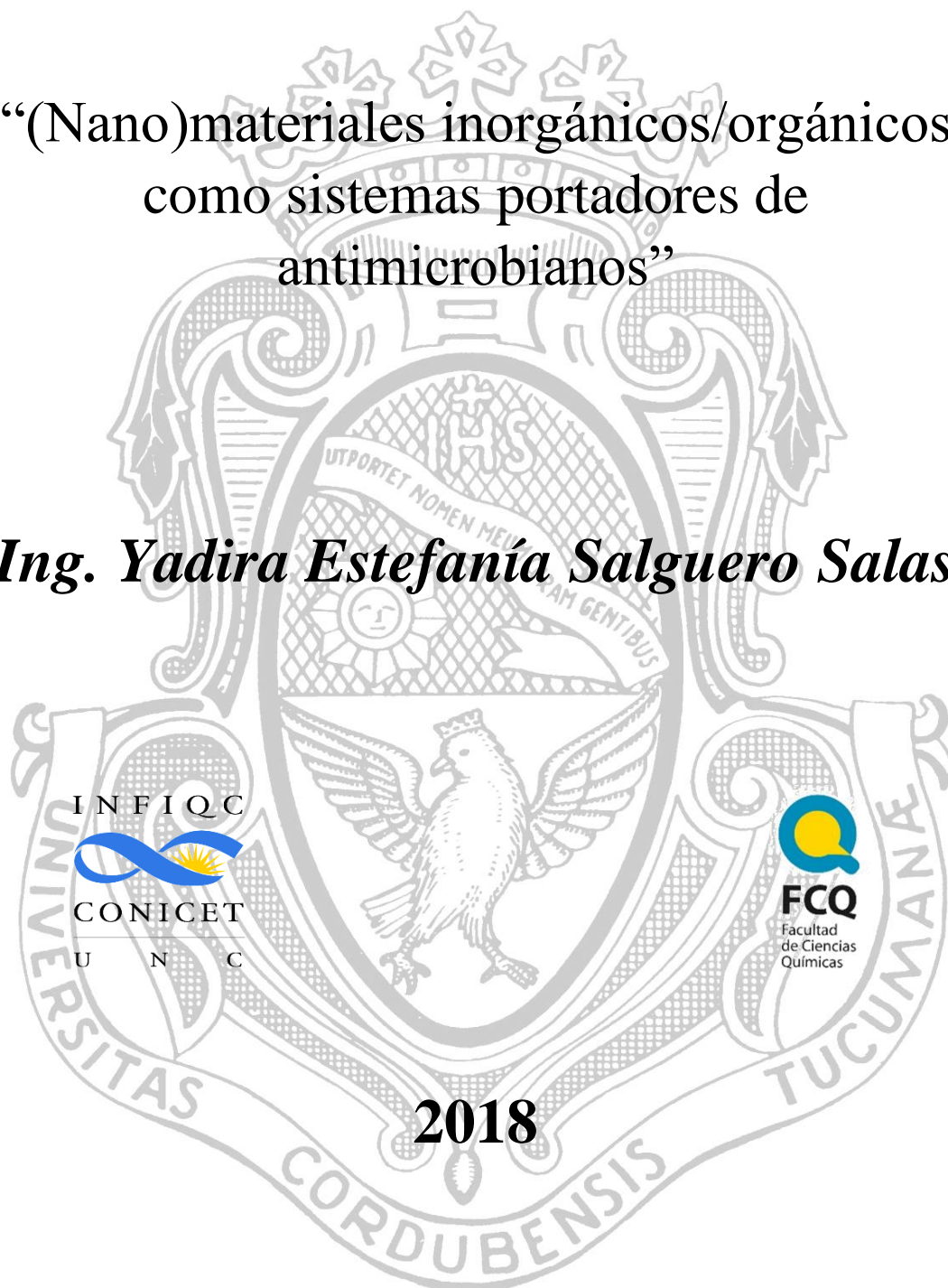


Tesis de Maestría

“(Nano)materiales inorgánicos/orgánicos
como sistemas portadores de
antimicrobianos”

Ing. Yadira Estefanía Salguero Salas



INFIQC
CONICET
U N C

FCQ
Facultad
de Ciencias
Químicas

2018

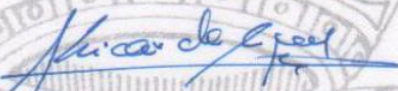
Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba

Departamento de Fisicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

*Tesis presentada para acceder al grado de Magíster en
Ciencias Químicas*

Director de tesis:



Dr. Ricardo Rojas y Delgado

Co-director de tesis:



Dra. Mónica C. García

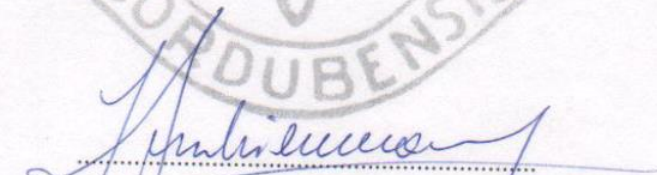
Comisión evaluadora:



Dr. Gerardo D. Fidelio



Dra. Daniela A. Quinteros



Dra. Ana Lea Cukierman
Universidad de Buenos Aires
(Evaluador externo)

DEDICATORIA

A Dios, por haber bendecido cada instante de mi vida y por permitirme superar las barreras que se presentaron para alcanzar esta meta.

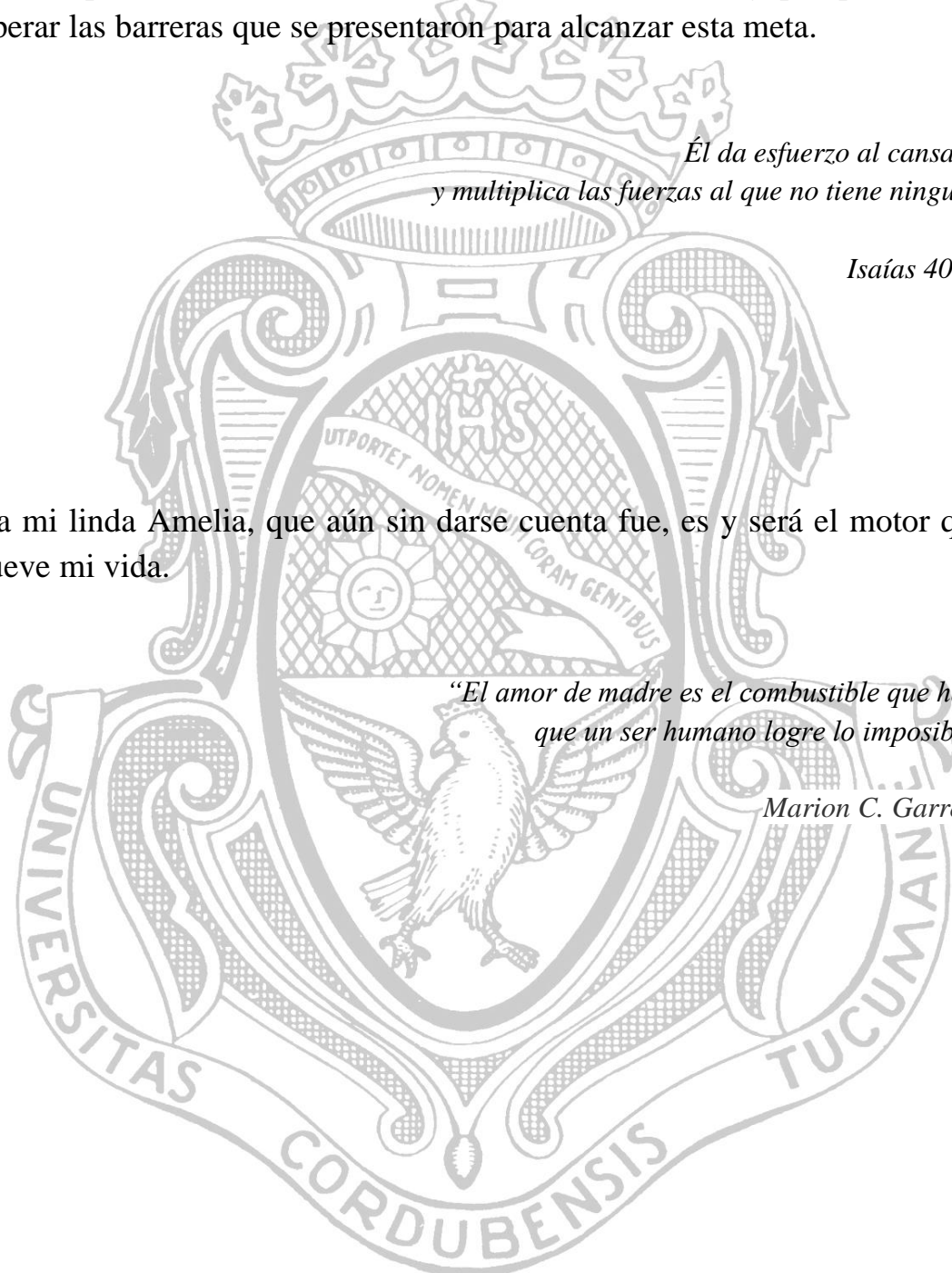
*Él da esfuerzo al cansado,
y multiplica las fuerzas al que no tiene ninguna.*

Isaías 40:29

Y a mi linda Amelia, que aún sin darse cuenta fue, es y será el motor que mueve mi vida.

*“El amor de madre es el combustible que hace
que un ser humano logre lo imposible”*

Marion C. Garretty



AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de la República del Ecuador por la beca otorgada.

A la República Argentina y la Universidad Nacional de Córdoba por abrirme sus puertas y permitirme lograr este sueño.

A mi director, Dr. Ricardo Rojas, y co-directora, Dra. Mónica García, por sus instrucciones y recomendaciones en el desarrollo del proyecto. Al Dr. Gerardo Fidelio por sus consejos y sugerencias. Juntos conformaron mi comisión asesora, a la que agradezco por acompañarme en cada paso para llegar a esta meta.

A las doctoras Daniela Quinteros y Ana Cukierman por darse el tiempo para leer y evaluar este trabajo de tesis.

A la Dra. Laura Valenti y Lcda. Giuliana Mosconi por su valiosa colaboración en el proyecto.

A la Dra. Carla Giacomelli, Ceci, Lau y Vale que estuvieron siempre atentas a cualquier inquietud que se me presentaba.

A la Dra. Patricia Ortiz que con su sonrisa y cálido saludo me animaban día a día.

Al Dr. De Pauli que siempre me alegraba la vida con cada visita que hacía.

A Hernán, Ana, Sol y su familia cuya hermosa personalidad difícilmente encontraré en otras personas.

A Dariana, Alejandro, Jessi y Vivi por escucharme y estar para mí siempre. A Meli, María, Anita, Lucas, Javi, Pau, Jero, Euge, Nati Po, Natividad, Sandra, Silvi, Johannes y Jhon, que siempre encontraban la forma de hacerme sonreír.

A toda esa gente linda del INFIQC, LAMARX y personal de postgrado que conocí en el transcurso del desarrollo de este proyecto y de alguna forma contribuyeron a su finalización. No los mencioné uno por uno por miedo a olvidarme de alguno.

A mis amigos ecuatorianos que aún en la distancia me brindaban su cariño y estaban pendientes de mi progreso: Marquito, Miguel, Liz, Daya, Carla y, sin duda, al Ing. Francisco Quiroz por sus consejos que recordaré toda la vida.

A mi familia y a la de mi esposo por su invaluable apoyo y ayuda. A mi amado esposo Diego Cadena por estar siempre a mi lado, ayudarme y motivarme para nunca decaer. Y a la luz de mi vida, mi Amelita por la alegría tan grande que trae a mi vida tan solo por permitirme escuchar su voz.

A todos les agradezco infinitamente por ser parte de esta etapa de mi vida. ¡Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PÁGINA

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	I
RESUMEN	IV

Capítulo I: Introducción, antecedentes y objetivos..... 2

1.1. Diseño de sistemas para la liberación modificada de fármacos	2
1.2. Hidróxidos dobles laminares (LDH).....	4
1.2.1. Estructura y composición	5
1.2.2. Síntesis de LDH.....	7
1.2.3. Aplicaciones de los LDH como SP	8
1.3. Fármacos antimicrobianos.....	11
1.3.1. Fármacos antimicrobianos quinolónicos (FAQ)	12
1.3.1.1. Ácido Nalidíxico (HNal).....	13
1.3.1.2. Ciprofloxacina (Cip)	14
1.3.1.3. Propiedades químicas de los FAQ que influyen en su eficacia..	16
1.3.1.4. SP de FAQ con base en LDH	19
1.4. SP de F con base en LDH para la vía de administración tópica.....	20
1.5. Objetivos	23
1.6. Referencias bibliográficas	24

Capítulo II: Materiales y métodos..... 35

2.1. Reactivos y materiales	35
2.2. Obtención de SP	36
2.2.1. Síntesis de LDH-Nal por co-precipitación a pH var	36
2.2.2. Síntesis de LDH-Nal por co-precipitación a pH cte	37
2.2.3. Síntesis de LDH-Cip	38
2.3. Síntesis de muestras de referencia	38
2.4. Caracterización fisicoquímica de los SP	39
2.4.1. Difracción de rayos X (DRX)	39
2.4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	40
2.4.3. Análisis químico elemental	40
2.4.4. Espectrofotometría UV-Visible.....	41
2.4.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico-diferencial (DTA).....	41
2.4.6. Espectroscopia de energía dispersiva (EDS).....	42
2.4.7. Espectroscopía de correlación fotónica (DLS).....	42
2.4.8. Dispersión de luz electroforética (DLE)	42
2.4.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	43
2.4.10. Interacción entre LDH y FAQ.....	43
2.5. Obtención y caracterización de films.....	44
2.5.1. Obtención de films (LDH-Cip)/HS	44
2.5.2. Caracterización fisicoquímica y morfológica de los films.....	45

2.5.3.	Caracterización biofarmacéutica de los films	46
2.5.3.1.	Uniformidad de unidades de dosificación.....	46
2.5.3.2.	Hinchamiento	47
2.6.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> del FAQ.....	47
2.7.	Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	50
2.7.1.	Inóculo inicial.....	50
2.7.2.	Macrodilución en caldo (o en tubos)	51
2.7.3.	Método de difusión en agar.....	52
2.7.4.	Criterio de interpretación	53
2.8.	Referencias bibliográficas	53

Capítulo III: Aspectos estructurales y morfológicos de la vehiculización de FAQ mediante LDH nanoparticulados 56

3.1.	Resultados y discusión	56
3.1.1.	Caracterización fisicoquímica de los LDH-Nal	56
3.1.1.1.	DRXP	57
3.1.1.2.	FTIR.....	60
3.1.1.3.	Curvas de titulación	62
3.1.1.4.	Incorporación de Nal sobre LDH-Cl	65
3.1.1.5.	TGA y DTA	67
3.1.1.6.	Análisis químico elemental y fórmula química.....	69
3.1.1.7.	DLS, DLE y SEM.....	71
3.1.2.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> del FAQ	72
3.1.3.	Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	76
3.2.	Conclusiones parciales.....	80
3.3.	Referencias bibliográficas	81

Capítulo IV: SP de Cip con base en LDH y su adecuación para una vía de administración tópica..... 87

4.1.	Resultados y discusión	87
4.1.1.	Síntesis y caracterización fisicoquímica de los LDH-Cip	87
4.1.1.1.	DRXP	88
4.1.1.2.	FTIR.....	90
4.1.1.3.	TGA y DTA	91
4.1.1.4.	Análisis químico elemental y fórmula química.....	93
4.1.1.5.	DLS, DLE y SEM.....	94
4.1.2.	Obtención y caracterización fisicoquímica de los films	95
4.1.2.1.	DRX	96
4.1.2.2.	ATR-FTIR.....	98
4.1.2.3.	TGA y DTA	99
4.1.2.4.	DLE y MC.....	100
4.1.3.	Caracterización biofarmacéutica de los films	102
4.1.3.1.	Uniformidad de unidades de dosificación.....	102
4.1.3.2.	Hinchamiento	103
4.1.3.3.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> del FAQ	105

4.1.4. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	108
4.2. Conclusiones parciales	110
4.3. Referencias bibliográficas	111
Capítulo V: Conclusiones generales, proyecciones y perspectivas futuras	117
5.1. Conclusiones generales	117
5.2. Proyecciones a corto plazo y perspectivas futuras	119
Anexo: Publicaciones generadas a partir de esta tesis.....	122
A.1. Publicaciones en revistas con referato.....	122
A.2. Avances de presentaciones a congresos (<i>Proceedings</i>).....	122
A.3. Presentaciones a congresos, simposios y conferencias	122
A.3.1. Nacionales.....	122
A.3.2. Internacionales	122
A.4. Trabajos de divulgación científica	123
A.5. Premios	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Estructura de los LDH.....	5
Figura 1. 2. Posiciones de los sustituyentes quinolónicos	16
Figura 1. 3. Naturaleza química de la quelación	17
Figura 1. 4. Diagramas de distribución de especies en función del pH.....	18
Figura 1. 5. Fotodegradación del HNal y Cip	18
Figura 1. 6. Unidad constitutiva de repetición del HS	23
Figura 2. 1. Síntesis directa por co-precipitación a pH variable	37
Figura 2. 2. Síntesis directa por co-precipitación a pH constante	37
Figura 2. 3. Esquema de la obtención del film (LDH-Cip)/HS.....	45
Figura 2. 4. Esquema de celdas bicompartimentales	48
Figura 2. 5. Macrodilución en tubos para la determinación de la CIM	51
Figura 2. 6. Ensayo de difusión en agar para muestras en forma de dispersión.....	52
Figura 3. 1. Patrones de DRXP de LDH-Nal	57
Figura 3. 2. Modelo propuesto del arreglo de Nal ⁻ en el espacio interlaminar	59
Figura 3. 3. Espectros FTIR de LDH-Nal	60
Figura 3. 4. Curvas de titulación	62
Figura 3. 5. Incorporación de Nal ⁻ en LDH-Cl.....	65
Figura 3. 6. Curvas de TGA/DTA de LDH-Nal	67

