P3 1.6 B) P3 1.8

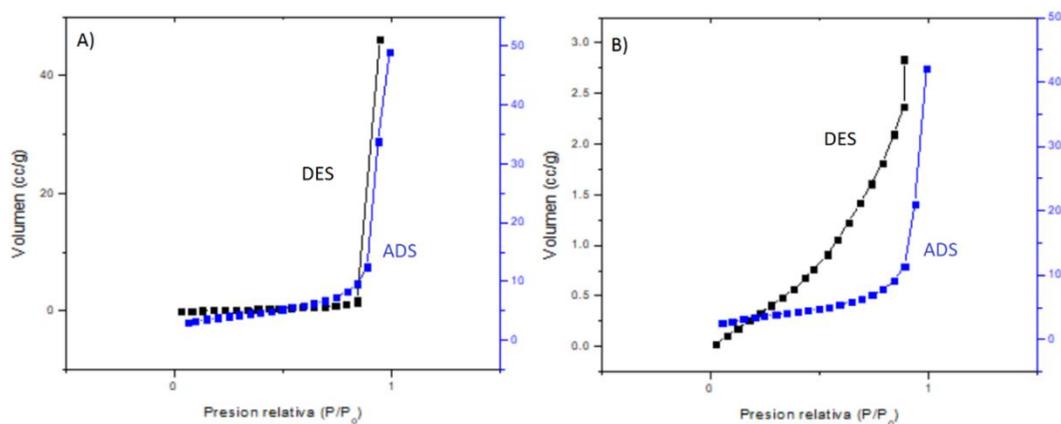


Figura 28. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de biomateriales sintetizados con CTAB. A) C9 1.6 B) C9 1.8

En la Figura 29 se pueden observar las isothermas de adsorción-desorción para el caso de los biomateriales P1.6 y P1.8 conteniendo el fármaco (después de la impregnación), conservando la forma del tipo IV. Para los materiales sintetizados con CTAB, impregnados con Sulfato de gentamicina (Figura 30),

presentaron una isoterma de tipo III al igual que el que se presenta en los biomateriales antes de la incorporación del fármaco.

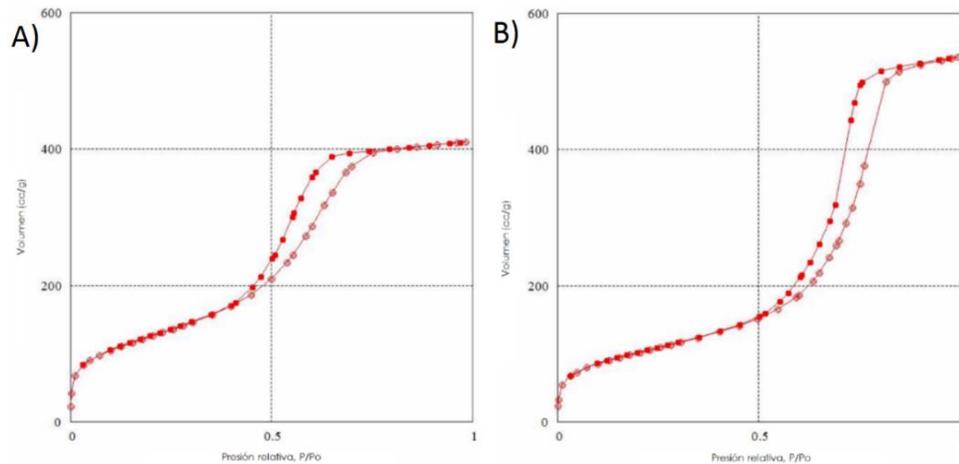


Figura 29. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de biomateriales con Sulfato de gentamicina sintetizados con Pluronic P-123. A) P1.6 B) P1.8

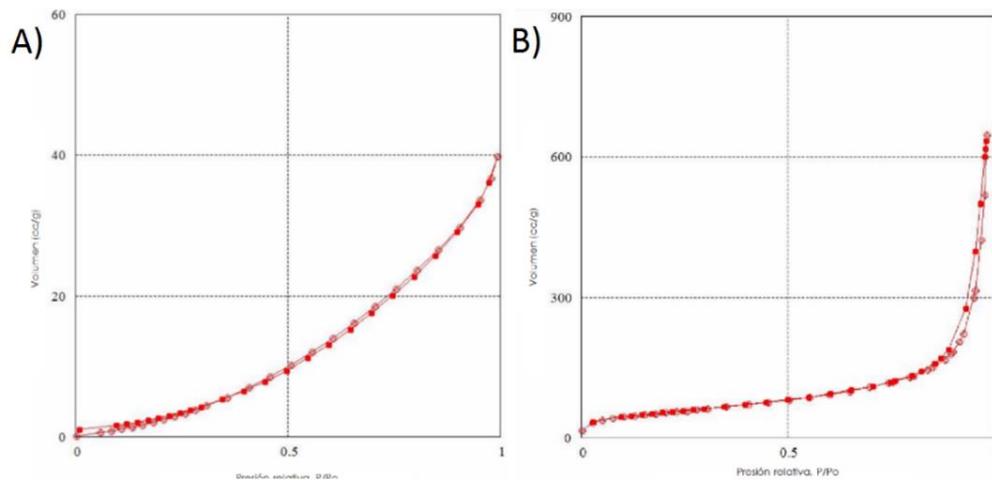


Figura 30. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de biomateriales con Sulfato de gentamicina sintetizados con CTAB. A) C1.6 B) C1.8.

A partir de los datos obtenidos de las isothermas se calcularon los valores de área superficial específica, empleando el método BET (Brunauer-Emmet-

Teller), así mismo, se calculó la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda). (Curia, 2010).