Figura 3. 7. Imágenes SEM y distribución de tamaños de los LDH-Nal.....	72
Figura 3. 8. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de Nal.....	73
Figura 3. 9. Estudios microbiológicos de LDH-Nal.....	77
Figura 3. 10. Halos de inhibición.....	79
Figura 4. 1. Patrones de DRXP de LDH-Cip	89
Figura 4. 2. Modelo propuesto para el arreglo de Cip ⁻ en el espacio interlaminar.....	90
Figura 4. 3. Espectros FTIR de LDH-Cip	91
Figura 4. 4. Curvas TGA/DTA de LDH-Cip.....	92
Figura 4. 5. Imagen SEM y distribución de tamaños por intensidad de LDH-Cip	95
Figura 4. 6. Aspecto macroscópico de los films.....	96
Figura 4. 7. Patrones de DRX de los films.....	97
Figura 4. 8. Esquema de la interacción entre los LDH-Cip y el HS.....	98
Figura 4. 9. Espectros ATR-FTIR de los films	99
Figura 4. 10. Curvas de TGA y DTA de los films.....	100
Figura 4. 11. Imágenes de MC de los films	101
Figura 4. 12. Hinchamiento de los films	104
Figura 4. 13. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de Cip desde los films.....	106
Figura 4. 14. Halos de inhibición de los films.....	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Estructura, nombre sistemático y propiedades del HNal	14
Tabla 1. 2. Estructura, nombre sistemático y propiedades de la Cip	15
Tabla 1. 3. Ventajas y limitaciones asociadas a una administración por vía tópica	21
Tabla 2. 1. Criterio de interpretación de los ensayos de sensibilidad antimicrobiana ...	53
Tabla 3. 1. Resultados de análisis elemental y fórmula propuesta para los LDH-Nal. Los valores teóricos de acuerdo a la fórmula propuesta se encuentran entre paréntesis	70
Tabla 3. 2. Datos cinéticos obtenidos por el modelado de los perfiles de liberación de Nal con modelos de.....	74
Tabla 4. 1. Resultados del análisis elemental y fórmula propuesta para LDH-Cip.....	93
Tabla 4. 2. Uniformidad de peso y contenido de Cip	103
Tabla 4. 3. Datos cinéticos de los perfiles de liberación de Cip.....	106

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Absorbancia
AMH	Agar Müeller-Hinton
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American type culture collection
ATR-FTIR	Espectroscopia infrarroja por reflectancia total atenuada
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cip	Ciprofloxacina
Cip^-	Ciprofloxacina en su forma aniónica
$CipH_2^+$	Ciprofloxacina en su forma catiónica
$CipH^\pm$	Ciprofloxacina en su forma zwitteriónica
CipHCl	Ciprofloxacina clorhidrato
CLSI	Instituto de normas clínicas y de laboratorio
CMH	Caldo Müeller-Hinton
d	Espaciamiento basal
d_H	Diámetro hidrodinámico promedio
DLE	Dispersión de luz electroforética
DLS	Espectroscopía de correlación fotónica
DRX	Difracción de rayos X
DRXP	Difracción de rayos X de polvos
DTA	Análisis térmico diferencial
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
F	Fármaco(s)

FAQ	Fármaco(s) antimicrobiano(s) quinolónico(s) (incluye quinolonas y fluoroquinolonas)
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
Gli	Glicerina
HNal	Ácido nalidíxico
HS	Hialuronato de sodio
IP	Índice de polidispersidad
INEI	Instituto nacional de enfermedades infecciosas
LDH	Hidróxido(s) doble(s) laminar(es)
LDH-Cip	Hidróxidos dobles laminares intercalados con Cip
LDH-Nal	Hidróxidos dobles laminares intercalados con Nal
LSD	Mínima diferencia significativa de Fisher
M ²⁺	Metal divalente
M ³⁺	Metal trivalente
Nal ⁻	Forma básica o aniónica del ácido nalidíxico
OMS	Organización mundial de la salud
PBS5,8	Solución tampón fosfato a pH 5,8
PBS7,4	Solución tampón fosfato a pH 7,4
PE	Polielectrolito(s)
pHcte	pH constante
pHvar	pH variable
pKa	Constante de disociación ácida
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLM	Sistema de liberación modificada
SP	Sistemas portadores

TGA	Análisis termogravimétrico
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV-Vis	Ultravioleta-visible
λ	Longitud de onda
ε	Coefficiente de extinción molar
ζ	Potencial electrocinético (potencial Z)
% P ₇₅₀	Remanente de la descomposición térmica a 750 °C
% P ₁₀₀₀	Remanente de la descomposición térmica a 1000 °C
% C _v	Coefficiente de variación
% Nal ₃₆₀	Liberación acumulativa de Nal en 360 min
% Cip ₄₈₀	Liberación acumulativa de Cip en 480 min
Γ	Cantidad de FAQ adsorbido

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar (nano)materiales inorgánicos/orgánicos como sistemas portadores (SP) de fármacos antimicrobianos del grupo de las (fluoro)quinolonas (FAQ), siendo el ácido nalidíxico (HNal) y la ciprofloxacina (Cip) los FAQ modelo seleccionados, los cuales fueron vehiculizados en hidróxidos dobles laminares (LDH) como material portador.

Para la síntesis de los SP conteniendo la forma básica del HNal (Nal) se utilizaron dos rutas de síntesis por co-precipitación: a pH variable (LDH-Nal-pHvar) y a pH constante (LDH-Nal-pHcte). Ambas dieron lugar a nanopartículas de LDH de Mg y Al con relación molar cercana a 3:1 y, aproximadamente, un 30 % $p\ p^{-1}$ de Nal incorporado. Éstas presentaron morfología laminar irregular y, en el caso del LDH-Nal-pHcte, se observó una fase adicional de $Mg(Nal)_2$. La liberación del Nal desde los LDH-Nal-pHvar se produjo, principalmente, por intercambio aniónico, por lo que la velocidad de liberación estuvo determinada por los aniones presentes en el medio de liberación. La vehiculización de Nal en los LDH produjo un incremento de la acción antimicrobiana comparado con el FAQ puro. Por otra parte, la presencia de $Mg(Nal)_2$ en la muestra LDH-Nal-pHcte produjo una liberación más sostenida del Nal, pero con una menor acción antimicrobiana en comparación con la muestra LDH-Nal-pHvar.

La experiencia adquirida con el Nal sentó las bases necesarias para la obtención y comprensión de las propiedades del sistema LDH-Cip. Este SP se sintetizó por co-precipitación a pH variable, con una relación molar 2:1 de Zn:Al y dio lugar a una fase pura de LDH, con un alto contenido de FAQ intercalado (58 % $p\ p^{-1}$), en el que las partículas de LDH presentaron agregados de tamaño micrométrico. A partir de estos SP se llevó a cabo un estudio preliminar del diseño de una formulación, bajo la forma de apósito para administración tópica, mediante la combinación con hialuronato de sodio como matriz polimérica. Su caracterización indicó que los films permitirían un aseguramiento de dosis uniforme y la liberación modulada de la Cip promovería un efecto prolongado de la acción antimicrobiana.

En conclusión, los SP desarrollados con base en LDH-FAQ se obtuvieron mediante una metodología con procesos fácilmente reproducibles; además, estos (nano)materiales presentaron propiedades prometedoras y resultan en alternativas interesantes para el tratamiento y profilaxis de infecciones tópicas oportunistas comunes.

CAPÍTULO I

Introducción, antecedentes y objetivos

Capítulo I: Introducción, antecedentes y objetivos

1.1. Diseño de sistemas para la liberación modificada de fármacos

Los sistemas de liberación modificada (SLM) de fármacos (F), desarrollados por medio del uso y perfeccionamiento de nuevas tecnologías o materiales, es un tema de gran interés, no solo por la revitalización de antiguos productos farmacéuticos, sino también por la obtención de productos innovadores que permiten conseguir una liberación sitio-específica y modulada de F o moléculas bioactivas. Entre las principales ventajas de los SLM se encuentran: un efecto terapéutico prolongado, reducción de la frecuencia de dosificación y disminución de efectos adversos [1].

Si bien el F cumple un rol fundamental dentro de los materiales con aplicación biomédica, su acción terapéutica puede mejorarse con el desarrollo de sistemas de liberación adecuados. El diseño de SLM de F requiere la comprensión de las propiedades fisicoquímicas del F, del material seleccionado para su liberación y del mecanismo de liberación. Por ello, para el desarrollo de estos sistemas se deben considerar varios factores o parámetros interrelacionados, tales como [2]:

- Tipo de F, que dependerá de la enfermedad a tratar
- Vía de administración, la cual definirá la forma farmacéutica
- Material utilizado como portador del F
- Mecanismo y cinética de liberación

También se debe tener en cuenta que los SLM de F se desarrollan con el fin de mejorar sus funciones de reservorio. Por lo tanto, los SLM deben tener la capacidad de proteger a los F y optimizar sus propiedades, tales como: estabilidad, solubilidad y eficacia [1].

La Farmacopea Argentina define a un sistema de liberación como un “producto que permite liberar un principio activo con una velocidad predeterminada durante períodos de tiempo prolongados”. Además, emplea expresiones como “extendida”, “repetida” y “sostenida” para describir una liberación prolongada (liberación que se produce

durante un período de tiempo prolongado luego de su administración). También indica que, “los SLM están diseñados para liberar el principio activo a una velocidad constante y apropiada que se mantenga hasta que el sistema sea retirado” [3].

Por su parte, la Farmacopea Española define a las formas farmacéuticas de liberación modificada como “preparaciones en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía. Las formas farmacéuticas de liberación modificada incluyen formas farmacéuticas de liberación prolongada (que garantizan una liberación más lenta de la sustancia activa), de liberación retardada (que retrasan la liberación de la sustancia activas) y de liberación pulsátil (que garantizan una liberación secuencial de la sustancia activa)” [4].

Por otro lado, la Farmacopea de Estados Unidos describe a las formas farmacéuticas de “liberación modificada” (“modified release”) como aquellas en las que, sus características de disolución son moduladas, en el tiempo o en el espacio, para alcanzar objetivos terapéuticos específicos o de conveniencia, que no se logran con las formulaciones farmacéuticas convencionales. El término liberación modificada incluye las formas de liberación retardada (“delayed release”) y de liberación extendida (“extended release”) [5].

Entonces, los SLM también conocidos como sistemas portadores (SP) de F pueden definirse básicamente como productos que están compuestos por un principio activo o F y un material portador o transportador que vehiculiza dicho principio activo y modula su liberación.

Desde el punto de vista de los materiales, los SP pueden ser de tres tipos: 1) orgánicos, como polisacáridos, polímeros naturales y sintéticos, 2) inorgánicos como materiales laminares, materiales mesoporosos, nanopartículas metálicas, entre otros, y, 3) híbridos, los cuales están formados por materiales orgánicos e inorgánicos para aprovechar las propiedades de ambos. Entre estos, los materiales inorgánicos son vehículos de alta eficiencia de cargado, fácil síntesis y almacenamiento, baja toxicidad, fácil industrialización y además tienen compatibilidad ecológica [6].

Dentro de los materiales inorgánicos, los materiales laminares tanto catiónicos [7], como aniónicos [6], pueden utilizarse como SP de F. Entre ellos, los hidróxidos dobles laminares (LDH), materiales laminares aniónicos, presentan un gran interés en cuanto a aplicaciones biomédicas debido a que son biocompatibles, presentan solubilidad pH-dependiente y se descomponen fácilmente en medio ácido. Además, tienen capacidad de intercambio aniónico, lo cual los hace prometedores para su interacción con F en el diseño y desarrollo de SP [6], [8].

1.2. Hidróxidos dobles laminares (LDH)

Los LDH son materiales, naturales o sintéticos, también llamados arcillas aniónicas, por su estructura y comportamiento similar a las arcillas catiónicas, pero con carga opuesta; se denominan además compuestos de tipo hidrotalcita, debido a que empezaron a conocerse gracias al hallazgo de este mineral. La hidrotalcita es un hidroxicarbonato natural de Mg y Al, descubierto por Hochstetter en Suecia en 1842 y cuya fórmula general: $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ fue descrita por Manasse en 1915 [9], [10].

El estudio de estos sólidos en cuanto a síntesis y caracterización inició con los trabajos de Feitknecht en los años treinta [11], [12]. Sin embargo, las principales características estructurales de los LDH fueron determinadas recién en los años sesenta, con las primeras investigaciones de difracción de rayos X de monocristales realizados por Allmann y por Taylor, en muestras minerales [10].

Con los años, los LDH adquirieron un creciente interés, por lo que fácilmente se encuentran artículos científicos relacionados con estos sólidos, a tal punto que, incluso en años recientes, se han publicado libros [10], [13] y revisiones sobre LDH [6], [8], [14]–[16] con referencia a su composición química, síntesis, propiedades, estructura, compuestos derivados, así como de sus prometedoras aplicaciones en diferentes áreas, tales como: electroquímica [14], catálisis [15], remediación ambiental [16], entre otras.

1.2.1. Estructura y composición

Los LDH tienen una estructura laminar derivada de la brucita ($Mg(OH)_2$), en la que, un catión metálico divalente se coordina con seis grupos hidroxilo para formar una unidad octaédrica ($M(OH)_6$) que comparte aristas con unidades vecinas para formar láminas con un grosor aproximado de $4,8 \text{ \AA}$. Estas láminas se apilan debido a fuerzas de atracción débiles como fuerzas de dispersión y enlace hidrógeno, lo que genera una estructura con espacios interlaminares. La sustitución parcial e isomórfica de los iones divalentes por trivalentes da lugar a una carga positiva que permite incorporar aniones hidratados en el espacio o dominio interlaminar para balancear la carga [9], [10]. En la Figura 1.1 se muestra un esquema de los LDH.

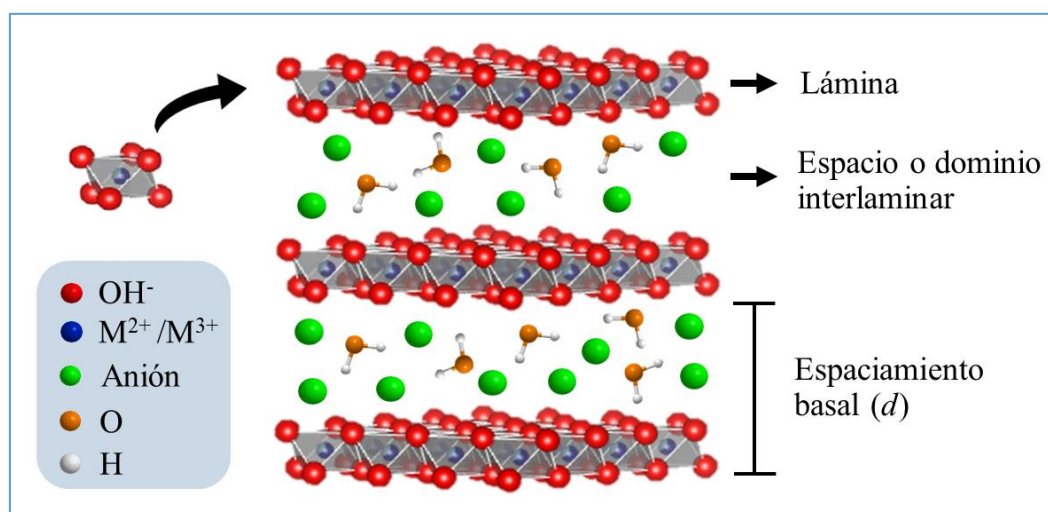


Figura 1. 1. Estructura de los LDH

El tamaño del espacio interlaminar depende de las dimensiones del anión intercalado y su orientación con respecto a las láminas. El grosor de una lámina junto con el tamaño del espacio interlaminar se denomina espaciamiento basal (d), el cual es característico del sólido formado. Los menores valores de d se consiguen al incorporar aniones inorgánicos pequeños como los oxoaniones o haluros, por ejemplo, al intercalar carbonato, nitrato o cloruro se obtienen valores de d en un rango aproximado entre 7 y 8 \AA . Por otro lado, al intercalar aniones orgánicos pueden obtenerse valores de d superiores a 15 \AA , por ejemplo, la incorporación de dodecilsulfato genera un d de aproximadamente $26,8 \text{ \AA}$ [9].

La fórmula general de los LDH puede describirse como $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{x+}A_{x/n}^{n-} \cdot mH_2O$, donde: M^{2+} y M^{3+} representan iones metálicos divalentes o trivalentes, respectivamente, A^{n-} el anión interlamina y x la relación $M^{3+}/(M^{2+} + M^{3+})$ [9]. También, se puede describir como $[M_n^{2+}M^{3+}(OH)_{2+2n}]^+ A_{1/n}^{n-} \cdot mH_2O$, $n = 2-4$ [17], haciendo referencia al catión trivalente, responsable de la capacidad de intercambio aniónico del sólido. Sin embargo, mayoritariamente se utiliza la primera fórmula para destacar su similitud con la brucita.

Con respecto a los cationes que componen la lámina, estos pueden seleccionarse dentro de una amplia gama de posibilidades. Entre los metales divalentes que han sido utilizados para la síntesis de estos sólidos están: Mg, Zn, Co, Ni, Fe, Mn, y entre los trivalentes: Al, Cr, Co, V, Fe, Y, Mn, Ga y algunos lantánidos [8]. De hecho, la variedad de materiales con una estructura similar es mucho mayor al sugerido por la fórmula general pues se han sintetizado LDH ternarios y cuaternarios [10], [18], es decir, que contienen en las láminas más de dos cationes, divalentes o trivalentes diferentes. Uno de los criterios utilizados para la selección de los cationes es su aplicación. Así, para fines biomédicos, los cationes mayoritariamente empleados son Mg-Al y Zn-Al puesto que le otorgan biocompatibilidad al material [6].

Por otra parte, se pueden sintetizar LDH que incorporan, ya sea en su espacio interlamina o en su superficie, una diversidad de aniones simples o complejos, inorgánicos u orgánicos, compuestos de coordinación, polioxometalatos o biomoléculas, incluyendo al ADN. En este sentido, la relación tamaño/carga del anión es importante, ya que aniones grandes con carga baja son incapaces de equilibrar de forma homogénea la carga positiva de las láminas. Por ello, debe haber un balance entre la densidad de carga de las láminas y las dimensiones de las especies huésped en la interlámina. Los aniones asimétricos, especialmente cuando contienen cadenas largas (como carboxilatos o sulfonatos con cadenas alquílicas), pueden producir arreglos interlaminares en monocapas, o bicapas, paralelas a las láminas; o, monocapas, o bicapas, inclinadas con respecto a las láminas [8].

Por lo tanto, F aniónicos pueden ser intercalados en el espacio interlamina y posteriormente ser liberados por medio de intercambio aniónico o por disolución en medio ácido [6]. Este aspecto será desarrollado en la sección 1.2.3.

1.2.2. Síntesis de LDH

Los métodos de síntesis de estos sólidos pueden clasificarse dentro de dos grupos, directos e indirectos. Los métodos directos incluyen la coprecipitación, síntesis sol-gel, reacción óxido-sal y síntesis electroquímica. Por otro lado, entre los métodos indirectos están los de intercambio aniónico, delaminación-reapilamiento, y reconstrucción. Cabe señalar que, con frecuencia se emplean otros tratamientos o procedimientos adicionales para mejorar la cristalinidad y otro tipo de propiedades de los LDH, como los tratamientos hidrotermales y de microondas [8], [13].

Entre los diferentes métodos de síntesis, el de coprecipitación es el mayoritariamente utilizado debido a su simplicidad, flexibilidad y capacidad de producir diferentes sólidos con propiedades diferenciadas.

La co-precipitación se puede definir como un método que permite una precipitación controlada de LDH a partir de soluciones acuosas que contienen cationes metálicos y aniones que formarán parte de las láminas y la interlámina, respectivamente. A su vez, con dependencia del pH, se pueden distinguir dos tipos de métodos: pH constante (también conocido como de condiciones de baja sobresaturación) y pH variable (denominado además como de condiciones de alta sobresaturación).

La coprecipitación a pH constante consiste en la adición lenta de una solución de cationes metálicos a un reactor que contiene el anión a ser intercalado; por medio de la adición de una base, el pH se mantiene constante hasta la total precipitación de los LDH [8]. La ventaja de esta metodología es que usualmente permite obtener una mayor cristalinidad del sólido, en comparación con los obtenidos a pH variable, debido a que la velocidad de crecimiento del cristal es mayor que la de nucleación [19].

Por otra parte, la coprecipitación a pH variable consiste en disolver el anión interlamilar, ya sea en la base o en la solución de iones metálicos, y el reactivo remanente se añade bajo agitación sin ningún control del pH [13]. Los sólidos obtenidos bajo esta metodología, generalmente, dan lugar a materiales con baja cristalinidad debido a la gran cantidad de núcleos de cristalización. No obstante, el empleo de tratamiento hidrotermal, luego de la co-precipitación, puede incrementar la cristalinidad de los materiales amorfos

o con baja cristalinidad [19]. La ventaja de esta metodología es el menor tiempo de síntesis en comparación con la co-precipitación a pH constante.

La síntesis por co-precipitación puede dar lugar a la obtención de LDH con tamaños dentro de la escala nanométrica. Sin embargo, se debe notar que otros factores, como una etapa de maduración separada de los medios de síntesis, generalmente en agua pura, y el empleo de tratamiento hidrotermal influyen en la obtención de partículas nanométricas. Esto se debe a que, a pesar de que los LDH poseen un alto potencial electrocinético (ζ) positivo que podría evitar su agregación, tienden a agregarse en medios con alta fuerza iónica por la adsorción de aniones que apantallan su carga o que incrementan la hidrofobicidad de su superficie [13].

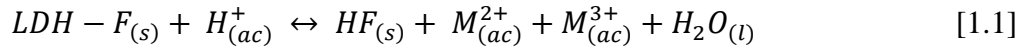
1.2.3. Aplicaciones de los LDH como SP

Los LDH son materiales cuya síntesis es simple, tienen bajo costo de obtención y presentan capacidad de intercambio aniónico. Además, sus propiedades fisicoquímicas son modificables con dependencia de su composición, por lo que pueden emplearse para una diversidad de aplicaciones entre las que se destacan las aplicaciones biomédicas [6], [8], [13], [20], [21].

Dentro de las aplicaciones biomédicas, el desarrollo de LDH como SP de F ha cobrado gran interés. Dado que las láminas de los LDH poseen carga positiva, pueden alojar F aniónicos en el espacio o dominio interlaminar brindándole protección contra efectos de la luz, el oxígeno u otros agentes degradantes. Además, la disolución de la matriz con dependencia del pH y su capacidad de intercambio aniónico los vuelve adecuados para modular la liberación del F [6].

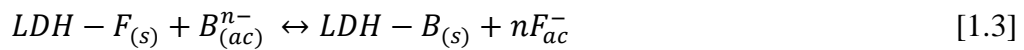
La disolución de los LDH es un proceso superficial, controlado principalmente por el área expuesta y la reactividad de su superficie. El mecanismo de disolución es un proceso en dos pasos: 1) una rápida formación de sitios reactivos superficiales, producto de la protonación de los grupos hidroxilo de las láminas, lo cual conlleva a un debilitamiento de los enlaces M-O; y, 2) un desacoplamiento lento de los iones metálicos de la superficie. La solubilidad de los LDH y su velocidad de disolución presentan una

fuerte dependencia con el tipo de anión interlamilar; por ejemplo, LDH intercalados con ibuprofeno son más solubles y tienen una mayor velocidad de disolución en comparación con LDH intercalados con aniones carbonato [22]. De forma general, la liberación del F de los LDH en medio ácido puede describirse mediante los equilibrios presentados en las ecuaciones 1.1 y 1.2 [23].



donde *s* indica estado sólido, *ac* acuoso y *l* líquido.

Por otro lado, la liberación de F por intercambio aniónico a partir de los LDH es dependiente de la naturaleza y la concentración del anión presente en el medio de liberación [23]. La facilidad de este intercambio depende, primariamente, de la naturaleza de los aniones debido a que su afinidad por las láminas es diferente. Los aniones monovalentes presentan baja afinidad por las láminas y, consecuentemente, son fácilmente intercambiables; por el contrario, los aniones multivalentes poseen gran afinidad por las láminas [8]. Tomando esto como base, se han reportado series aniónicas cuya afinidad por las láminas se rige en el siguiente orden: $NO_3^- < Br^- < Cl^- < F^- < OH^- < SO_4^{2-} < CrO_4^{2-} < HAsO_4^{2-} < HPO_4^{2-} < CO_3^{2-}$. Además, se ha indicado que otros factores influyen en el proceso de intercambio, tales como: correcta selección del solvente, composición química de los LDH precursores y temperatura [24]. El proceso de intercambio aniónico es controlado por la difusión y puede describirse por la reacción de la ecuación 1.3.



donde *B* representa el anión del medio de liberación.

La propiedad de intercambio aniónico ha sido aprovechada no solo para el cargado y liberación de F, sino también para la funcionalización de la superficie de los LDH. De esta manera, se han empleado polietilenglicol [25] y albúmina [26] para aumentar la estabilidad coloidal de los LDH en medios biológicos; ácido fólico para incrementar la

internalización celular [27] y bisfosfonatos, como el risedronato, para promover el direccionamiento del sistema hacia los huesos y sus tejidos tumorales [28].

Los LDH han sido estudiados extensamente en aplicaciones farmacéuticas e incluso pueden hallarse en formulaciones comerciales, como los antiácidos Almax[®] y Talcid[®]. Además, se pueden encontrar varias revisiones y artículos científicos [6], [8], [20], [29] donde se evidencia su gran desarrollo como SP de antiinflamatorios, antihipertensivos y anticancerígenos, siendo los antiinflamatorios no esteroideos los mayoritariamente intercalados.

En lo que respecta a los LDH como SP de F antimicrobianos, se han desarrollado sistemas con: amoxicilina [30], gramicidina, anfotericina B, ampicilina, ácido nalidíxico (HNal) [31], norfloxacin [32], succinato de cloranfenicol [33], cefazolina [34], sulfanilamida, oxazolidinona y ciprofloxacina (Cip) [35].

El interés por incorporar F antimicrobianos a los LDH se basa en maximizar su acción antimicrobiana y mantener la estabilidad de los F por períodos prolongados de tiempo, propiciando así una menor aparición de resistencia antimicrobiana.

La incorporación de compuestos antimicrobianos a los LDH puede producir efectos sinérgicos que mejoran su acción. Así, se ha indicado que LDH de tamaño nanométrico presentan una mayor interacción con las membranas bacterianas y una internalización celular mejorada, puesto que su gran área superficial y alta carga positiva facilitan su interacción con lípidos cargados negativamente, contribuyendo a la desestabilización de las membranas [36].

Además, la adhesión de nanopartículas de LDH apantalla la carga neta negativa de las bacterias, lo que conlleva a su floculación, por agregación celular y aumenta la capacidad de ser eliminadas por el sistema fagocítico mononuclear [36], [37].

1.3. Fármacos antimicrobianos

A lo largo de la historia, los seres vivos han tenido que enfrentarse de forma continua contra los microorganismos causantes de infecciones. No obstante, el descubrimiento de la penicilina a finales de la década de 1930 marcó el inicio del desarrollo de F antibacterianos y otros medios para el control de infecciones. Con el tiempo, el uso de los F antimicrobianos dentro de la medicina se convirtió en uno de los hechos más influyentes a nivel mundial debido a la reducción de la tasa de morbilidad y mortalidad, tanto humana como animal [38], [39].

Hoy en día, el empleo de antimicrobianos es fundamental en los tratamientos médicos, tanto preventivos como curativos. Sin ellos, las intervenciones quirúrgicas tales como trasplantes de órganos, cesáreas, colocación de prótesis, entre otros, se volverían procedimientos de alto riesgo; además de que se incrementarían los costos de los tratamientos por prolongar los tiempos de hospitalización y mayor requerimiento de atención médica [40].

Sin embargo, la eficacia en la prevención y tratamiento de una serie de infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos está siendo afectada por la creciente resistencia a los antimicrobianos. En 2015, debido al incremento acelerado de este tipo de resistencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. Este sistema focaliza sus esfuerzos en la resistencia a los F antibacterianos por su gran emergencia y, actualmente, es considerado como de máxima prioridad para la organización. Tal es su relevancia que se actualiza de forma periódica la lista de los antibacterianos de importancia crítica para la medicina humana y, en el 2017, se emitió una lista mundial de patógenos prioritarios resistentes a antibacterianos con el fin de priorizar las investigaciones y el desarrollo de nuevos tratamientos con este tipo de F [41], [42].

Los F antibacterianos son el tratamiento usual contra infecciones bacterianas y pueden considerarse como compuestos que matan a las bacterias o que detienen su desarrollo, con dependencia de su habilidad para bloquear procesos celulares bacterianos críticos. De acuerdo con su principal mecanismo de acción, la mayoría de F antibacterianos pueden: inhibir la síntesis de la pared celular, la síntesis proteica o la vía

metabólica, interrumpir la estructura de la membrana bacteriana o interferir con la síntesis de ácidos nucleicos [38].

Dentro de los agentes que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos se encuentran los fármacos antimicrobianos quinolónicos (FAQ), considerados por la OMS como F antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana y de máxima prioridad (de acuerdo con los criterios de priorización de esta organización) [43].

1.3.1. Fármacos antimicrobianos quinolónicos (FAQ)

Las quinolonas son una clase de F antimicrobianos sintéticos comúnmente utilizados a nivel mundial para combatir infecciones causadas por bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Estos agentes se han usado para tratar infecciones del tracto respiratorio y urinario, infecciones gastrointestinales y de la piel, osteomielitis, enfermedades de transmisión sexual, meningitis bacteriana, entre otras [44], [45].

El origen de estos agentes comenzó con el descubrimiento del HNal, por George Leshner y colaboradores en 1962 [46]. Un año después, el HNal fue utilizado clínicamente con el fin de combatir infecciones del tracto urinario [47].

Con el pasar del tiempo, las quinolonas que fueron sintetizándose se empezaron a clasificar, con dependencia de su actividad *in vitro*, dentro de cuatro generaciones. Para la década de 1970 se desarrollaron e introdujeron en el uso clínico varias quinolonas de primera generación, que eran efectivas frente a bacterias Gram-negativas pero que presentaban nula actividad frente a bacterias Gram-positivas y anaerobias. Algunos ejemplos de esta generación son el HNal, flumequina, cinoxacina y ácido pipemídico [45].

Las quinolonas fueron de relativo bajo uso hasta que a inicios de la década de 1980 se desarrolló la segunda generación de estos compuestos, que empezó con la síntesis de la norfloxacin [48]. Otros ejemplos notables son la ciprofloxacina (Cip), ofloxacina, enoxacina, fleroxacin y lomefloxacina. Esta generación de quinolonas presentó un incremento considerable de la actividad antimicrobiana frente a Gram-negativas y una

moderada actividad frente a Gram-positivas. Los cambios significativos en esta generación de compuestos fueron: la introducción de un grupo fluoruro en el carbono 6 (C-6), motivo por el cual estos compuestos se empezaron a denominar fluoroquinolonas; y, la colocación de un sustituyente en el anillo central (piperazina o metilpiperazina), en el carbono 7 (C-7) [49].

Para el presente trabajo, dentro de los FAQ se seleccionaron al HNal y a la Cip como F modelo, los cuales se describen en las siguientes secciones.

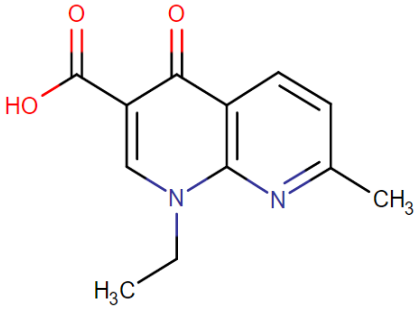
1.3.1.1. *Ácido nalidíxico (HNal)*

El HNal fue utilizado de forma clínica por vía oral, por más de 40 años, para el tratamiento y profilaxis de infecciones relacionadas con el tracto urinario, tanto humano como veterinario. Su uso se limitó al tratamiento de estas afecciones debido a que no se alcanzan concentraciones terapéuticas efectivas de este FAQ en otros sitios diana luego de su administración oral. Este FAQ presenta actividad frente a bacterias Gram negativas, tales como: *Escherichia coli*, especies *Klebsiella* y *Enterobacter*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Providencia rettgeri*; sin embargo, en general las *Pseudomonas* presentan resistencia a este F [50], [51].

Los efectos adversos relacionados con el HNal incluyen: desórdenes del sistema nervioso central, hipersensibilidad, colapso cardiovascular, ruptura del tendón, neuropatía periférica, urticaria, picazón y alteración de la flora normal del colon (como otros agentes antibacterianos), lo que da lugar al crecimiento excesivo de *C. difficile*, asociado a diarrea [51].

En la Tabla 1.1 se presentan la estructura semidesarrollada, el nombre sistemático (IUPAC) y algunas propiedades de interés de este FAQ.

Tabla 1. 1. Estructura, nombre sistemático y propiedades del HNaI [52]

	
Ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃
PM (g/mol)	232,24
S _{ac} (a 23 °C)	100 mg/L
Log P	1,59
Punto de fusión (°C)	229,5
pKa	6,0

PM: peso molar, S_{ac}: solubilidad acuosa, Log P: coeficiente de partición y pKa: constante de disociación ácida

1.3.1.2. Ciprofloxacina (Cip)

La Cip fue uno de los primeros FAQ que mostró actividad significativa fuera del tracto urinario y después de más de 20 años en su uso clínico aún se mantiene como uno de los FAQ mayormente utilizados en la clínica. La Cip se usa para tratar una gran variedad de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas y en menor extensión por bacterias Gram-positivas.

Este FAQ presenta actividad frente a bacterias, tales como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Streptococcus pyogenes* [44].

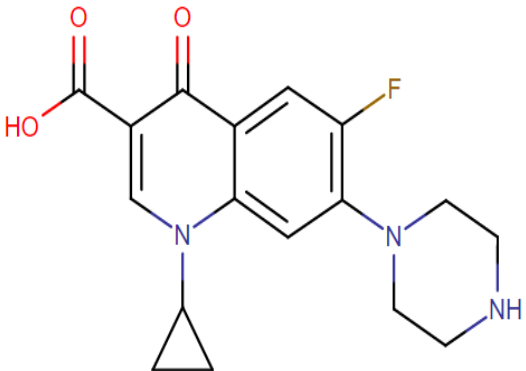
Teniendo en cuenta que los efectos secundarios relacionados con la administración oral de Cip son: irritación gastrointestinal [53], tendinitis, ruptura del

tendón, neuropatía periférica, daños en el sistema nervioso central e intensificación de la miastenia gravis (enfermedad neuromuscular) [44], su administración local por vía tópica podría contribuir a la reducción de estos efectos indeseados.

Comercialmente, la Cip se encuentra como sal de clorhidrato en formas sólidas de liberación inmediata y como base libre en productos en suspensión [54]. Otras formas comerciales disponibles incluyen ungüentos, hidrogeles y soluciones acuosas para administración oftálmica u ótica [55].

En la Tabla 1.2 se presentan la estructura semidesarrollada, el nombre sistemático y algunas de las propiedades de interés de la Cip.

Tabla 1. 2. Estructura, nombre sistemático y propiedades de la Cip
(los valores entre paréntesis pertenecen a la sal clorhidrato) [56]

	
ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico	
Fórmula molecular	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$
PM (g/mol)	331,34 (385,84)
S_{ac} (a 20 °C)	3E+004 mg/L (1,35 mg/mL)
Log P	0,28 (-0,57)
Punto de fusión (°C)	255-257
Punto isoeléctrico (PI) [54]	7,4
pKa	6,1 (ácido carboxílico); 8,7 (amina)

PM: peso molar, S_{ac} : solubilidad acuosa, Log P: coeficiente de partición y pKa: constante de disociación ácida

1.3.1.3. Propiedades químicas de los FAQ que influyen en su eficacia

El efecto terapéutico de los FAQ está determinado por su estructura y puede verse afectado por algunas propiedades químicas tales como la quelación, carácter ácido-base y fotoquímica.

A lo largo de los años se han sintetizado miles de moléculas quinolónicas con diferentes sustituyentes, cuyas posibles posiciones se muestran en la Figura 1.2. La estructura generada determina su actividad y posible toxicidad. Se debe tomar en cuenta que hay una interrelación entre los sustituyentes por lo que algunos modulan los efectos de los otros.

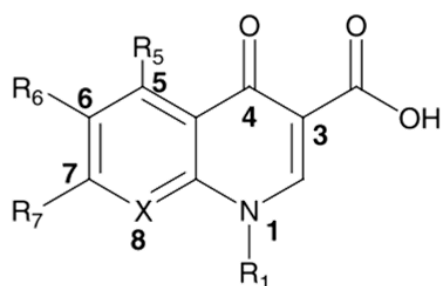


Figura 1. 2. Posiciones de los sustituyentes quinolónicos [45]

Por otra parte, los FAQ pueden formar complejos con iones metálicos, especialmente en soluciones con pH neutro o básico. La mayoría de complejos de FAQ se forman principalmente como quelatos, por coordinación como ligando al metal a través del grupo carbonilo y un átomo de oxígeno del grupo carboxílico [57]. En la Figura 1.3 se presenta la naturaleza química de los quelatos.