Los valores del área superficial, volumen de poro y diámetro promedio de poro se presentan en la Tabla 6; donde puede observarse en general que los materiales sintetizados en presencia de tensioactivo presentan mayores parámetros. Comparando el efecto de los tensioactivos el Pluronic P-123 aporta mayor área superficial mientras que el CTAB proporciona mayor volumen y diámetro promedio de poro. La relación 1:6 presenta mayor área superficial cuando la síntesis se realiza a pH ácido, por el contrario, es la relación 1:8 la que presenta mayor área superficial cuando la síntesis se llevó a cabo a pH básico. Lo anterior coincide con lo reportado por Faustova y col. en el año 2016, donde a pH ácido se forman polímeros de SiO₂ lineales con una alta área superficial y tamaños de poro pequeños, mientras que en pH básico la tasa de la reacción de policondensación puede exceder a las reacciones de hidrólisis, dando lugar a partículas de mayor tamaño y una baja área superficial. Además, Doadrio y col., obtuvieron volúmenes de poro cercanos a 1 cc/g para materiales sintetizados con Pluronic P-123, los cuales coinciden con los resultados obtenidos.

Tabla 6. Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de los materiales.

Tensioactivo	Material	Área Superficial S_{Bet} , m ² /g	Volumen total de poro V_p , cc/g	Diámetro promedio de poro d_p , nm
Pluronic P-123	P1.6	631.02	0.78	4.97
	P1.8	478.03	0.91	7.62
CTAB	C1.6	193.77	1	20.02
	C1.8	425.19	2.14	20.661
Sin tensioactivo	P3 1.6	239.49	0.001	1.03
	P3 1.8	120.288	0.008	1.2
	P9 1.6	171.699	1.18	11.15
	P9 1.8	218.835	1.20	10.83

El análisis BET y el BJH permitió obtener los resultados del área superficial, volumen total de poro y diámetro del poro de los materiales conteniendo el fármaco (Tabla 7), mostrando una disminución del volumen total de poro debido a la ocupación de los espacios del material por el Sulfato de gentamicina.

Tabla 7. Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de los biomateriales conteniendo Sulfato de gentamicina.

Biomaterial	Área Superficial S_{Bet} , m ² /g	Volumen total de poro V_p , cc/g	Diámetro promedio de poro d_p , nm
P1.6	456.51	0.64	5.56
P1.8	364.48	0.83	9.10
C1.6	53.16	0.06	4.56
C1.8	24.01	0.01	2.19

4.3 Determinación de Sulfato de gentamicina mediante la reacción colorimétrica con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.

4.3.1 Curva de Calibración y validación del método analítico

La curva de calibración para la cuantificación del Sulfato de gentamicina se realizó con nueve estándares de acuerdo a la sección de la metodología 3.3.1. La Tabla 8 muestra los resultados de la lectura de absorbancia de los estándares utilizados. En la Figura 32, se muestra la curva de calibración. Los resultados de la validación del método se presentan en la Tabla 9.

El color que se obtiene de la reacción entre el Sulfato de gentamicina y la ninhidrina, al formarse el complejo conocido como púrpura de Ruthermann se muestra en la Figura 31.

Tabla 8. Concentraciones y valores de absorbancia de la cuantificación de gentamicina por UV-Vis

Concentración (mg/L)	Absorbancia (400 nm)
10	0.0305
30	0.0721
60	0.143
90	0.2082
120	0.2592
150	0.3238
200	0.4979
260	0.5841
300	0.6743



Figura 31. Púrpura de Ruthemann obtenido después de la reacción colorimétrica entre la ninhidrina y el Sulfato de gentamicina (estándar de 100 $\mu\text{g/mL}$).

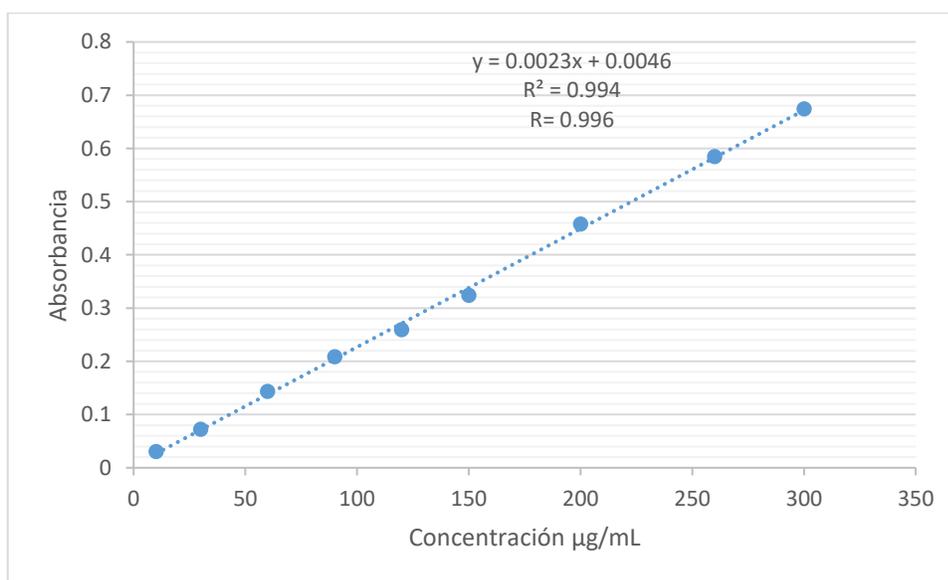


Figura 32. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación del Sulfato de gentamicina con ninhidrina por UV-Vis a una longitud de onda de 400 nm.

Se determinó la linealidad del método analítico, donde se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.996 y presentó una linealidad en un rango de trabajo de 16.9 – 300 mg/L; el límite de cuantificación encontrado fue 16.9 mg/L, mientras que el límite de detección fue de 8.9 mg/L.