La actividad antimicrobiana de los FAQ puede verse afectada por la formación de estos complejos metálicos debido a que, con dependencia del metal, la actividad puede ser mayor o menor que la del FAQ libre [58]. Por ejemplo, la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de complejos de HNaI con Au incrementa, mientras que con Ca disminuye o se mantiene [59]. Además, determinados complejos metálicos, agravan los efectos secundarios o tóxicos de los FAQ como la fotosensibilidad, erosión del tendón e incluso pueden fomentar la resistencia bacteriana [57].

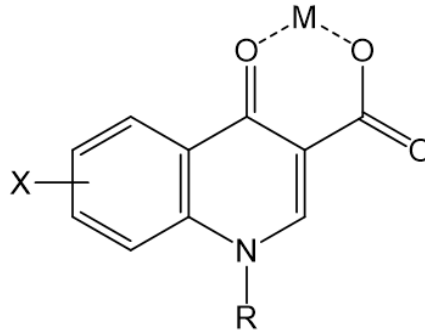


Figura 1. 3. Naturaleza química de la quelación [57]

En cuanto al comportamiento ácido-base, las quinolonas consideradas como ácidas, como el HNal, a pH inferiores a su pKa se presentan como especies neutras y a pH superiores a su pKa se presentan como aniones o sales de carboxilato (forma más soluble). Por otro lado, las fluoroquinolonas de importancia clínica, como la Cip, tienen carácter anfótero. Consecuentemente, su solubilidad acuosa mínima se encuentra a pH neutro, donde se encuentra la forma zwitterionica. A pH extremos se presentan como sales, a pH básico como sales de carboxilato y a pH ácido como sales de amina protonada y, por lo tanto, tienen mayor solubilidad en estas condiciones generalmente no fisiológicas [57]. En la Figura 1.4 se presentan los diagramas de distribución de especie para el HNal y para la Cip en función del pH.

Además, los FAQ pueden reaccionar en presencia de luz, especialmente en condiciones ácidas o neutras. Como producto de estas reacciones se generan radicales libres intermedios, y la naturaleza de los productos finales depende de la estructura de la quinolona y de las condiciones de la reacción. En la Figura 1.5.a se presenta la fotoquímica del HNal cuya fotodegradación produce compuestos inactivos frente a bacterias. En el caso de la Cip, aunque en menor proporción, también se produce el análogo descarboxilado C-3 H; para este F, que tiene un solo grupo fluoruro en el C-6, se produce un reemplazo fotolítico del átomo de flúor por un grupo hidroxilo, como se muestra en la Figura 1.5.b. Es importante notar que, la fotodegradación de las quinolonas no solo afecta su eficacia antibacteriana, sino que también, se pueden generar especies reactivas del oxígeno, que podrían desencadenar fotosensibilidad como efecto secundario [57].

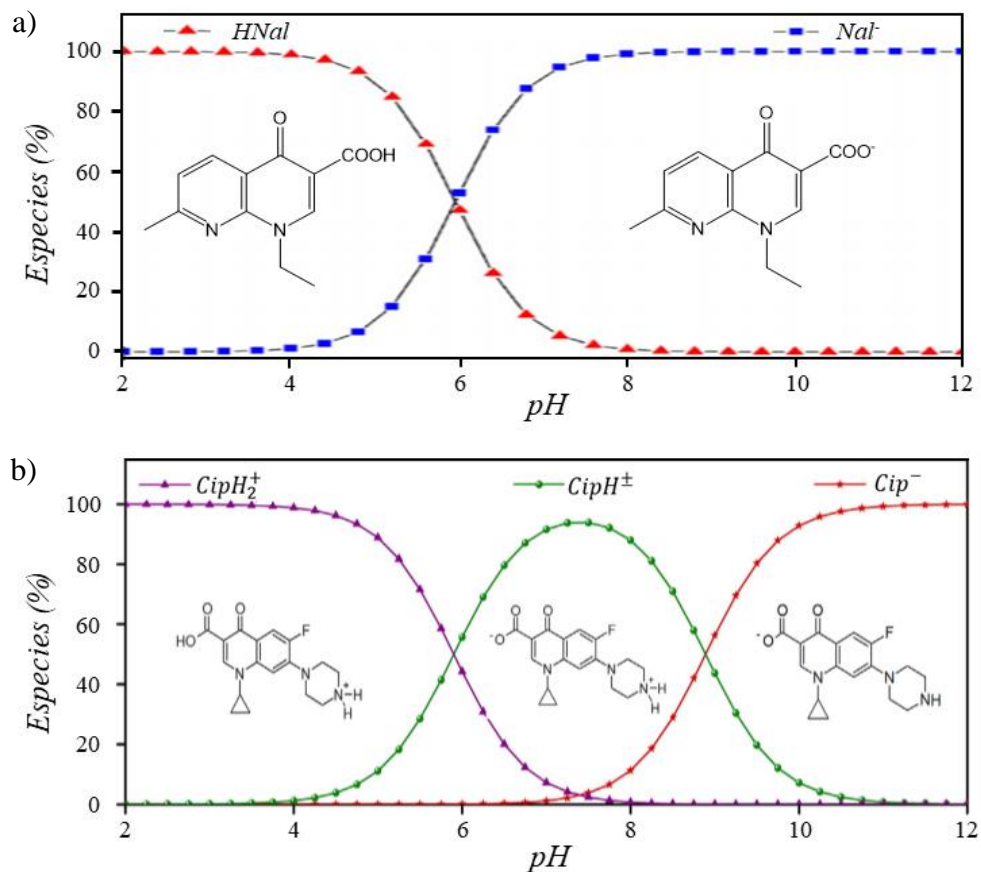


Figura 1. 4. Diagrama de distribución de especies en función del pH de: a) HNaI [60] y b) Cip [61]

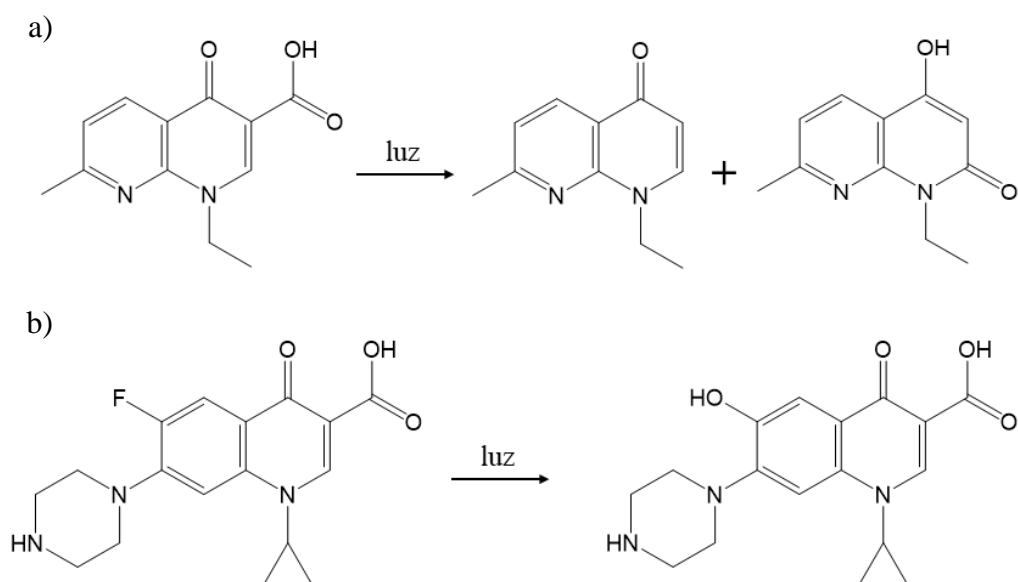


Figura 1. 5. a) fotodegradación del HNaI b) reemplazo fotoquímico del flúor del C-6 por un grupo hidroxilo en la Cip [57]

La fotodegradación de los FAQ, luego de su exposición a la luz solar o fuentes artificiales de radiación UV, puede verse reflejada a través de cambios en su espectro de absorción [62], [63]. En particular, tanto el espectro del HNaI como de la Cip exhiben máximos de absorción entre 250 y 350 nm, lo cuales, luego de irradiarse, presentan cambios en la apariencia de las bandas y disminución gradual de su intensidad hasta su completo desvanecimiento, a medida que progresa la fotodegradación [64]–[67]. La pérdida de la estructura del compuesto de partida, como consecuencia de la fotodegradación, afecta la potencia antibacteriana, como se ha reportado para la Cip frente a *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* [65], [68]–[71].

1.3.1.4. SP de FAQ con base en LDH

Trikeriotis y Ghanotakis (2007) fueron los primeros en obtener LDH de Mg y Al intercalados con HNaI mediante intercambio iónico [31]; mientras que, Sillion *et al.* (2008) sintetizaron LDH de Zn y Al intercalados con Cip mediante los métodos de co-precipitación a pH constante e intercambio iónico [53]. También, Li *et al.* (2016) sintetizaron LDH de Mg y Al intercalados con norfloxacina por el método de delaminación-reapilamiento [32].

Estos SP han sido evaluados para distintas aplicaciones biomédicas. Así, los LDH de Mg y Al cargados con Cip se han propuesto como revestimiento de prótesis para el tratamiento de infecciones, lo que destaca su utilidad como sistema de liberación local de F, mostrando actividad antimicrobiana luego del implante [21]; así como, su capacidad para promover la proliferación de células adherentes en comparación con recubrimientos de solo FAQ [72].

Por otro lado, Rezvani y Shahbaei (2014) estudiaron la utilización de LDH de Zn y Al intercalados con Cip, recubiertos con alginato o quitosano, para prevenir su degradación en el tracto gastrointestinal, enfocándose de esta manera en la vía oral. Los estudios de liberación indicaron que los LDH recubiertos con alginato presentaron una liberación más rápida en comparación con una mezcla directa de alginato y Cip; mientras que, los LDH con recubrimiento de quitosano presentaron una liberación más lenta que las combinaciones quitosano-Cip y alginato-Cip [73].

Por otra parte, también se han desarrollado nanocompuestos de carboximetilcelulosa reticulada con ácido cítrico y LDH intercalados con norfloxacina depositados sobre carbón activado para mejorar su estabilidad coloidal. El estudio indicó que el incremento de la cantidad de carboximetilcelulosa retarda la liberación del FAQ a partir del nanocompuesto, lo cual también se evidenció mediante ensayos microbiológicos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. De esta manera, se podría controlar la velocidad de liberación del FAQ ajustando la cantidad de carboximetilcelulosa; además, el nanocompuesto presentó un comportamiento no tóxico en cultivos celulares, lo que destaca su biocompatibilidad y el potencial uso de estos sistemas como portadores de FAQ [74].

En virtud de lo expuesto, resulta evidente el gran interés en la obtención de SP con base en LDH-FAQ. No obstante, hay una deficiencia en aspectos esenciales para su utilización efectiva, como son la ausencia de estudios sistemáticos de la influencia de las condiciones de síntesis en las propiedades de las nanopartículas, el efecto del tamaño de partícula en la acción antibacteriana, el efecto de la interacción de los FAQ con los cationes metálicos de las láminas de LDH o el estudio de los mecanismos de liberación del FAQ para vías de administración distintas a la oral.

1.4. SP de F con base en LDH para la vía de administración tópica

De las investigaciones enmarcadas en esta área de aplicación se puede notar el escaso desarrollo científico en cuanto a la vehiculización de FAQ en LDH con miras a una administración por vía dérmica o tópica, por lo que el desarrollo de SP de FAQ con base en LDH y su adecuación a una vía tópica constituye un área de investigación a ser explorada.

La administración tópica es un término utilizado para definir una orientación del F a sitios patológicos de la piel, lo que implica asegurar una mínima o nula absorción sistémica; es decir, que el F no alcance la circulación sanguínea y que produzca su acción localmente, lo cual es importante para el tratamiento de afecciones dermatológicas como las infecciones microbianas [75]. En la Tabla 1.3 se enlistan algunas ventajas y limitaciones que existen para esta vía de administración.

Tabla 1. 3. Ventajas y limitaciones asociadas a una administración por vía tópica [75]

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> - Acceso directo al sitio de acción o enfermedad. - Reducción de efectos secundarios asociados con toxicidad sistémica - Administración indolora. - Mayor aceptación y finalización del tratamiento por el paciente. - Fácil terminación del tratamiento en caso de reacciones adversas. - Facilidad de uso, lo cual reduce costos por atención médica. - Se puede conseguir una liberación controlada y sostenida por períodos prolongados de tiempo. - A diferencia de otras vías de administración, la eficiencia del tratamiento no depende del metabolismo. 	<ul style="list-style-type: none"> - El F debe tener un peso molecular inferior a los 500 Da para facilitar su difusión a través del <i>stratum corneum</i>. - Existe una diferencia de permeabilidad de la piel humana intacta y dañada. Esto implica que habrá diferentes perfiles de absorción que darán como resultado respuestas biológicas variables. - Las enzimas presentes en la piel (como peptidasas y esterases) pueden transformar los F en formas terapéuticas inactivas, reduciendo su eficacia. - La exposición a ciertos medicamentos, excipientes o componentes de dispositivos de administración pueden dar lugar a irritación y sensibilización de la piel. - Por razones estéticas y de comodidad, el tamaño del apósito o parche debe ser inferior a los 40 cm²

Para el tratamiento de infecciones microbianas por medio de la administración tópica, se puede optar por formas farmacéuticas tales como ungüentos, cremas, pomadas, geles, vendas, parches o apósitos. Dado que, las formulaciones semisólidas presentan un tiempo de residencia insuficiente, fácil y rápida eliminación desde el sitio de aplicación, rendimiento terapéutico variable y no permiten controlar la dosificación del F [55], el presente trabajo se centró en el desarrollo de apósitos, por medio de films que faciliten la aplicación tópica de los SP de FAQ. Además, cabe mencionar que, aún no existen films comerciales con FAQ para aplicación tópica [55].

Para la obtención del film es necesaria una adecuada interacción del LDH con el polímero formador del film. Algunos estudios sobre estos portadores se han centrado en los efectos que pueden ofrecer al combinarse con componentes orgánicos con el fin de facilitar u optimizar la acción de los sistemas LDH-F y aprovechar las ventajas que ofrecen tanto los componentes inorgánicos como los orgánicos del material híbrido o

compuesto (material inorgánico/orgánico). En este marco, se ha observado un gran interés en la interacción de los LDH con materiales poliméricos.

Vasti, *et al.* (2017) estudiaron el mecanismo de adsorción de polielectrolitos (PE) en nanopartículas de LDH y su efecto sobre la agregación de los LDH. En el estudio se emplearon PE con grupo carboxilato: poliacrilato, alginato y carbomer. Los resultados indicaron que los PE tienen la capacidad de desagregar las partículas e incrementar la estabilidad coloidal de los LDH, especialmente con poliacrilato. Además, la interacción entre estos PE y LDH intercalados con ibuprofeno y ketoprofeno provocó una pérdida de los F inferior al 40 % por lo que la adsorción de PE puede considerarse como una estrategia para modificar las propiedades interfaciales de los LDH intercalados con F y conseguir partículas monodispersas [76].

Además de su uso como cobertura para la protección de los LDH en medios ácidos mencionada anteriormente, los polímeros también se han utilizado por su capacidad formadora de films. Por ejemplo, se han desarrollado films con policaprolactona y LDH intercalados con succinato de cloranfenicol para una administración por vía tópica, en el que se demuestra que el film presenta mejores propiedades mecánicas en comparación con films de polímero puro, y que el F se libera de forma más lenta del film que tiene LDH como SP en comparación con la liberación del F incorporado directamente en la matriz polimérica [77].

Para el presente estudio, la adecuación del SP para una administración tópica se consiguió por medio de la formación de films con base en hialuronato de sodio (HS). El HS se seleccionó debido a que, además de su capacidad formadora de films, es biocompatible, biodegradable, no presenta inmunogenicidad y tiene carácter bioadhesivo [78], [79].

El HS (Figura 1.6) es la sal sódica del ácido hialurónico. A su vez, el ácido hialurónico, también conocido como hialuronano, es un PE natural compuesto por unidades repetitivas de ácido D-glucorónico- $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-glucosamina unidas a través de enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ [78]. Debido a que posee un grupo carboxilato en cada unidad glucorónica, desarrolla cargas negativas a lo largo de toda la cadena

polimérica, permitiéndolo interactuar con compuestos de carga positiva para formar complejos iónicos [79].

El ácido hialurónico ha sido extensamente utilizado en aplicaciones biomédicas, tales como: terapia para el cáncer [80], diseño de sistemas de liberación para vía parenteral [81] complejos PE-F [82], terapia génica para tratamiento de enfermedades oculares [83] y sistema de liberación de F con aplicación tópica, ya sea de carácter dérmico [78] o transdérmico [84].

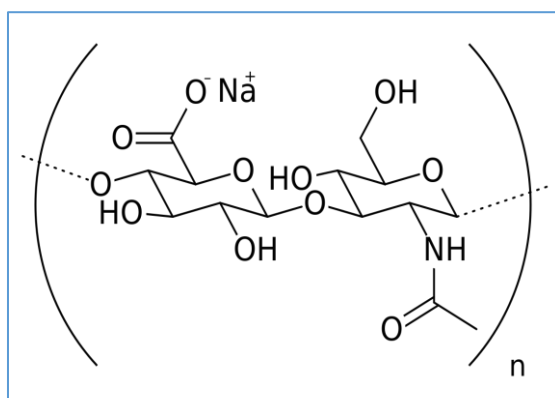


Figura 1. 6. Unidad constitutiva de repetición del HS

1.5. Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis fue el desarrollo de (nano)materiales inorgánicos/orgánicos como sistemas portadores de FAQ. A tales fines, se adoptó un enfoque global, en el que se estudió desde la obtención de los SP cargados con los FAQ, la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas, hasta el diseño y evaluación de una forma farmacéutica adecuada para la vía de administración tópica.

La estrategia propuesta para concretar este objetivo se basó en los siguientes objetivos específicos:

- Obtener SP con base en LDH-FAQ
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los SP
- Diseñar un apósito con base en los SP obtenidos
- Evaluar la forma farmacéutica para una vía de administración tópica

En particular, este trabajo de investigación se limitó al estudio de SP constituidos por HNaI o Cip, como ingredientes activos, y LDH de Mg-Al o de Zn-Al como portadores.