Tabla 9. Parámetros generales de la validación del método colorimétrico con ninhidrina

Rango de linealidad	16.9 – 300 mg/L
Ecuación de la recta	$Y = 0.002x + 0.004$
Coefficiente de correlación	0.996
Porcentaje de Error	3.5%
Límite de detección	8.9 mg/L
Límite de cuantificación	16.9 mg/L

4.4 Pruebas de Extracción

Los resultados de las pruebas de extracción del Sulfato de gentamicina a partir de los cuatro biomateriales sintetizados con su respectivo tensioactivo y diferente relación TEOS/agua se muestran en la Tabla 10. Y Figura 33. La metodología seguida fue la presentada en la sección 3.4. Los datos de la extracción se expresan en función del % liberado de Sulfato de gentamicina en el buffer de fosfatos, donde el 100% corresponde a una concentración máxima de 200 mg/L que proviene de los 10 mg de Sulfato de gentamicina impregnados (al 20%) en los 50 mg de cada biomaterial colocado en matraces conteniendo un volumen de 50 mL del medio.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el biomaterial que más fármaco libera, es aquel sintetizado con el tensioactivo CTAB en una relación de precursor/agua 1:8. Lo anterior se puede sustentar en el hecho de que este biomaterial resultó poseer el diámetro y volumen de poro más grandes, lo cual favorece la extracción de una mayor proporción del fármaco en comparación con los otros materiales, que al tener un menor diámetro de poro, mantienen retenido el fármaco en la red polimérica por más tiempo. Los biomateriales muestran que

son capaces de liberar entre el 21 y 23.5 % del fármaco en un periodo de 24 horas.

Tabla 10. Porcentaje de Sulfato de gentamicina extraído partir de la extracción a 100 rpm

Biomaterial	% Fármaco disuelto
P1.6	21
P1.8	22
C1.6	22.5
C1.8	23.5

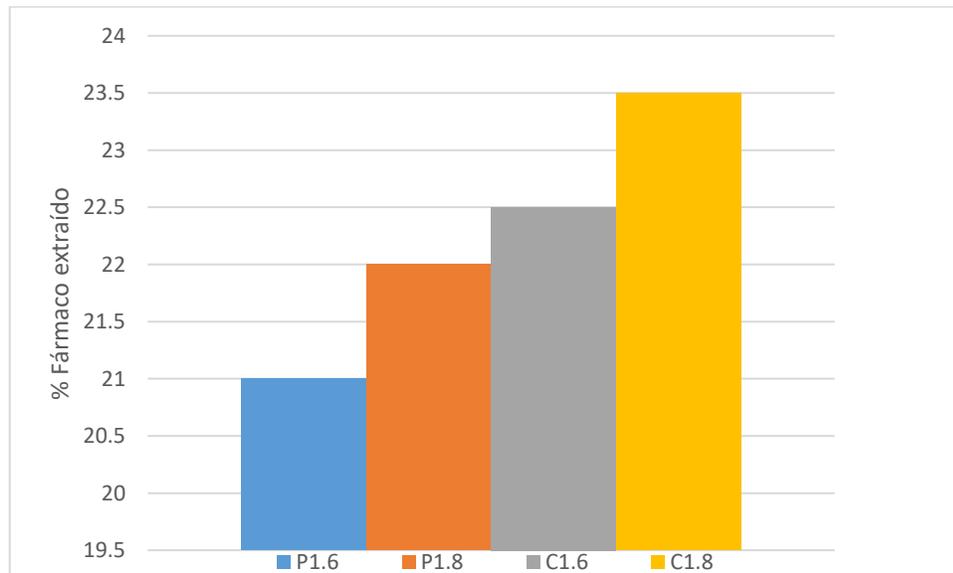


Figura 33. Pruebas de extracción de Sulfato de gentamicina a las 24 horas

4.5 Pruebas de liberación *in vitro* en un sistema estático, utilizando como medio una solución de buffer de fosfatos a pH 7.1

Las pruebas de liberación *in vitro* fueron realizadas en un sistema estático, utilizando como medio una solución de buffer de fosfatos a pH 7.1, adaptando el modelo de perfil de disolución y considerando la posible aplicación de los

biomateriales en el desarrollo de implantes. De esta prueba se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 11, la relación de su comportamiento se presenta en la Figura 35. Los experimentos se realizaron por triplicado, tal y como se muestra en la Figura 34.

Los resultados muestran como el biomaterial que liberó una mayor cantidad de fármaco, fue el sintetizado con CTAB con una relación de precursor/agua 1:8, liberando 71.7% en un periodo de 24 horas, lo cual coincide con las pruebas de extracción y los tamaños y volúmenes de poro. Los materiales sintetizados con Pluronic P-123, también mantienen la concentración del fármaco constante en el medio de disolución a partir de las 24 horas, donde la cantidad máxima liberada es de 27.5%. Lo anterior coincide con la prueba de adsorción y desorción de N₂, donde presenta una isoterma de tipo IV, lo cual es característico de un material con estructuras porosas, además de canales cilíndricos ordenados y definidos, por lo cual permite que el fármaco alojado en los poros pueda liberarse del material cerámico.

Si bien los materiales C1.6 y C1.8 impregnados con el Sulfato de gentamicina fueron los que lograron liberar una mayor cantidad de fármaco en el medio (66.9 y 71.7%), no mostraron un comportamiento de liberación prolongada.

Vallet-Regi y col. indicaron que las matrices cerámicas pueden ser ordenadas o desordenadas; si la distribución de poros de la matriz cerámica es ordenada, la adsorción y liberación del fármaco será mayormente homogénea. En este estudio se observó que los biomateriales donde se empleó el tensioactivo CTAB, correspondieron a un arreglo que no favorecía la liberación constante del

fármaco; estudios realizados por Marín Astorga en el 2004, proponen que para alcanzar matrices cerámicas ordenadas y porosas empleando tensioactivos catiónicos, ya sea con arreglo hexagonal o cúbico, es indispensable obtener primeramente la concentración crítica de micelación y finalmente acortar los tiempos de envejecimiento, demostrando que estos factores son determinantes en las propiedades texturales de los biomateriales.