En un primer paso, se seleccionó al HNaI como F modelo para estudiar el efecto de su desarrollo como nanopartículas y las interacciones entre el FAQ y los cationes metálicos de las láminas.

La experiencia obtenida con este FAQ sentó las bases necesarias para optimizar la síntesis de los SP basados en LDH cargados con Cip. Para su aplicación tópica, se seleccionó al film como forma farmacéutica a manera de apósito, para lo cual los LDH cargados con Cip fueron incorporados en una matriz polimérica de HS. Además, se realizó una caracterización estructural, morfológica, biofarmacéutica y ensayos antimicrobianos para evaluar su eficacia.

La importancia de esta investigación, desde el punto de vista científico, se relaciona con la posibilidad de generar nuevos conocimientos en la síntesis y modificación de materiales, el estudio de las interacciones matriz-huésped, las propiedades interfaciales de intercambiadores de aniones y los atributos de relevancia biofarmacéutica de los SP. Desde el punto de vista aplicado, se espera que los resultados obtenidos de este trabajo de investigación permitan, a mediano y largo plazo, desarrollar nuevas formulaciones farmacéuticas de FAQ, plausibles de ser aplicados por vía tópica, que permitan modular la liberación de los FAQ y disminuyan la incidencia de sus efectos adversos. Además, la acción local a nivel de la piel resulta de gran relevancia, ya que ofrecería nuevas alternativas a la terapia antimicrobiana para la vía tópica.

1.6. Referencias bibliográficas

- [1] L. Allen and H. C. Ansel, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [2] K. Park, "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 3–8, 2014.

- [3] ANMAT, *Farmacopea Argentina. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina*, 7ma ed. 2013.
- [4] A.E.M.P.S. (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), “Formas farmacéuticas,” in *Real Farmacopea Española*, vol. 3, no. almacenamiento por forma farmaceutica, 2a, Ed. 2002, pp. 578–619.
- [5] United States Pharmacopeial Convention, “The national formulary and dispensing information. USP38–NF33,” *Pharmacopeia Convention*, Ed. Rockville, 2015, p. 1884.
- [6] S. S. Ray, D. Mosangi, and S. Pillai, “Layered Double Hydroxide-Based Functional Nanohybrids as Controlled Release Carriers of Pharmaceutically Active Ingredients,” *Chem. Rec.*, pp. 1–16, 2018.
- [7] S. Jayrajsinh, G. Shankar, Y. K. Agrawal, and L. Bakre, “Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 39, pp. 200–209, 2017.
- [8] V. Rives, M. Arco, and C. Martín, “Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release : A review,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [9] V. Rives, *Layered double hydroxides: present and future*. New York: Nova Science Publishers, 2001.
- [10] D. G. Evans and R. C. T. Slade, “Structural Aspects of Layered Double Hydroxides,” in *Structure & Bonding*, vol. 119, no. 2005, D. G. Evans and X. Duan, Eds. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 1–87.
- [11] W. Feitknecht and G. Fischer, “Zur Chemie und Morphologie der basischen Salze zweiwertiger Metalle III. Über basische Kobaltchloride. (X. Mitteilung über basische Salze),” *Helv. Chim. Acta*, vol. 18, no. 1, pp. 555–569, 1935.
- [12] M. Feitknecht, W ; Gerber, “Zur Kenntnis der Doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über Magnesium-Aluminiumdoppelhydroxyd,” *Helv. Chim. Acta*, vol. 25, no. 1, pp. 131–137, 1942.

- [13] R. Rojas, D. Aristizábal-Bedoya, C. Vasti, and C. E. Giacomelli, “LDH nanoparticles: Synthesis, size control and applications in nanomedicine,” in *Layered Double Hydroxides (LDHs): Synthesis, Characterization and Applications*, I. T. Sherman, Ed. New York: Nova Science Publishers, 2015, pp. 101–120.
- [14] M. Zhao, Q. Zhao, B. Li, H. Xue, H. Pang, and C. Chen, “Recent progress in layered double hydroxide based materials for electrochemical capacitors: Design, synthesis and performance,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 40, pp. 15206–15225, 2017.
- [15] J. Yu, Q. Wang, D. O’Hare, and L. Sun, “Preparation of two dimensional layered double hydroxide nanosheets and their applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, no. 19, pp. 5950–5974, 2017.
- [16] M. Zubair, M. Daud, G. McKay, F. Shehzad, and M. A. Al-Harhi, “Recent progress in layered double hydroxides (LDH)-containing hybrids as adsorbents for water remediation,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 143, no. April, pp. 279–292, 2017.
- [17] Z. Ping *et al.*, “Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles,” *J. Control. Release*, vol. 130, pp. 86–94, 2008.
- [18] A. J. Marchi and C. R. Apesteguía, “Impregnation-induced memory effect of thermally activated layered double hydroxides,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 35–48, 1998.
- [19] J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D. G. Evans, and X. Duan, “Preparation of layered double hydroxides,” in *Layered Double Hydroxides*, vol. 119, no. September 2005, 2006, pp. 89–119.
- [20] V. Rives, M. Del Arco, and C. Martín, “Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review,” *J. Control. Release*, vol. 169, no. 1–2, pp. 28–39, 2013.
- [21] D. Hesse *et al.*, “Layered double hydroxides as efficient drug delivery system of ciprofloxacin in the middle ear: An animal study in rabbits,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 129–136, 2013.

- [22] M. L. Parello, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 134–139, 2010.
- [23] R. Rojas, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 463, pp. 37–43, 2014.
- [24] S. Saha, S. Ray, R. Acharya, T. Kumar, and J. Chakraborty, "Magnesium , zinc and calcium aluminium layered double hydroxide-drug nanohybrids : A comprehensive study," *Appl. Clay Sci.*, vol. 135, pp. 493–509, 2017.
- [25] D. Li, X. Xu, J. Xu, and W. Hou, "Poly(ethylene glycol) haired layered double hydroxides as biocompatible nanovehicles: Morphology and dispersity study," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 384, no. 1–3, pp. 585–591, 2011.
- [26] Z. Gu, H. Zuo, L. Li, A. Wu, and Z. P. Xu, "Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 16, pp. 3331–3339, 2015.
- [27] J. M. Oh, S. J. Choi, G. E. Lee, S. H. Han, and J. H. Choy, "Inorganic drug-delivery nanovehicle conjugated with cancer-cell-specific ligand," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 10, pp. 1617–1624, 2009.
- [28] D. Aristizabal-Bedoya, C. Vasti, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Risedronate functionalized layered double hydroxides nanoparticles with bone targeting capabilities," *Appl. Clay Sci.*, vol. 141, pp. 257–264, 2017.
- [29] R. Rojas, Y. Garro, S. L. Cuffini, G. A. Monti, and C. E. Giacomelli, "Structural and physicochemical aspects of drug release from layered double hydroxides and layered hydroxide salts," *Appl. Clay Sci.*, vol. 109–110, pp. 119–126, 2015.
- [30] J. Wang *et al.*, "Synthesis, sustained release properties of magnetically functionalized organic-inorganic materials: Amoxicillin anions intercalated magnetic layered double hydroxides via calcined precursors at room temperature," *Solid State Sci.*, vol. 11, no. 9, pp. 1597–1601, 2009.

- [31] M. Trikeriotis and D. F. Ghanotakis, "Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides," *Int. J. Pharm.*, vol. 332, no. 1–2, pp. 176–184, 2007.
- [32] Y. Li *et al.*, "Intercalation of Norfloxacin into Layered Double Hydroxides by Delamination / Restacking Process and its Controlled-Release Property," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 37, pp. 366–373, 2016.
- [33] M. S. San Román, M. J. Holgado, B. Salinas, and V. Rives, "Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure," *Appl. Clay Sci.*, vol. 55, pp. 158–163, 2012.
- [34] S. J. Ryu, H. Jung, J. M. Oh, J. K. Lee, and J. H. Choy, "Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 71, no. 4, pp. 685–688, 2010.
- [35] G. Mishra, B. Dash, D. Sethi, S. Pandey, and B. K. Mishra, "Orientation of Organic Anions in Zn-Al Layered Double Hydroxides with Enhanced Antibacterial Property," *Environ. Eng. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 516–527, 2017.
- [36] S. Malekhaat Häffner *et al.*, "Membrane interactions and antimicrobial effects of layered double hydroxide nanoparticles," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 35, pp. 23832–23842, 2017.
- [37] A. Schmidtchen and M. Malmsten, "Peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 18, no. 5, pp. 381–392, 2013.
- [38] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria," *Am. J. Infect. Control*, vol. 34, no. 5 SUPPL., 2006.
- [39] American Chemical Society, "Discovery and development of penicillin," *International Historic Chemical Landmarks*, 1999. [Online]. Available: http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/fleming_penicillin.html. [Accessed: 23-Jun-2018].
- [40] E. Banin, D. Hughes, and O. P. Kuipers, "Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 450–452, 2017.

- [41] OMS, “Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics,” 2017.
- [42] OMS, “Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo,” 2018. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>. [Accessed: 13-Jun-2018].
- [43] OMS, “Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana (Lista OMS de AIC),” 2017.
- [44] BayerHealthCare, “Ciprofloxacin,” 2016. [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/019537s086lbl.pdf.
- [45] C. Limberaskis, “Quinolone Antibiotics: Levofloxacin (Levaquin®), Moxifloxacin (Avelox®), Gemifloxacin (Factive®), and Garenoxacin (T-3811),” in *The art of drug synthesis*, D. Johnson and J. Li, Eds. Wiley, 2006, pp. 39–70.
- [46] G. Leshner, E. Froelich, M. Gruett, J. Hays, and P. Brundage, “1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents,” *J. Med. Chem.*, vol. 5, no. 5, pp. 1063–1065, 1962.
- [47] A. M. Barlow, “Nalidixic acid in infections of urinary tract,” *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 5368, pp. 1308–1310, 1963.
- [48] H. Koga, A. Itoh, S. Murayama, S. Suzue, and T. Irikura, “Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids.,” *J. Med. Chem.*, vol. 23, no. 2, pp. 1358–1363, 1980.
- [49] K. J. Aldred, R. J. Kerns, and N. Osheroff, “Mechanism of quinolone action and resistance,” *Biochemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 1565–1574, 2014.
- [50] S. Gangavaram *et al.*, “Polymorphs and cocrystals of nalidixic acid,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 12, no. 10, pp. 4963–4971, 2012.
- [51] Sanofi-aventis U.S. LLC, “NegGram Caplets (nalidixic acid, USP),” 2008. [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/014214s058lbl.pdf. [Accessed: 20-Jun-2018].

- [52] Drugbank, "Nalidixic acid." [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00779>. [Accessed: 20-Jun-2018].
- [53] M. Sillion, M. I. Popa, G. Lisa, and D. Hritcu, "New Hybrid Compounds Containing Intercalated Ciprofloxacin Into Layered Double Hydroxides: Synthesis and characterization," *Rev. Roum. Chim.*, vol. 53, no. 9, pp. 827–831, 2008.
- [54] X. Li, F. Zhi, and Y. Hu, "Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin," *Int. J. Pharm.*, vol. 328, no. 2, pp. 177–182, 2007.
- [55] M. C. García *et al.*, "Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 175, pp. 75–86, 2017.
- [56] Drugbank, "Ciprofloxacin." [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>. [Accessed: 20-Jun-2018].
- [57] L. a Mitscher, "Bacterial Topoisomerase Inhibitors : Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents Bacterial Topoisomerase Inhibitors : Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents," *Amercian Chem. Soc.*, vol. 105, pp. 559–592, 2005.
- [58] I. Turel, "The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 232, no. 1–2, pp. 27–47, 2002.
- [59] F. A. I. Al-Khodir and M. S. Refat, "Synthesis, structural characterization and biological studies of some nalidixic acid-metal complexes: Metalloantibiotic complexes of some divalent and trivalent metal ions," *J. Mol. Struct.*, vol. 1094, pp. 22–35, 2015.
- [60] Q. Wu, Z. Li, and H. Hong, "Adsorption of the quinolone antibiotic nalidixic acid onto montmorillonite and kaolinite," *Appl. Clay Sci.*, vol. 74, pp. 66–73, 2013.
- [61] M. E. Roca, M. Baschini, and K. Sapag, "Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite," *Appl. Clay Sci.*, vol. 114, pp. 69–76, 2015.
- [62] L. V. de Souza Santos, A. M. Meireles, and L. C. Lange, "Degradation of antibiotics norfloxacin by Fenton, UV and UV/H₂O₂," *J. Environ. Manage.*, vol. 154, pp. 8–12, 2015.

- [63] J. Ferguson, "Fluoroquinolone photosensitization: a review of clinical and laboratory studies," *Photochem. Photobiol.*, vol. 62, no. 6, pp. 954–958, 1995.
- [64] F. Vargas, C. Rivas, and R. Machado, "Decarboxylation and singlet oxygen production in the photolysis of nalidixic acid," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 11, pp. 81–85, 1991.
- [65] M. Matsumoto, K. Kojima, H. Nagano, S. Matsubara, and T. Yokota, "Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 36, no. 8, pp. 1715–1719, 1992.
- [66] K. Torniainen and E. Maki, "Development of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for monitoring of ciprofloxacin photodegradation," vol. 697, pp. 397–405, 1995.
- [67] K. Torniainen, S. Tammilehto, and V. Ulvi, "The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin," vol. 132, pp. 53–61, 1996.
- [68] J. Porras, C. Bedoya, J. Silva-Agredo, A. Santamaría, J. J. Fernández, and R. A. Torres-Palma, "Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic ciprofloxacin in water," *Water Res.*, vol. 94, pp. 1–9, 2016.
- [69] L. Ge *et al.*, "New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes," *Sci. Total Environ.*, vol. 527–528, pp. 12–17, 2015.
- [70] T. Paul, M. Dodd, and T. Strathmann, "Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity," *Water Res.*, vol. 44, pp. 3121–3132, 2010.
- [71] G. Phillips, B. E. Johnson, and J. Ferguson, "The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 26, no. 6, pp. 783–789, 1990.
- [72] M. Badar *et al.*, "Controlled drug release from antibiotic-loaded layered double hydroxide coatings on porous titanium implants in a mouse model," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 6, pp. 2141–2149, 2015.

- [73] Z. Rezvani and M. Shahbaei, "Bionanocomposites Based on Alginate and Chitosan/Layered Double Hydroxide with Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties," *Polym. Polym. Compos.*, pp. 1–7, 2014.
- [74] N. B. Allou, A. Yadav, M. Pal, and R. L. Goswamee, "Biocompatible nanocomposite of carboxymethyl cellulose and functionalized carbon–norfloxacin intercalated layered double hydroxides," *Carbohydr. Polym.*, vol. 186, no. September 2017, pp. 282–289, 2018.
- [75] M. B. Brown, G. P. Martin, S. A. Jones, and F. K. Akomeah, "Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects," *Drug Deliv.*, vol. 13, no. 3, pp. 175–187, 2006.
- [76] C. Vasti, A. Borgiallo, C. E. Giacomelli, and R. Rojas, "Layered double hydroxide nanoparticles customization by polyelectrolyte adsorption: mechanism and effect on particle aggregation," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 533, no. June, pp. 316–322, 2017.
- [77] L. Tammaro *et al.*, "Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 29, no. 4, pp. 417–423, 2007.
- [78] D. Šmejkalová *et al.*, "Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 156, pp. 86–96, 2017.
- [79] F. D. Battistini, J. Flores-Martin, M. E. Olivera, S. Genti-Raimondi, and R. H. Manzo, "Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2014.
- [80] R. G. Thomas, M. J. Moon, S. J. Lee, and Y. Y. Jeong, "Paclitaxel loaded hyaluronic acid nanoparticles for targeted cancer therapy: In vitro and in vivo analysis," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 510–518, 2015.
- [81] F. Lee, J. E. Chung, and M. Kurisawa, "An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery," *J. Control. Release*, vol. 134, no. 3, pp. 186–193, 2009.

- [82] F. D. Battistini, M. E. Olivera, and R. H. Manzo, "Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 588–594, 2013.
- [83] P. S. Apaolaza, D. Delgado, A. Del Pozo-Rodríguez, A. R. Gascón, and M. Á. Solinís, "A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases," *Int. J. Pharm.*, vol. 465, no. 1–2, pp. 413–426, 2014.
- [84] M. Kong, X. G. Chen, D. K. Kweon, and H. J. Park, "Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 2, pp. 837–843, 2011.

CAPÍTULO II

Materiales y métodos

Capítulo II: Materiales y métodos

2.1. Reactivos y materiales

Se utilizaron los siguientes reactivos grado pro-análisis, sin tratamiento ni purificación adicional:

- Cloruro de magnesio hexahidratado: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Anedra[®])
- Cloruro de aluminio hexahidratado: $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Anedra[®])
- Cloruro de zinc: ZnCl_2 (Tetrahedron[®])
- Granallas de hidróxido de sodio: NaOH (Cicarelli[®])
- Solución de ácido clorhídrico: HCl al 37 % (Cicarelli[®])
- Fosfato diácido de potasio: KH_2PO_4 (Anedra[®])
- Cloruro de sodio: NaCl (Parafarm[®])
- Glicerina (Gli): $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Todo Droga)
- Hialuronato de sodio (HS): $(\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_{11}\text{Na})_n$ (Parafarm[®])
- Bromuro de potasio grado espectroscópico: KBr (Merck[®])

Así como los fármacos antimicrobianos quinolónicos (FAQ):

- Ácido nalidíxico (HNal): $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ (Sigma–Aldrich[®])
- Ciprofloxacina clorhidrato (CipHCl): $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Parafarm[®])

Para los ensayos de liberación se utilizó:

- Membrana de acetato de celulosa semisintética (12 kDa, Sigma–Aldrich[®])

Y para los ensayos microbiológicos se emplearon:

- Agar y caldo Müeller Hinton (Britania[®])

Todos los experimentos fueron realizados con agua bidestilada (18,2 M Ω MilliQ, Sistema Millipore). El agua utilizada para la síntesis, lavados y re-dispersión de LDH fue

descarbonatada por medio de ebullición (15 min) y burbujeo de N₂ (15 min). Además, durante la síntesis y caracterización de los sistemas portadores (SP) de F antimicrobianos quinolónicos (FAQ) el material de laboratorio fue cubierto con papel aluminio para evitar la fotodegradación de los FAQ.