Tabla 11. Porcentaje de fármaco liberado en las pruebas de liberación *in vitro* en un sistema estático

Biomaterial	% Fármaco liberado							
	1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
P1.6	7.8	17.6	26.3	27.3	27.6	27.3	27.3	27.5
P1.8	11.5	16.5	22.0	27.4	26.8	26.9	26.3	26.5
C1.6	21.3	53.8	60.8	66.9	65.8	65.5	64.3	63.43
C1.8	21.4	42.3	71.7	67.5	66.5	63.4	62.1	61.2



Figura 34. Estudios de liberación *in vitro* en un sistema estático realizado por triplicado

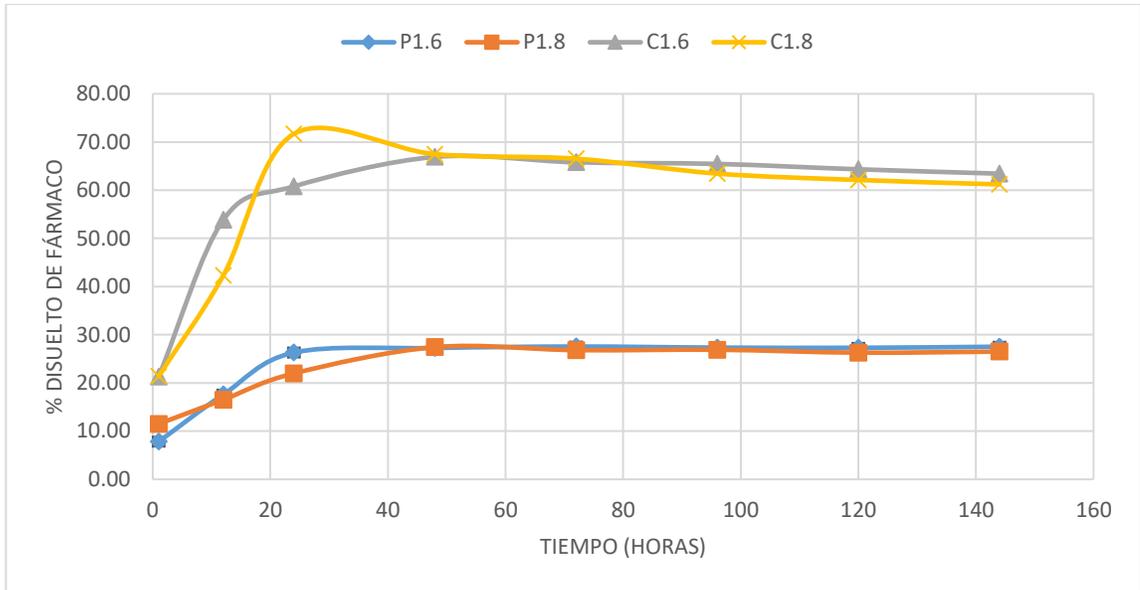


Figura 35. Gráfica de la cinética de liberación *in vitro* del Sulfato de gentamicina

4.6 Determinación de la liberación del Sulfato de gentamicina de los biomateriales a través de la prueba de actividad antibacteriana

Con el fin de determinar la actividad del Sulfato de gentamicina liberado y por consiguiente su estabilidad durante la síntesis de los biomateriales, se realizó una prueba microbiológica en placa de 96 pocillos donde se colocó una alícuota de los diferentes tiempos de muestreo de las pruebas de liberación en un inóculo de *S. aureus*. Los resultados obtenidos a partir del ensayo microbiológico empleando placas estériles de 96 pocillos se muestran a en la Tabla 12 y la representación gráfica de la liberación del antibiótico por la técnica microbiológica se observa en la Figura 36.

Los resultados microbiológicos muestran una similitud en el comportamiento de las pruebas de liberación *in vitro* empleando el método

estático. En la gráfica del efecto antibacteriano sobre las cepas de *S. aureus* (Figura 36), se observa el material P1.6, logró llegar al rango de inhibición del crecimiento del *S. aureus* (del 26 al 28%) en un menor tiempo que el P1.8, lo cual demuestra que el Sulfato de gentamicina sigue activo después de la impregnación en los materiales.

Al igual que lo demostrado en las pruebas de liberación *in vitro*, los materiales que lograron liberar un mayor porcentaje de fármaco fueron aquellos sintetizados con CTAB, sin embargo, la concentración del fármaco no se conserva constante, debido al efecto de dilución por muestreo. La unión de todos los resultados obtenidos en este estudio permite establecer que el material sintetizados con el tensioactivo no iónico es capaz de formar una matriz con poros más homogéneos y a escala de mesoporos. En la Figura 37 se muestran ejemplos de las placas utilizadas durante el ensayo microbiológico.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la cepa *S. aureus* por parte de los biomateriales sintetizados

Biomaterial	% Fármaco disuelto			
	1 h	12 h	24 h	48 h
P1.6	7.5	15.0	26.3	26.3
P1.8	11.3	15.0	18.8	27.1
C1.6	18.8	37.6	45.1	45.1
C1.8	22.6	30.1	52.6	45.1