2.2. Obtención de SP

En el presente trabajo se sintetizaron SP basados en LDH conteniendo la forma aniónica tanto del HNaI (NaI⁻) como de Cip (Cip⁻). En el caso del NaI⁻, se sintetizaron dos tipos de SP por medio de dos vías de síntesis directa por co-precipitación: el primero a pH variable (pHvar) y el segundo a pH constante (pHcte). Por otro lado, el SP de Cip⁻ se sintetizó por co-precipitación a pHvar, el cual fue posteriormente utilizado para la obtención de films (sección 2.5).

2.2.1. Síntesis de LDH-Nal por co-precipitación a pH var

Los LDH-Nal se sintetizaron mediante la rápida adición (menos de 10 s) de 100 mL de solución que contenía MgCl₂ (0,3 mol L⁻¹) y AlCl₃ (0,1 mol L⁻¹), a una disolución básica del FAQ (NaI⁻). La disolución del FAQ se preparó de forma previa al incorporar 90 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ a 200 mL de agua descarbonatada y 0,01 mol de HNaI. La homogeneidad de la mezcla resultante se aseguró mediante una fuerte agitación, provista por un dispersor Ultra-Turrax[®] IKA[®] T25 a 24000 rpm, por 30 s. En la Figura 2.1 se muestra un esquema de la síntesis.

Los sólidos obtenidos fueron separados por centrifugación (centrífuga Beckman Coulter Allegra[™] 21) a 8000 rpm por 10 min, lavados dos veces y re-dispersados en agua hasta un volumen final de 400 mL de dispersión. Posteriormente, se sometieron a una maduración hidrotérmica, la cual consistió en colocar la dispersión acuosa en un recipiente de teflón hermético para llevar a cabo un tratamiento térmico con presión autogenerada a 80 °C por 4 h, en una estufa.

La muestra obtenida se denominó LDH-Nal-pHvar y parte de ella fue liofilizada para su posterior caracterización estructural.

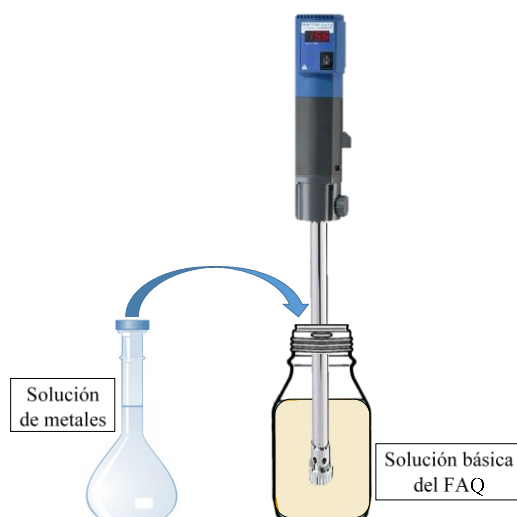


Figura 2. 1. Síntesis directa por co-precipitación a pH variable

2.2.2. Síntesis de LDH-Nal por co-precipitación a pH cte

En un reactor que contenía 200 mL de agua descarbonatada y 0,01 mol de HNaI (pH=9), se añadieron, gota a gota, 100 mL de solución de MgCl_2 ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) y AlCl_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Durante este proceso, el pH del medio se mantuvo constante en nueve mediante la adición de una solución 1 mol L^{-1} de NaOH. La síntesis se realizó bajo agitación y burbujeo de nitrógeno, como se muestra en la Figura 2.2.

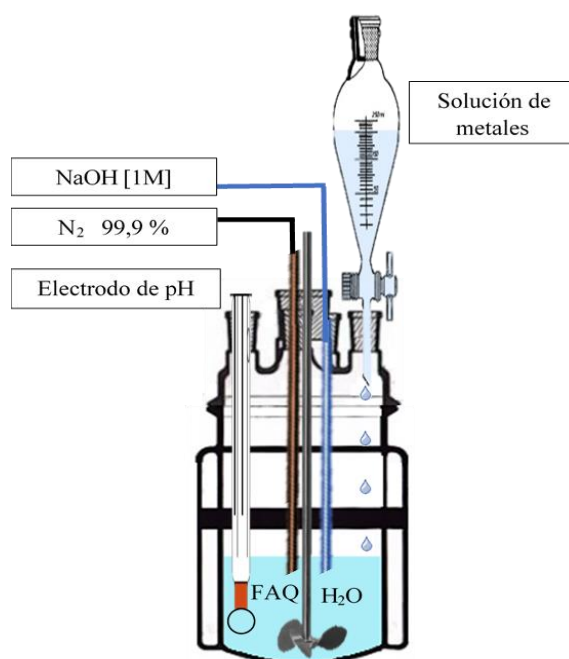


Figura 2. 2. Síntesis directa por co-precipitación a pH constante

Una vez finalizada la síntesis, los sólidos fueron procesados de acuerdo con lo detallado en la sección 2.2.1. La muestra obtenida se denominó LDH-Nal-pHcte.

2.2.3. Síntesis de LDH-Cip

La síntesis consistió en la rápida adición (menos de 10 s) de 50 mL de solución que contenía ZnCl_2 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) y AlCl_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), a una disolución básica del FAQ a intercalar (Cip^-). La disolución del FAQ se preparó de forma previa al incorporar 40 mL de NaOH 1 mol L^{-1} a 100 mL de agua descarbonatada y 0,005 mol de Cip en su forma clorhidrato. Para favorecer la homogeneidad de la mezcla resultante, se agitó a 24000 rpm, por 30 s con un dispersor Ultra-Turrax® IKA® T25.

Los sólidos obtenidos fueron separados por centrifugación (centrífuga Beckman Coulter Allegra™ 21) a 8000 rpm por 10 min, lavados dos veces con agua descarbonatada y deshidratados en una estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Posteriormente, se disminuyó el tamaño de partícula de la muestra con un mortero de ágata y se la etiquetó como LDH-Cip.

2.3. Síntesis de muestras de referencia

Con fines comparativos, para confirmar la reacción de los reactivos precursores y la obtención de los productos deseados, se sintetizaron las siguientes muestras de referencia:

- LDH intercalados con el anión cloruro (LDH-Cl). Se obtuvieron de la forma descrita en la sección 2.2.1 pero en ausencia de FAQ.
- Sales de sodio de los FAQ (NalNa; CiprNa). Se obtuvieron mediante la neutralización de la forma ácida del FAQ con una solución de NaOH 1 mol L^{-1} . Posteriormente, se ajustó el pH en 11 y se liofilizaron las soluciones resultantes.

- Complejos de los metales divalentes que componen las láminas con las formas aniónicas de los FAQ (MgNaI_2 y ZnCip_2). Se consiguieron por la mezcla de volúmenes equivalentes de soluciones $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloruros de metales divalentes con soluciones $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaI o CipNa , respectivamente. Los sólidos obtenidos fueron lavados y liofilizados para su posterior caracterización.

2.4. Caracterización fisicoquímica de los SP

La caracterización fisicoquímica de los SP inició con la caracterización estructural por medio de las técnicas de difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Posteriormente, se determinó la fórmula que representa a cada sistema por medio de la caracterización química y térmica, a través de análisis elementales, termogravimétrico (TGA) y térmico-diferencial (DTA), así como espectrofotometría UV-Visible (UV-Vis). Además, se determinó su tamaño, propiedades interfaciales y morfología, con las técnicas de espectroscopía de correlación fotónica (DLS), dispersión de luz electroforética (DLE) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La caracterización fisicoquímica se complementó con el estudio de la interacción de las láminas de los LDH con los FAQ por medio de valoraciones ácido-base y ensayos de adsorción.

2.4.1. Difracción de rayos X (DRX)

En el caso de los LDH-FAQ y sus respectivas muestras de referencia, se procedió a utilizar DRX de polvos (DRXP), para lo cual, la muestra deshidratada y molida se colocó en un porta-muestras adecuado, procurando una superficie plana.

Los patrones de DRX se obtuvieron en ángulos entre 5° y 70° , en unidades 2θ , con un voltaje de 40 kV e intensidad de 40 mA trabajando en modo continuo. De forma adicional, las muestras que contenían LDH-FAQ se midieron en ángulos entre $1,5^\circ$ y 5° , en unidades 2θ . El equipo utilizado fue un difractómetro Philips X'pert Pro equipado con

lámpara de Cu K α ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) y un detector Pixcell 1D. Los patrones se analizaron con el programa X'Pert HighScore versión 2.1b (2005).

Esta técnica se utilizó principalmente para la identificación de fases presentes en las muestras y la verificación de la intercalación del anión de interés a través de la determinación del espaciado interlaminar de los LDH.

2.4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los LDH-FAQ y de las muestras de referencia se registraron a partir de pastillas de KBr (1:200 muestra:KBr) en un equipo Bruker IFS28, entre 4000 y 400 cm^{-1} , con 32 scans y 2 cm^{-1} de resolución.

Los espectros generados por esta técnica se utilizaron para verificar la presencia del anión de interés, FAQ libre o complejos metálicos.

2.4.3. Análisis químico elemental

El contenido de C y N se determinó por el método Pregl–Dumas, en un analizador elemental Perkin–Elmer 2400 Series II CHNS/O. La sustancia patrón utilizada para calibrar los porcentajes de los elementos fue la acetanilida. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y fueron tercerizados como servicio al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV).

Estos resultados, junto con los de espectrofotometría UV-Vis, TGA y EDS, fueron utilizados para establecer la fórmula química de los LDH. Se utilizó como referencia principal el contenido de nitrógeno para establecer la cantidad de FAQ intercalado, debido a que los LDH pueden adsorber cantidades significativas de aniones carbonato, lo cual afecta el contenido de carbono de la muestra y, por lo tanto, no es un indicador confiable al momento de determinar la fórmula química [1].

2.4.4. Espectrofotometría UV-Visible

Esta técnica se utilizó para determinar la cantidad de FAQ incorporado en los LDH y verificar si existieron o no cambios estructurales luego de su intercalación. Para determinar la cantidad de FAQ presente en los SP de HNaI, se realizaron dispersiones $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de LDH-NaI-pHvar y de LDH-NaI-pHcte en una solución tampón fosfato 50 mM a $\text{pH } 7,4$ y se dejaron equilibrar por un período de 24 h . Las muestras se midieron a una longitud de onda (λ) igual a 330 nm . Mientras que, para determinar la cantidad de FAQ presente en los SP de Cip se realizaron dispersiones $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de LDH-Cip en $\text{HCl } 0,2 \text{ M}$, las cuales se dejaron equilibrar hasta la completa disolución de la muestra y posteriormente, se midieron en el espectrofotómetro a una $\lambda = 277 \text{ nm}$. La selección de este medio para realizar la cuantificación se fundamenta en la menor solubilidad de la Cip en pH cercanos a la neutralidad [2]. Los experimentos se realizaron por triplicado en un equipo Shimadzu UV1601 sobre muestras previamente centrifugadas y filtradas ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$). La concentración de los FAQ se determinó con su respectiva curva de calibración, las cuales fueron previamente construidas en la solución tampón fosfato ($\epsilon = 10865 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y en $\text{HCl } 0,2 \text{ M}$ ($\epsilon = 39374 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para NaI y Cip, respetivamente. Estos resultados se utilizaron para establecer la fórmula química de los LDH.

Además, esta técnica se empleó para cuantificar la cantidad de FAQ liberado a partir de los SP en diferentes medios. La λ de medición y el ϵ obtenido para cada curva de calibración se especifican en la sección 2.6 correspondiente a los estudios de liberación *in vitro* de FAQ.

2.4.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico-diferencial (DTA)

El TGA se empleó para determinar el contenido de agua y de masa total de los LDH, los cuales se utilizaron para establecer la fórmula química de los SP. Por otro lado, el DTA permitió identificar los procesos de degradación térmica de los materiales obtenidos. Con fines comparativos, el TGA y DTA también se realizaron sobre las muestras de referencia. Los ensayos fueron llevados a cabo en un equipo Shimadzu DTG-60, en atmósfera oxidante, con un flujo de aire de 75 mL min^{-1} y una rampa de temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

2.4.6. Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)

La EDS se empleó para determinar la relación Mg:Al existente en las muestras de LDH-Nal y la relación Zn:Al en las muestras de LDH-Cip. La preparación de las muestras consistió en colocar los LDH-FAQ deshidratados sobre cinta de carbono adherida a un portamuestras adecuado para el equipo. Previa su medición, las muestras fueron metalizadas con cromo. Las mediciones se realizaron por duplicado en un equipo SEM Carl Zeiss Sigma equipado con un sistema de detección EDS. Los resultados se utilizaron para la determinación de la fórmula química de los SP.

Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Materiales por Espectrometría de Rayos X (LAMARX) de la Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación (FAMAF), de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

2.4.7. Espectroscopia de correlación fotónica (DLS)

Esta técnica se llevó a cabo para determinar el diámetro hidrodinámico medio (d_H) y la distribución de tamaños de las partículas en dispersión. Los valores d_H se obtuvieron por el método de cumulantes y la distribución de tamaños con el algoritmo de Contin, para un rango de 10 a 4000 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado en un equipo Delsa Nano C (A53878), Beckman Coulter.

2.4.8. Dispersión de luz electroforética (DLE)

La DLE se empleó para estudiar el ζ de las partículas en dispersión y, de esta manera, afirmar la intercalación o adsorción de los aniones a los LDH. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado en un equipo Delsa Nano C (A53878), Beckman Coulter.

2.4.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se utilizó para observar la morfología de los LDH-FAQ y de compuestos de referencia. La preparación de las muestras relacionadas con los LDH-Nal consistió en colocar una gota de dispersión sobre un soporte de silicio, someterla a deshidratación a 60 °C y metalizarla con cromo. Mientras que, los sólidos de LDH-Cip se colocaron de forma directa sobre cinta de carbono adherida al portamuestras y se recubrieron con carbono. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FE-SEM Carl Zeiss Sigma (EHT = 5 kV). Las imágenes se obtuvieron por medio de un servicio brindado por el LAMARX (FAMAF-UNC).

2.4.10. Interacción entre LDH y FAQ

Con el objeto de estudiar las reacciones involucradas en la obtención de LDH-Nal y la dependencia de su composición con respecto a las condiciones de síntesis, se realizaron curvas de titulación de las siguientes soluciones:

- 100 mL de solución de metales que componen las láminas de LDH (0,03 mol L⁻¹ de MgCl₂ y 0,01 mol L⁻¹ de AlCl₃)
- 100 mL de solución de metales que componen las láminas de LDH (0,03 mol L⁻¹ de MgCl₂ y 0,01 mol L⁻¹ de AlCl₃) en presencia de 0,001 mol de HNal
- 0,001 mol de HNal

Las valoraciones se realizaron con una solución de NaOH 1 mol L⁻¹, en un titulador automático Metrohm, acoplado con un electrodo de pH de vidrio Metrohm 9.0262.100 y una unidad dosificadora Dosino 800. Los volúmenes de titulante se ajustaron para lograr intervalos de pH regulares, mientras que se consideró que se alcanzó el equilibrio con una oscilación en el electrodo de 2 mV min⁻¹. Los datos fueron procesados a través del software Tiamo.

Para complementar el estudio de la interacción de los aniones Nal con las láminas de LDH y su efecto sobre las propiedades de los LDH-Nal, se prepararon dispersiones de LDH-Cl (1 g L⁻¹) con concentraciones crecientes de Nal ([Nal] desde 0,06 hasta

6,9 mmol L⁻¹) y se dejaron en agitación orbital por 24 h. La [NaI] en el sobrenadante se midió por espectrofotometría UV-Vis a $\lambda=330$ nm para determinar el NaI adsorbido (Γ) por los LDH-Cl. Además, una porción de la dispersión se utilizó para determinar el d_H y ζ de las partículas, como se indicó en las secciones 2.4.7 y 2.4.8. Asimismo, se obtuvieron los patrones de DRXP de las muestras previamente deshidratadas, con la metodología descrita en la sección 2.4.1.

2.5. Obtención y caracterización de films

Para la adecuación de los LDH-Cip para una vía de administración tópica, se prepararon films constituidos por una matriz polimérica de HS, los cuales se caracterizaron fisicoquímica y biofarmacéuticamente. Además, se realizaron estudios de liberación del FAQ y ensayos antimicrobianos, los cuales se presentan en las secciones 2.6 y 2.7, respectivamente.

2.5.1. Obtención de films (LDH-Cip)/HS

La obtención de films con LDH-Cip se realizó por el método de evaporación del solvente (*solvent-casting*).

Con este fin, se realizó una dispersión acuosa con la siguiente composición: 2 % (p/v) de HS y 1 % (v/v) de Gli, la cual se dejó en agitación magnética por 24 h. Posteriormente, se añadió la cantidad necesaria de LDH-Cip para obtener una concentración final del FAQ alrededor de 0,37 mg por sección circular de 6 mm de diámetro, puesto que esta concentración logra sensibilidad antimicrobiana en films, de acuerdo con lo reportado previamente [3]. La dispersión se agitó en un dispersor Ultra-Turrax® IKA® T25 digital a 24000 rpm por 2 min.

A continuación, se eliminó el contenido de burbujas por medio de la aplicación de vacío y se procedió a colocar 50 mL de la dispersión en una caja Petri de plástico de

85 mm de diámetro. El film se obtuvo por evaporación del solvente en una estufa a 40 °C y se denominó (LDH-Cip)/HS.

El film obtenido se desmoldó y se procedió a cortar una sección de 20 x 15 mm y 20 secciones circulares de 6 mm de diámetro con un sacabocado para su posterior caracterización. En la Figura 2.3 se presenta un esquema de la obtención del film.

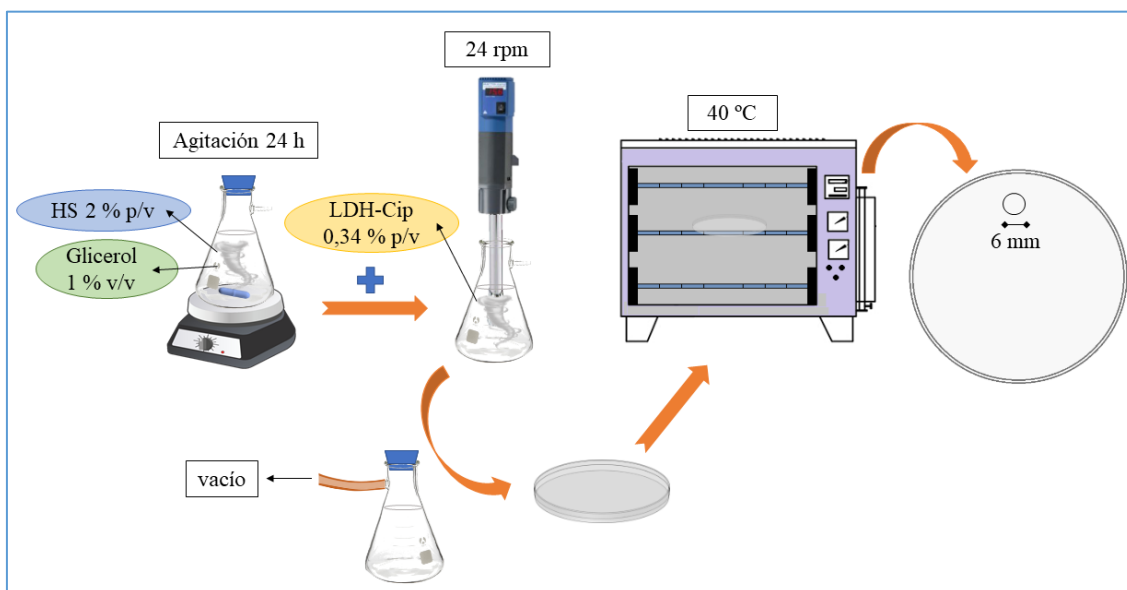


Figura 2. 3. Esquema de la obtención del film (LDH-Cip)/HS

Con fines comparativos, empleando la metodología anteriormente descrita, se preparó un film sin la adición del SP, al cual se le denominó HS y otro con la adición de CipHCl (debido a que es la forma en la que usualmente se encuentra en las formulaciones farmacéuticas [4]) en la misma concentración que la contenida en el film (LDH-Cip)/HS, al cual se le denominó Cip/HS.

2.5.2. Caracterización fisicoquímica y morfológica de los films

La caracterización fisicoquímica de los films se realizó con algunas de las técnicas y condiciones descritas en la sección 2.4, con las siguientes diferencias:

- Para obtener los patrones de DRX, los films se colocaron de forma directa sobre un portaobjetos de vidrio. Esta técnica se utilizó para la identificación de fases

presentes en las muestras y la existencia o no de una delaminación de los LDH debido a la incorporación del PE.

- Para obtener los espectros FTIR de los films, se utilizó reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros se adquirieron en un espectrofotómetro FTIR Thermo Scientific equipado con un accesorio de ATR, con cristal de ZnSe y se registraron entre 4000 y 650 cm^{-1} , con 64 scans y 4 cm^{-1} de resolución.

Además, se observó la topografía de los films por medio de microscopía confocal (MC) en un microscopio Olympus LEXT OLS 4000. Las imágenes se registraron con una magnificación de 1070X y se analizaron utilizando el Software Lext OLS 4100. Las imágenes se obtuvieron por medio de un servicio brindado por el LAMARX (FAMAF-UNC).

2.5.3. Caracterización biofarmacéutica de los films

La caracterización biofarmacéutica de los films (LDH-Cip)/HS, Cip/HS y HS consistió en la evaluación de la uniformidad de unidades de dosificación y en estudios de hinchamiento en diferentes medios.

2.5.3.1. Uniformidad de unidades de dosificación

Con el fin de evaluar la uniformidad de las unidades de dosificación de los films obtenidos, en este caso de cada sección circular de 6 mm de diámetro, se determinó la uniformidad de contenido, por medio de espectrofotometría UV-Vis y la uniformidad de peso de forma gravimétrica.

Para evaluar la uniformidad de contenido de Cip en los films (LDH-Cip)/HS y (Cip)/HS, se tomó de forma aleatoria una sección circular de 6 mm de diámetro de cada film y se colocó en 30 mL de HCl 0,2 M. Se dejó en agitación a 100 rpm hasta su completa desintegración y se midió en el espectrofotómetro UV-Vis a $\lambda = 277$ nm. El ensayo se realizó por triplicado, se determinó el valor promedio (\bar{x}), la desviación estándar (DE) y

el coeficiente de variación (%Cv). El contenido de FAQ se determinó como mg de Cip/mg de film y se expresó como mg de Cip luego de determinar la uniformidad de peso.

La uniformidad de peso de los films (LDH-Cip)/HS, Cip/HS y HS se evaluó por medio del registro de la masa de 20 secciones circulares, de 6 mm de diámetro, de cada film. Para esto, se utilizó una balanza analítica Denver Instrument con capacidad máxima de 200 g y apreciación de 0,1 mg. Posteriormente, se determinó el valor promedio (\bar{x}), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%Cv).

2.5.3.2. Hinchamiento

Se invirtió la tapa de una caja Petri de vidrio de 6 cm de diámetro, se colocó un disco de film de 6 mm de diámetro en el centro y la otra parte de la caja Petri en contacto con el film. Se procedió a llenar los espacios entre y sobre la caja Petri con el medio de hinchamiento, ya sea solución tampón fosfato a pH 5,8 (PBS5,8) o pH 7,4 (PBS7,4) [5], los cuales simulan condiciones fisiológicas de la piel intacta y del exudado plasmático, respectivamente [3]. Luego se registró el diámetro del film en tiempos predeterminados: 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 480 min. Posteriormente, se determinó el porcentaje de hinchamiento en función del tiempo, con la ecuación 2.1. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

$$\text{hinchamiento (\%)} = \frac{d_f - d_i}{d_i} \times 100 \quad [2.1]$$

donde d_f representa el diámetro final (mm) a un tiempo t y d_i el diámetro inicial, que en este caso fueron 6 mm.

2.6. Estudios de liberación *in vitro* del FAQ

Se realizaron estudios de liberación del FAQ a partir de dispersiones de LDH-Nal y de los films con Cip.

Las liberaciones del Nal desde las dispersiones de LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte se realizaron en celdas bicompartimentales (Figura 2.4), acopladas con una membrana semisintética. En el compartimento donante se colocó 1 mL de cada dispersión de LDH-Nal y como referencia, una solución del FAQ puro en su forma protonada (debido a que es la forma en la que usualmente se ha encontrado en las formulaciones farmacéuticas [6]) en una concentración equivalente a la presente en los SP; mientras que, en el compartimento receptor se colocaron $16 \pm 0,7$ mL de medio a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los medios receptores utilizados fueron agua, NaCl 0,9 % p/v [7], PBS5,8 y PBS7,4. A intervalos de tiempo predeterminados 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min, se tomaron alícuotas de 1 mL del compartimento receptor y se repuso con igual cantidad de medio fresco (libre de FAQ), termostatzado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La concentración del FAQ liberado se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu UV-1700 PharmaSpec) a una $\lambda = 320\text{ nm}$ cuando el medio receptor fue agua ($\epsilon = 10450\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y NaCl 0,9 % ($\epsilon = 10740\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a $\lambda = 325\text{ nm}$ en PBS5,8 ($\epsilon = 11120\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y $\lambda = 334\text{ nm}$ en PBS7,4 ($\epsilon = 11540\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

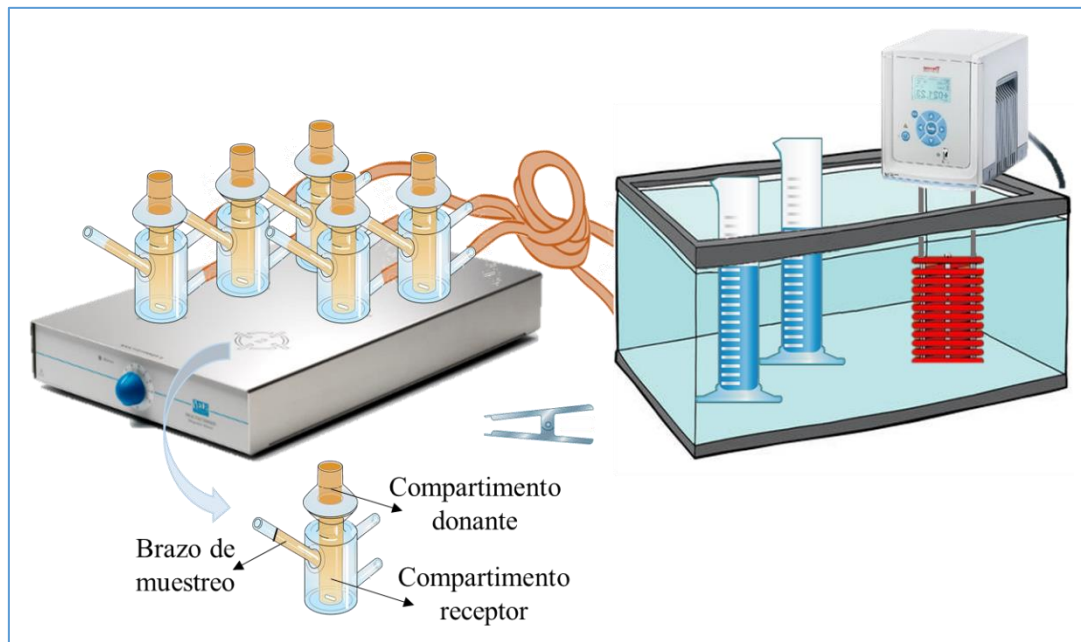


Figura 2. 4. Esquema del sistema utilizado para los estudios de liberación del FAQ en celdas bicompartimentales

Por otro lado, las liberaciones de Cip desde los films (LDH-Cip)/HS y Cip/HS (referencia) se realizaron en celdas bicompartimentales con un compartimento receptor

de menor volumen (10 mL). En el compartimento donante se colocó una sección circular de 6 mm de diámetro de film. Como medio receptor se utilizaron 10 mL de medio termostatzado a 37 °C, ya sea de PBS5,8 o PBS7,4. La concentración del FAQ liberado se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu UV1601, Japan) a una $\lambda = 275$ nm cuando el medio receptor fue PBS5,8 ($\epsilon = 35255 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y $\lambda = 271$ nm en PBS7,4 ($\epsilon = 33119 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Posteriormente, se graficaron los porcentajes acumulados de FAQ liberado en función del tiempo, con su correspondiente desviación estándar.

Los perfiles de liberación del FAQ fueron ajustados de acuerdo a las ecuaciones 2.2, 2.3 y 2.5 [8], [9]:

- Orden cero:

$$\% FAQ_t = k_C \times t + \% FAQ_0 \quad [2.2]$$

- Modelo de Higuchi:

$$\% FAQ_t = k_H \times t^{0,5} + \% FAQ_0 \quad [2.3]$$

- Modelo de Korsmeyer – Peppas:

$$\% FAQ_t = k_P \times t^n \quad [2.4]$$

La cual se representó linealizada de la siguiente manera:

$$\log \% FAQ_t = n \log t + \log k_P \quad [2.5]$$

Donde $\% FAQ_t$ representa el porcentaje acumulado de FAQ liberado en un tiempo t , k_C , k_H y k_P , corresponden a las constantes cinéticas de cada modelo y $\% FAQ_0$ y $\log k_P$ corresponden a los puntos de corte del eje y. Por último, el parámetro n de las ecuaciones 2.4 y 2.5 es indicativo del mecanismo de liberación del FAQ. Si n es igual a 0,5 indica que el proceso de liberación está controlado por la difusión, mientras que si es igual a 1 indica que está controlado por un proceso o reacción superficial [8], como, por ejemplo, disolución del FAQ o erosión del material. Si el valor se encuentra entre 0,5 y 1 indica que existe un proceso anómalo o una contribución de diferentes fenómenos [8], como intercambio iónico, disolución, erosión, entre otros.

En los casos en que el perfil de liberación del FAQ presentó un *plateau* dentro del tiempo de experimentación, los datos utilizados para los ajustes fueron los que se encontraron por debajo del 80 % del máximo porcentaje acumulativo del FAQ liberado.

Además, los perfiles de liberación de Cip desde los films (LDH-Cip)/HS y Cip/HS, se compararon estadísticamente utilizando el factor de similitud (f_2) de acuerdo con la ecuación 2.6 [8]:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad [2.6]$$

donde n representa el número de puntos de tiempo de muestreo y R_t junto con T_t los porcentajes acumulados de FAQ liberado en cada uno de los n puntos de tiempo, tanto del film de referencia, como del que contiene el SP. Valores de f_2 entre 50 y 100 indican que los perfiles son similares [8].

2.7. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana, tanto de los SP de HNaI como de los films de Cip, se evaluó frente a *S. aureus* (ATCC 25923) debido a que este es un microorganismo oportunista que suele causar infecciones tópicas [3]. Al realizar los ensayos, se siguieron las recomendaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) [10] y del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) [11]. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Laura Valenti, perteneciente al INFIQC-CONICET y a la Lic. Giuliana Mosconi perteneciente al IPQA-CONICET.

2.7.1. Inóculo inicial

Se realizó un cultivo bacteriano a 37 °C por aproximadamente 18 h, en agar Müeller-Hinton (AMH). Posteriormente, una porción de las colonias desarrolladas se dispersó en caldo Müeller-Hinton (CMH) hasta obtener 10^8 UFC mL⁻¹, lo cual fue verificado por espectrofotometría UV-Vis ($A = 0,4$ a una $\lambda = 600$ nm) y recuento de

bacterias. Cuando fue necesario, se llevaron a cabo otras diluciones para alcanzar la concentración de bacterias deseada.

2.7.2. Macrodilución en caldo (o en tubos)

El método de macrodilución en caldo o en tubos se utilizó para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los SP de HNaI. Se evaluaron los sistemas LDH-Nal-pHvar, LDH-Nal-pHcte y como referencia, LDH-Cl y el FAQ puro. El ensayo consistió en realizar dispersiones (o soluciones) seriadas (1 mL) de cada sistema a analizar, a siete concentraciones distintas, empleando CMH como medio de cultivo y de dispersión. Posteriormente, se añadió 1 mL de inóculo bacteriano (10^5 UFC mL⁻¹), como se aprecia en la Figura 2.5.

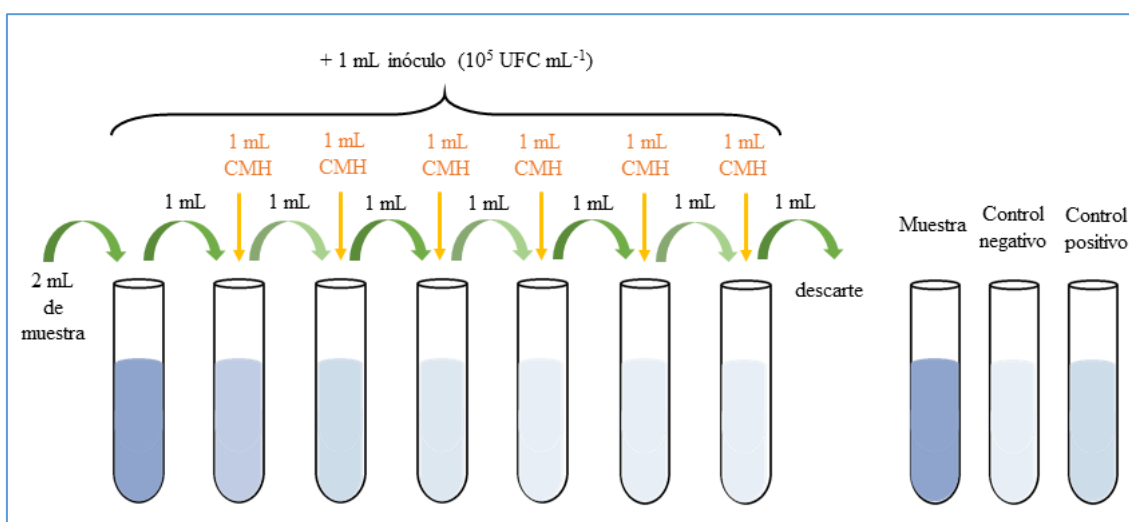


Figura 2. 5. Macrodilución en tubos para la determinación de la CIM

Los cultivos microbianos se incubaron a 37 °C por un período de 20 h con agitación orbital. La CIM se determinó mediante inspección visual de la turbidez y, para los sistemas LDH-Nal, ésta se verificó por medio de espectrofotometría UV-Visible a $\lambda = 600$ nm.

De forma adicional, se realizaron siembras de superficie en AMH de las dispersiones que contenían una concentración de FAQ superior a la CIM. Las placas

fueron invertidas e incubadas a 37 °C por 20 h. Por último, se realizó un recuento bacteriano colocando las placas sobre una superficie oscura. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

2.7.3. Método de difusión en agar

Se analizó la actividad antimicrobiana de los SP de HNal, de los films de Cip y de sus respectivas muestras de referencia frente a *S. aureus* por medio de ensayos de difusión en agar. Para ello, se realizó una siembra de superficie (10^8 UFC mL⁻¹) sobre placas con AMH.

En cuanto a los SP de HNal, se analizaron los sistemas dispersos LDH-Nal-pHvar, LDH-Nal-pHcte y se consideraron como referencias a los LDH-Cl y al FAQ puro. En cada placa se colocaron cilindros de acero inoxidable (6 mm diámetro interno, 8 mm diámetro externo y 10 mm de alto) sobre la superficie del agar y se llenaron con 100 µL de la muestra de estudio, a cuatro concentraciones de FAQ: 128, 256, 512 y 1024 µg mL⁻¹. En la Figura 2.6 se muestra un esquema del ensayo.

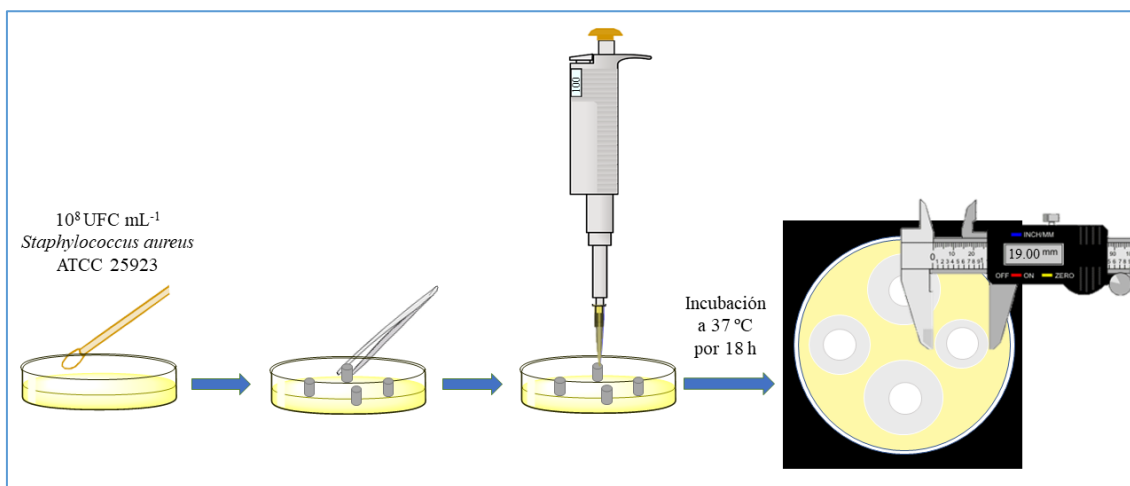


Figura 2. 6. Ensayo de difusión en agar para muestras en forma de dispersión

Por otra parte, en cuanto a los sistemas con Cip, se analizaron directamente los films. Para lo cual, en cada placa se colocaron 3 discos de 6 mm de diámetro de (LDH-Cip)/HS, Cip/HS y HS, respectivamente.