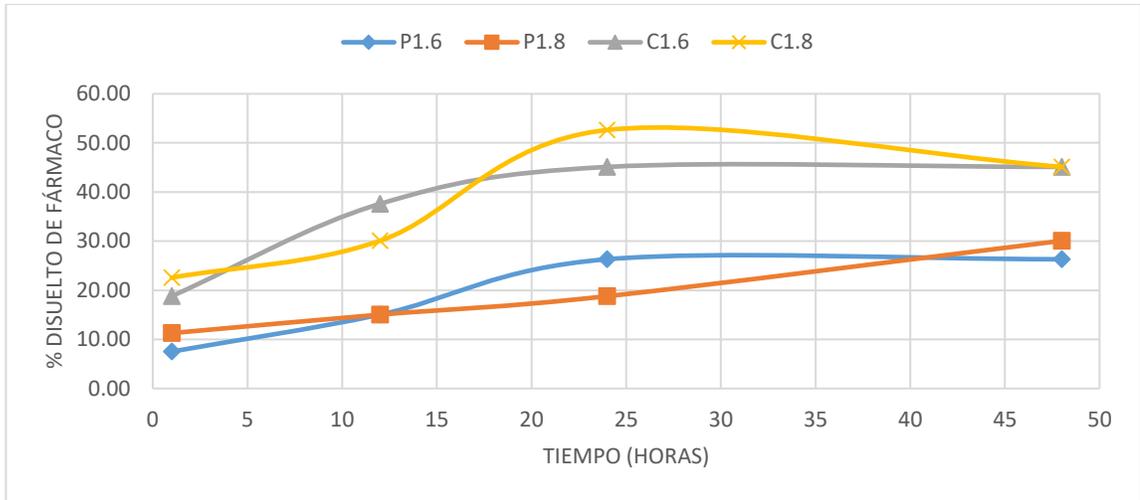


Figura 36. Cinética de liberación obtenida a partir del ensayo microbiológico



Figura 37. Fotografías de las placas de 96 pocillos conteniendo el caldo nutritivo, la muestra o estándar y el inóculo de *S. aureus*.

4.6 Síntesis alternativa de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización

4.6.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.

Se obtuvieron cuatro tipos de nanopartículas: compactas (sin tensioactivo), porosas (con tensioactivo), y las correspondientes funcionalizadas con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). Los resultados de la cantidad de nanopartículas obtenidas para cada tipo se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Cantidad de nanopartículas obtenidas

Tipo de nanopartícula	Cantidad (mg)
Compactas	280
Porosas	250
Funcionalizadas compactas	400
Funcionalizadas porosas	320

4.6.2 Medición del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas

Se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el tamaño promedio y potencial zeta de las nanopartículas. En la Tabla 14 se muestran los tamaños promedios de partícula para los cuatro tipos de nanopartículas, además de la determinación del índice de polidispersión (PDI). Así mismo, en la Tabla 15, se muestran los resultados de potencial zeta en diferentes medios para el caso de las nanopartículas que lograron incorporar una mayor cantidad de fármaco.

Tabla 14. Tamaños de partícula promedio obtenidos para los 4 tipos de nanopartículas

Tipo de nanopartícula	Tamaño (nm)	PDI
Compactas	88.21 ± 30.55	0.188 ± 0.017
Porosas	129.3 ± 44.62	0.143 ± 0.001
Funcionalizadas compactas	455.2 ± 67.04	0.551 ± 0.211
Funcionalizadas porosas	485.6 ± 99.55	0.380 ± 0.112

Tabla 15. Potencial zeta obtenido para nanopartículas porosas (sin y con Sulfato de gentamicina)

Tipo de nanopartícula	Agua	pH 3	pH 7.4	pH 8
Porosas	24.6 ± 0.850	56.7 ± 1.17	-15.6 ± 2.72	-20.8 ± 0.451
Porosas con Sulfato de Gentamicina	29.8 ± 0.513	59 ± 1.07	-12.4 ± 1.207	-17.3 ± 1.14

En base a los resultados obtenidos del tamaño de partícula promedio, se muestra que los tamaños de las nanopartículas funcionalizadas es mayor en comparación con aquellas que no lo están, lo cual se debe a la presencia del agente funcionalizante en la superficie de las nanopartículas. Los índices de polidispersidad (PDI) indican que para todos los casos a excepción de las nanopartículas funcionalizadas compactas, se presenta una distribución polidispersa del tamaño de partícula promedio obtenido.

Por otro lado, se determinó el potencial zeta para las nanopartículas porosas con y sin tensioactivo, ya que estas fueron las que incorporaron más cantidad de fármaco, lo cual se profundizará más adelante en la sección 4.6.4.

En este caso, la carga del potencial zeta que presentan las nanopartículas, depende del balance entre los grupos ionizados presentes en la superficie, donde las nanopartículas porosas presentan un valor positivo de potencial zeta en agua y a pH 3, mientras que a pH 7.4 y 8 muestran valores negativos. Vazquez y cols en el 2017, publicaron que las suspensiones que exhiben valores de potencial zeta fuera del rango de +30 o -30 mV se consideran como suspensiones electrostáticamente estables, bajo este criterio, las nanopartículas sintetizadas a pH 3, serían las más estables en comparación a las otras nanopartículas sintetizadas.

El valor de potencial zeta obtenido se puede deber a que dichas nanopartículas exhiben grupos hidroxilo en la superficie, los cuales no están ionizados a valores de pH casi neutro, mientras que, por su carácter ácido, estos se desprotonan a pH 7.4 Y 8, dando como resultado un valor de potencial zeta negativo. Así mismo, para el caso de las nanopartículas con Sulfato de gentamicina, los grupos amino del fármaco se protonan a pH ácido, por lo cual la incorporación del fármaco reduce el número de cargas negativas. (Perni y col., 2017)

4.6.3 Cuantificación de Sulfato de gentamicina incorporado en las nanopartículas por HPLC-UV

Se encontró que la longitud de onda de máxima absorción era 330 nm, corroborando así lo establecido en el método para Valoración MGA 0241 de Sulfato de gentamicina establecido en la FEUM. En la Figura 38 se muestra el cromatograma para un estándar de 1000 mg/L, donde se observan los cuatro

picos característicos del Sulfato de gentamicina, correspondientes a la mezcla de sus componentes (C1, C1a, C2a y C2) obtenidos a partir de la solución stock preparada. Los tiempos de retención obtenidos se muestran en la Tabla 16.

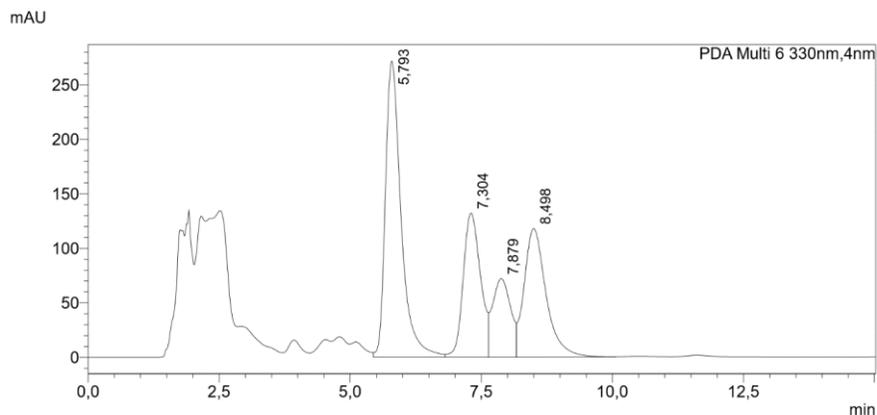


Figura 38. Cromatograma de Sulfato de gentamicina (estándar 1000 mg/L)

Tabla 16. Tiempos de retención obtenidos para los componentes del Sulfato de Gentamicina

	Tiempo de retención (min)
Gentamicina C1	5.79
Gentamicina C1a	7.30
Gentamicina C2a	7.87
Gentamicina C2	8.49

La curva de calibración que se obtuvo a partir de los estándares preparados por triplicado se muestra en la Figura 39. Así mismo a partir de estos datos, se realizó la validación del método, obteniendo de esta manera el análisis estadístico mostrado en la Tabla 17. En la validación del método analítico, se obtuvo una linealidad en un rango de trabajo de 98.4 – 1000 mg/L; el límite de

cuantificación encontrado fue 50.9 mg/L, mientras que el límite de detección fue de 98.4 mg/L.

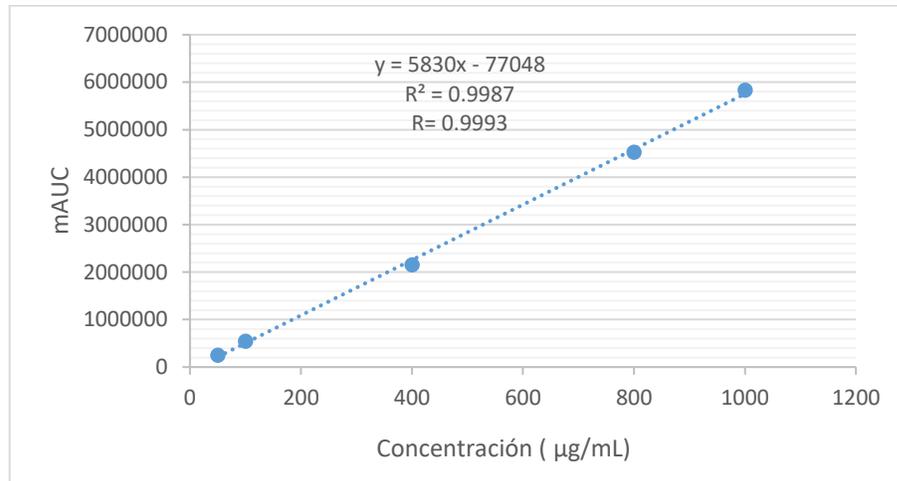


Figura 39. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación del Sulfato de gentamicina por medio de HPLC.

Tabla 17. Datos estadísticos de la validación del método para la cuantificación de Sulfato de gentamicina por HPLC.

Rango de linealidad	98.4 – 1000 mg/L
Ecuación de la recta	Y= 5830x -77048
Coefficiente de correlación	0.9993
Porcentaje de Error	3.3%
Límite de detección	50.9 mg/L
Límite de cuantificación	98.4 mg/L

4.6.4 Determinación de la cantidad incorporada de sulfato de gentamicina en las nanopartículas

En base a la validación del método antes descrita, se cuantificó la cantidad de Sulfato de gentamicina que se logró incorporar en cada tipo de nanopartícula. Esto se llevó a cabo como se indicó en la sección 3.7.5 mediante la cuantificación de fármaco residual, donde se realizaron los ajustes para expresarse en mg de fármaco unido (partiendo de una cantidad de 20 mg del antibiótico) a 100 mg de nanopartículas.

En la Tabla 18 se muestra que las nanopartículas que lograron incorporar más cantidad de fármaco fueron las sintetizadas con el tensioactivo y sin funcionalizar (11.43 mg en 100 mg de nanopartículas), lo cual se puede adjudicar a que al utilizarse un tensoactivo, se tiende a formar una estructura porosa ordenada (mesoporos), lo cual permite un mejor alojamiento del fármaco. Se observa también que la funcionalización no favoreció la incorporación del fármaco, lo cual puede deberse a la ionización de los grupos amino de la gentamicina y el efecto repulsivo de los grupos amonio del APTES sobre ellos, lo cual reduce la posibilidad de interacción mediante otro tipo de fuerzas de atracción, como ion-dipolo entre el amonio del APTES y los oxígenos del fármaco o de tipo Van der Waals entre las porciones hidrocarbonadas de las moléculas.

Tabla 18. Cantidad de Sulfato de gentamicina incorporado en las nanopartículas

Tipo de nanopartícula	Miligramos de sulfato de gentamicina incorporados	Miligramos de sulfato de gentamicina no incorporados
Compactas	10.43	9.57
Porosas	11.46	8.54
Funcionalizadas compactas	9.76	10.23
Funcionalizadas porosas	10.81	9.18

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En base a los resultados previamente presentados, se tienen las siguientes conclusiones:

Empleando la técnica sol-gel, se lograron sintetizar y caracterizar materiales cerámicos de SiO₂, en forma de polvos con características para incorporar el sulfato de gentamicina, para el posible uso en terapias dirigidas logrando evitar las desventajas del empleo de las formas de administración tradicionales.

El proceso de sol-gel es una técnica flexible que permite obtener materiales con diferentes propiedades texturales, en función de las condiciones de síntesis en las que se lleva a cabo. En este proyecto se varió la relación de precursor/agua, pH, uso de tensioactivos y funcionalización de los poros. En este caso, al variar la relación de precursor/agua, el empleo de una relación 1:8 (TEOS/H₂O), permitió la formación del xerogel en menor tiempo en comparación con la relación 1:6 (TEOS/H₂O), concluyendo que este factor es determinante para la gelificación, donde a mayor relación TEOS/H₂O el tiempo de gelificación es menor.

Los materiales fueron sintetizados con Pluronic P-123 a pH ácido y CTAB a pH básico, a dos relaciones de precursor/agua (1:6 y 1:8). Los materiales C1.6

y C1.8, obtuvieron un tamaño de partícula promedio mayor en comparación con los P1.6 y P1.8.

Los estudios de caracterización mostraron que se obtuvieron materiales de orden mesoporoso (en un rango de 2 a 50 nm de diámetro de poro), siendo los sintetizados con Pluronic P-123 los que mostraron una uniformidad de poro, en base a las isothermas obtenidas por medio de los análisis de BET-BJH.

Los materiales sintetizados con CTAB lograron una mayor liberación del principio activo debido a que el diámetro promedio y volumen de poro era mayor en comparación con los materiales sintetizados con Pluronic P-123, por lo cual se logró incorporar una mayor cantidad de fármaco, lo cual se reporta en las pruebas de extracción.

Se demostró que el uso de tensioactivos en la síntesis de los materiales afecta directamente sus propiedades texturales, donde el valor de área superficial de los materiales sintetizados con Pluronic P-123 y CTAB fue de hasta el doble en comparación con los materiales que fueron sintetizados sin tensioactivo.

Con los resultados obtenidos de la evaluación de los perfiles de liberación, los biomateriales que mostraron un mejor comportamiento fueron los sintetizados con Pluronic P-123, ya que podrían lograr que se tenga mayor tiempo el fármaco a una concentración constante en el tejido musculoso en comparación con el material sintetizado con CTAB, a pesar de que este último puede liberar una mayor cantidad de fármaco. Por lo cual se puede concluir en base a los estudios de liberación *in vitro*: cuantificación por UV-Vis y el ensayo microbiológico, que

los biomateriales que mostraron una liberación modificada fueron aquellos sintetizados con Pluronic P-123.

Así mismo, se concluye por medio del ensayo microbiológico, que el Sulfato de gentamicina contenido en los biomateriales permanece activo, ya que fue capaz de inhibir la cepa de *S. aureus*. En base a lo anterior, el método de síntesis y de impregnación no influyen sobre la estabilidad del Sulfato de gentamicina que se aloja en los biomateriales.

El método de síntesis de Arriagada y col., permite obtener tamaños de partícula menores en comparación con la técnica sol-gel, donde las nanopartículas precipitan sin la necesidad de la formación de un gel. Las nanopartículas mostraron valores negativos de potencial zeta a pH 7.4 y 8, evidenciando la naturaleza de la sílice, dada por los grupos hidroxilo desprotonados en medio básico. Así mismo, se determinó que la presencia del agente funcionalizante en las nanopartículas, conlleva a un índice de polidispersión entre 0.380 y 0.551, concluyendo así que la presencia de APTES aumenta el PDI en comparación con las nanopartículas sin funcionalizar.

Además, la funcionalización de las mismas no tuvo gran impacto en la adsorción del Sulfato de gentamicina, ya que las nanopartículas funcionalizadas porosas lograron incorporar 10.8 mg del fármaco, mientras que las que no estaban funcionalizadas incorporaron 11.46 mg.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambrogi, V., Perioli, L., Marmotiini, Giovagnoli, S., Esposito, M., Rossi, C. Improvement of dissolution rate of piroxicam by inclusion into MCM-41 mesoporous silicate. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32: 216-222. (2007)
- Andreani, T., Luiza, A., Souza, R. De, Kiill, C. P., Lorenzón, E. N., Fanguero, J. F., Souto, E. B. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *Int. J. Pharm.* 473: 627–635. (2014)
- Aragón, J., González, R., & Fuentes, G. Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto. *CENIC.* 41: 1-8. (2010)
- Arriagada, F., Correa, O., Günther, G., Nonell, S., Mura, F., Olea-Azar, C., Morales, J. Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. *Plos One* 11, 1-22. (2016)
- Balu, A. M. Nanopartículas soportadas sobre materiales porosos para la síntesis de productos de alto valor añadido. (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba. (2012)
- Badiei, A., Haririan, I., Jahangir, A., Mohammadi, Z. Incorporation of Ibuprofen into SBA-15; Drug Loading and Release properties. Global Science Books, 2009.lu,
- Binker, C. J., Scherer, G. W. Sol-gel: the physics and chemistry of sol-gel processing. Reino Unido, 1990.
- Brunauer, S., Deming, L., Teller, E. On a theory of Van der Waals adsorption of gases. *J. Am. Chem. Soc.* 62: 1723-1732. (1940)
- Bonilla, P., Eugenia, C., Ernesto, J., Eugenia, C., Bonilla, P., Perilla, J. E., ... Perilla, J. E. Pasado, presente y futuro cercano de los materiales para uso en implantes óseos biodegradables. (2011)
- Buckley, A. M., Greenblatt, M. Sol-Gel Preparation of Silica Gels. *J. Chem.* 71: 599. (1994)
- Carballo S, L. M., & Galindo V, H. M. Estudios de los Procesos Sol-gel para la obtención de un aglutinante apropiado para el peletizado de alúmina. *Revista de Ingeniería E Investigación*, 48: 57–63. (2001)
- Correa, G. G., Morais, E. C., Brambilla, R., Bernardes, A. A., Radtke, C., Dezen, D., Santos, J. H. Z. Dos. Effects of the sol – gel route on the structural characteristics and antibacterial activity of silica-encapsulated gentamicin. *Colloids Sur. B.* 116: 510–517. (2014)

- Ding, S. J., Nan, F., Liu, X. L., Hao, Z., Zhou, L., Zeng, J., Xu, H. X., Zhang, W., Wang, Q. Plasmon-modulated Excitation-Dependent Fluorescent from activated CTAB molecules strongly coupled to gold nanoparticles. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *Natura Scientific Reports*. (2017)
- Doadrio, A.L., Sousa, E.M.B., Doadrio, J.C., Pariente, J. Izquierdo, I. Vallet-Regi, M. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 97:125-132. (2004)
- DrugBank. Recuperado Octubre 16, 2017.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Volumen 2: 3665-3668. México:Interamericana. (2017)
- Faustova, Z. V., Slizhov, Y. G. Effect of solution pH on the Surface Morphology of Sol-gel derived silica gel. *Inorganic Materials*. 53: 287-291. (2016)
- Frutos, P., Torrado, S., Perez-Lorenzo, M., Frutos, G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J. Pharm. Biomed Anal*. 21: 1149-1159. (2000)
- Garnica-Romo, M. G., Limón, J. M., González-Hernandez, J., Zamorano-Ulloa, R., Ramirez-Rosales, D., Tirado-Guerra, S. Estudios de polvos y recubrimientos de SiO₂ con introducción de Ag preparados mediante el proceso Sol-gel. *Superg. vacío*. 20: 14-20. (2007).
- Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 12^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana. (2014)
- Hanafi-bojd, M. Y., Reza, M., Ramezani, N., Xue, M., Amin, M., Shahtahmassebi, N., & Malaekheh-nikouei, B. Surface functionalized mesoporous silica nanoparticles as an effective carrier for epirubicin delivery to cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 89: 248–258. (2015)
- Huang, D., Li, D., Wang, T., Shen, H., Zhao, P., Liu, B., Wang, S. Biomaterials Isoniazid conjugated poly (lactide-co-glycolide): Long-term controlled drug release and tissue regeneration for bone tuberculosis therapy. *Biomaterials*, 52: 417–425. (2015)
- Lariza, M., Guel, A., Jiménez, L. D., & Hernández, D. C. Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos. (2013)
- Longo, D., Kasper D., Larry, J. D., Fauci, A. Harrison. *Principios de medicina interna*. 18^a ed. (2012)

- Llinas, M., Sanchez, D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. Institut Químic de Sarriá. 565: 20-31. (2013)
- Marín Astorga, N. Hidrogenación estereo y enantioselectiva de compuestos orgánicos sobre sólidos mesoporosos del tipo MCM-41. Universidad de Concepción. (2004)
- Martín, A., García, R. A., Sen Karaman, D., & Rosenholm, J. M. Polyethyleneimine-functionalized large pore ordered silica materials for poorly water- soluble drug delivery. (2013)
- Martini, M., Chivot, M., Peyrefitte, G., Camponovo, J., Coma, M. C., Pascuet, M. O. Cosmetología. Barcelona: Masson, 1997.
- Mcmanamon, C., Silva, J. P. De, Delaney, P., Morris, M. A., & Cross, G. L. W. Characteristics, interactions and coating adherence of heterogeneous polymer / drug coatings for biomedical devices. Mater. Sci. Eng. C. 59:102–108. (2016)
- Palma, M. T., Acuña, R. H., & Espinosa, G., Padrón, G. Estado del arte del proceso sol-gel en México.
- Paradero, J. M. Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia, 5–8. (2007)
- Perni, S., Martini-Gliching, K., Prokopovich, P. Controlling release kinetics of gentamicin from silica nano-carriers. Colloids Surf. A. (2017)
- Posada, J. A., Hernán, O., Ariel, C. Synthesis and characterization of functionalized mesostructured silicas with acid sulphonic groups. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia, 58, 63-73. (2011)
- Qu, Y., Feng, L., Tong, C., Liu, B., & Lü, C. Microporous and Mesoporous Materials Poly (p-phenylenevinylene) functionalized fluorescent mesoporous silica nanoparticles for drug release and cell imaging. Microporous and Mesoporous Materials. 182: 155–164. (2013)
- Remington, J. P., & Beringer, P. Remington: the science and practice of pharmacy (21 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- Shih, C., Lu, P., Chen, W., Chiang, Y., & Chien, C. Evaluation of gentamicin encapsulated hierarchically meso-macroporous silica-based calcium phosphates glass powders. Ceramics International, 40:15019–15025. (2014)

- Szegedi, A., Popova, M., Goshev, I., & Miha, J. Effect of amine functionalization of spherical MCM-41 and SBA-15 on controlled drug release, *J. Solid State Chem.* 184: 1201–1207. (2011)
- Vadia, N., Rajput, S. Mesoporous material, MCM-41: A new drug carrier. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 4: 44-53. (2011)
- Vallet-Regi, M., Rui-González, L., Izquierdo, I., González-Calbet, J.M. Silica based ordered mesoporous materials: medical applications, *J. Mater. Chem.* 16, 26-31. (2006)
- Vazquez, N., Gonzalez, Z., Ferrari, B., Castro, Y. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. Elsevier, España. (2017)
- Villiers, C., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M. Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J. Nanopart. Res.* 12: 55-60. (2010).
- Viana, R., da Silva, A., Pimentel, A. Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. *Advances in Physical Chemistry.* (2012)
- Williams, D.F.: *Williams dictionary of biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.
- Yan, S., Rao, S., Zhu, J., Wang, Z., Zhang, Y., Duan, Y., ... Yin, J. Nanoporous multilayer poly (l -glutamic acid) / chitosan microcapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 427: 443–451. (2012)
- Zhao, J. Feng., Q. Huo., N. Melosh., G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka y G.D. Stucky. "Triblock copolymer synthesis of mesoporous silica with periodic 50 to 300 Angstrom pores". *Science*, 279: 548. (1998)