Las placas fueron incubadas a 37 °C por un período de 18 h. El diámetro de los halos de inhibición fue medido con un calibre digital y reportado en milímetros. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.7.4. Criterio de interpretación

Los resultados de los ensayos de sensibilidad antimicrobiana se analizaron de acuerdo a los criterios de interpretación establecidos por el CLSI [10], detallados en la Tabla 2.1.

Tabla 2. 1. Criterio de interpretación de los ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Interpretación	CIM (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
Sensible	≤ 4	≥ 20
Intermedio	8 - 16	15 - 19
Resistente	≥ 32	≤ 14

Además, los datos obtenidos a partir del método de difusión en agar para los SP de Nal fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI para determinar diferencias estadísticamente significativas. Para ello, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rangos múltiples de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD).

2.8. Referencias bibliográficas

- [1] D. G. Evans and R. C. T. Slade, “Structural Aspects of Layered Double Hydroxides,” in *Structure & Bonding*, vol. 119, no. 2005, D. G. Evans and X. Duan, Eds. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 1–87.
- [2] M. E. Roca, M. Baschini, and K. Sapag, “Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 114, pp. 69–76, 2015.

- [3] M. C. García *et al.*, “Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 175, pp. 75–86, 2017.
- [4] ANMAT, “Vademécum nacional de medicamentos,” 2018. [Online]. Available: <https://servicios.pami.org.ar/vademecum/views/consultaPublica/listado.zul>.
- [5] United States Pharmacopeial Convention, “The national formulary and dispensing information. USP38–NF33,” Pharmacopeia Convention, Ed. Rockville, 2015, p. 1884.
- [6] FDA, “FDA approved drug products,” *U.S. Department of Health and Human Services*, 2018. [Online]. Available: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=014214>.
- [7] ANMAT, *Farmacopea Argentina. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina*, 7ma ed. 2013.
- [8] J. M. S. Costa, P., & Lobo, “Modelling and Comparison of Dissolution Profiles,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 13, pp. 123–133, 2001.
- [9] J. Siepmann and N. a. Peppas, “Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC),” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 163–174, 2012.
- [10] CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*, vol. 32, no. 2. 2012.
- [11] INEI, *Metodo De Determinacion De Sensibilidad Antimicrobiana Por Difusion*. 2012.

CAPÍTULO III

**Aspectos estructurales y morfológicos
de la vehiculización de FAQ mediante
LDH nanoparticulados**

Capítulo III: Aspectos estructurales y morfológicos de la vehiculización de FAQ mediante LDH nanoparticulados

En el presente capítulo se propone a los LDH como SP de liberación modificada de FAQ para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y antimicrobianas a través de su vehiculización en el SP.

Para ello, fue esencial considerar las condiciones de síntesis de los LDH intercalados con el FAQ. En el presente estudio se utilizó HNal como F modelo. La síntesis de los LDH conteniendo la forma básica del FAQ (Nal⁻) se realizó por co-precipitación a pH variable (LDH-Nal-pHvar) y a pH constante (LDH-Nal-pHcte). Además, se llevaron a cabo estudios de liberación *in vitro* y ensayos de sensibilidad antimicrobiana.

A continuación, se presentan los resultados y discusión correspondientes a la caracterización fisicoquímica de los LDH-Nal, así como de los estudios de liberación *in vitro* y ensayos de sensibilidad antimicrobiana.

3.1. Resultados y discusión

3.1.1. Caracterización fisicoquímica de los LDH-Nal

La presentación y discusión de los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica de los sistemas LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte inició con la caracterización estructural de las fases obtenidas, por medio de las técnicas de DRX y FTIR. Para explicar la obtención de estas fases se realizó un estudio de las reacciones involucradas en el proceso de síntesis por medio de curvas de titulación de soluciones de los componentes de los SP. De forma complementaria, se exploró la interacción de Nal con las láminas de LDH con el estudio de isothermas de adsorción de Nal⁻ en LDH intercalados con cloruro. Se continuó con la determinación de la fórmula química, a través

de análisis elemental, TGA y DTA, y finalizó con el análisis de la morfología y propiedades interfaciales de los SP, mediante las técnicas de SEM, DLS y DLE.

3.1.1.1. DRXP

Las fases presentes en los sistemas LDH-Nal (bajo ambas condiciones de síntesis, pH variable y constante) se asignaron por medio de sus patrones de DRXP (Figura 3. 1) y se analizaron comparativamente frente a los patrones de las muestras de referencia.

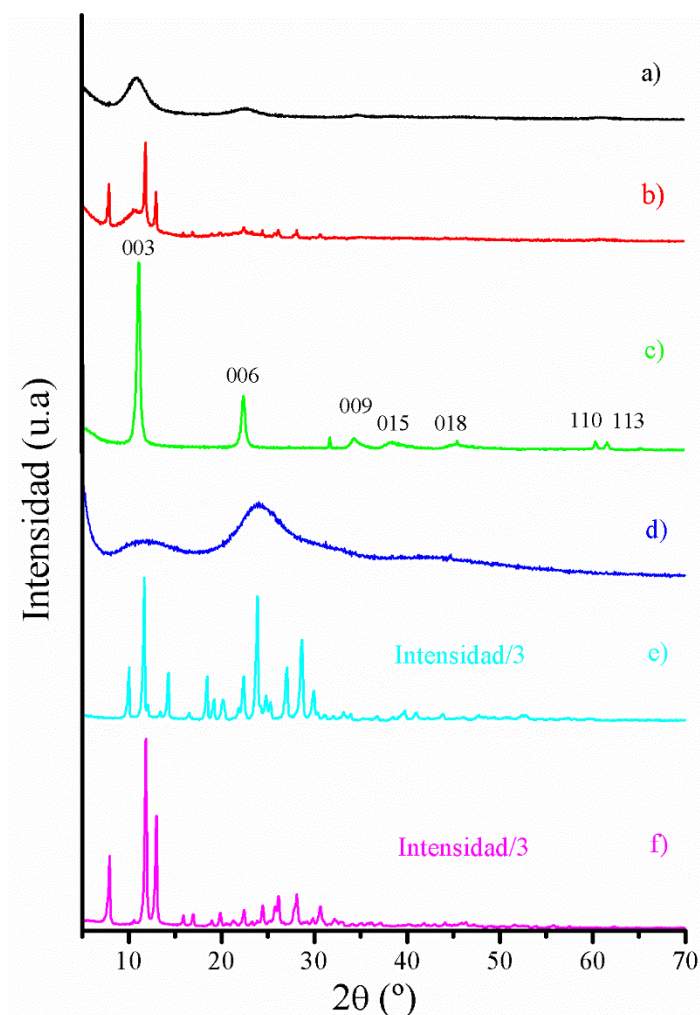


Figura 3. 1. Patrones de DRXP de a) LDH-Nal-pHvar, b) LDH-Nal-pHcte, c) LDH-Cl, d) NaNal, e) HNal, f) $Mg(Nal)_2$

Tanto la muestra de referencia LDH-Cl como los sistemas LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte presentaron patrones de difracción con picos típicos de fases de LDH: picos intensos y agudos a bajos valores 2θ (menor a 35°), pertenecientes a las reflexiones basales (00 l), picos (0 kl) menos intensos y menos agudos para valores 2θ superiores, y reflexiones (110) alrededor de los $60^\circ 2\theta$. Los índices de Miller de la muestra LDH-Cl se asignaron de acuerdo con lo reportado en bibliografía [1].

Las muestras LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte presentaron un espaciamiento basal (d) alrededor de los 8,1 Å, similar a los 7,9 Å de la muestra LDH-Cl (valor típico de este LDH [1], [2]). Con la intercalación de un anión de mayor tamaño (Nal⁻), se esperaba la presencia de una fase con una distancia interlaminar mayor, como la encontrada por Trikeriotis y Ghanotakis (2017) con un d igual a 22,3 Å, para LDH de Mg y Al intercalados con Nal. No obstante, la intercalación de un mismo anión puede darse en distintas orientaciones y arreglos. Liu *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2005) en estudios con los agentes anticancerígenos camptotecina y 5-fluorouracilo, respectivamente, encontraron que, con dependencia de las condiciones de síntesis, se pueden obtener distintos arreglos del mismo anión intercalado y consecuentemente distinto espaciado interlaminar, en el que un d en torno a 8 Å implica un arreglo horizontal en monocapa [3], [4], también descrito como una orientación plana y paralela a las láminas [5].

La molécula de Nal tiene un tamaño aproximado de 2,8 Å de espesor, 9,2 Å de largo y 8,0 Å de ancho [6], [7]. Si se sustrae el valor del espesor de una lámina (4,8 Å) [8] del valor de d obtenido para los LDH-Nal, el espacio o dominio interlaminar tendría un tamaño alrededor de 3,2 Å, tamaño suficiente como para intercalar a los aniones Nal en un arreglo plano, horizontal en monocapa. El arreglo propuesto se ilustra en la Figura 3.2.

Los picos de los patrones de DRX obtenidos para LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte se mostraron más anchos y menos intensos que los de LDH-Cl. Este ensanchamiento y la disminución de la intensidad de los picos se atribuyeron principalmente a la intercalación del anión Nal, pues el incremento de la concentración e intercalación del anión en los LDH resulta en una menor organización de la disposición del apilamiento de las láminas de los LDH, ocasionando estos cambios en los patrones de DRXP [9], [10]. Consecuentemente, la intercalación de Nal produce un desorden

estructural fuerte [11] y un menor apilamiento de las láminas [12]. Además, de acuerdo con los resultados de SEM que se presentan en la sección 3.1.1.7, el menor tamaño de partícula de los LDH-Nal también aportó al ensanchamiento de los picos.

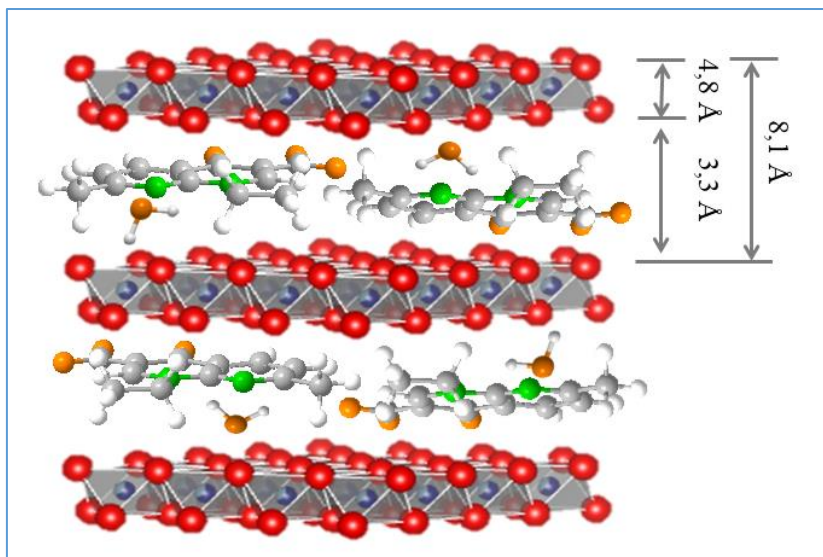


Figura 3. 2. Modelo propuesto del arreglo de Nal^- en el espacio interlamina de LDH de Mg y Al

La celda unidad de estos LDH puede definirse básicamente por los parámetros c y a , relacionados con el patrón de apilamiento y la distancia entre dos cationes metálicos, respectivamente. Si se considera una estructura 3R, en el que la celda unidad incluye tres láminas, el parámetro c corresponde a 3 veces d ; mientras que, el parámetro a puede determinarse como $a = 2d_{(110)}$ [10], [13], [14]. En todos los casos, el valor de c se presentó alrededor de los 24 Å. Por otra parte, el parámetro de celda a fue de alrededor de 3,05 para los LDH-Nal. Este valor se corresponde con el de LDH-Cl con 3,07 Å, lo cual era esperado debido a que a depende únicamente del radio de los cationes laminares [14] y en el presente estudio se utilizaron los mismos iones divalentes y trivalentes para conformar las láminas de los LDH-Nal y LDH-Cl.

Cabe señalar que, los LDH-Nal no presentaron fases de HNaI o NaNaI, lo cual indica la ausencia de FAQ puro, ya sea en su forma ácida o básica, en las muestras. No obstante, el patrón de LDH-Nal-pHcte presentó picos adicionales a la fase de LDH, los cuales se muestran agudos e intensos, idénticos a los registrados en el patrón de referencia de $\text{Mg}(\text{NaI})_2$, lo que indica que esta muestra está compuesta por las dos fases. La presencia

de $\text{Mg}(\text{NaI})_2$ en la muestra se debe a la capacidad del HNaI de formar complejos con iones metálicos divalentes [15], lo cual estaba previsto y debido a ello se decidió probar las dos metodologías de síntesis para los sistemas LDH- NaI .

3.1.1.2. FTIR

Para continuar con la descripción estructural de los SP, en la Figura 3.3 se presentan los espectros FTIR de los sistemas LDH- NaI , así como los de las muestras de referencia.

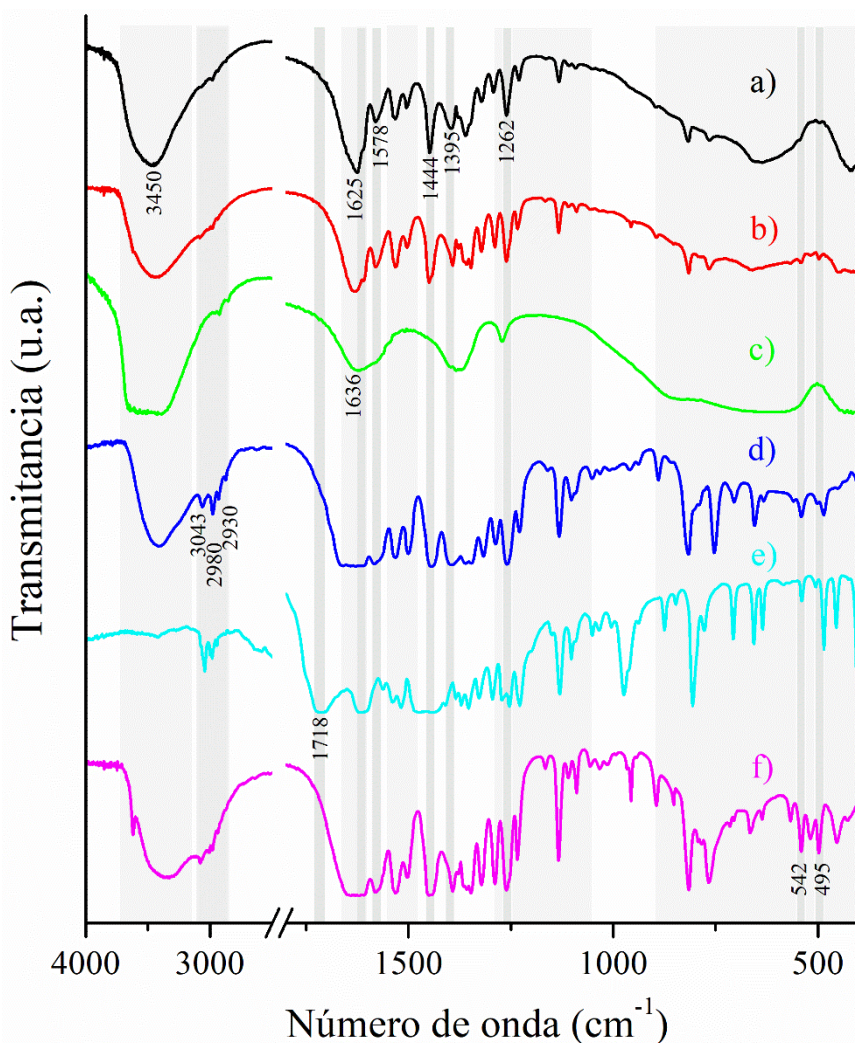


Figura 3.3. Espectros FTIR de a) LDH- NaI -pHvar, b) LDH- NaI -pHcte, c) LDH- Cl , d) NaNaI , e) HNaI , f) $\text{Mg}(\text{NaI})_2$

Los espectros de los LDH-Nal presentaron bandas de absorción debidas a los modos vibracionales normales correspondientes a la matriz de LDH (grupos hidroxilo de las láminas, moléculas de agua interlaminar, vibraciones de tensión o estiramiento de Mg-O y Mg-O-Al).

Así, se puede observar una banda amplia alrededor de los 3450 cm^{-1} , que corresponde al solapamiento de las bandas generadas por las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilo que componen las láminas y de las moléculas de agua alojadas en el espacio interlaminar. En la región de $900\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ también se encontraron bandas asignadas a los modos vibracionales de los grupos hidroxilo y moléculas de agua, y a las vibraciones de enlace Al-O, Mg-O y Mg-O-Al de las láminas de LDH [1], [2], [16]. Así mismo, la banda ubicada alrededor de los 1636 cm^{-1} corresponde a vibraciones de flexión del agua tanto interlaminar como adsorbida [1]. La presencia de las fases de LDH se confirmó por la similitud de las bandas obtenidas en estas regiones con las de la muestra de referencia LDH-Cl.

La incorporación de Nal en los LDH dio lugar a la aparición de bandas de absorción específicas debidas a modos vibracionales como las del grupo carboxilato, carbonilo, enlaces C-H y C=N de los anillos aromáticos. Las vibraciones simétricas y anti-simétricas del grupo carboxilato se registraron alrededor de los $1395\text{ y }1578\text{ cm}^{-1}$, respectivamente [7], [10], [17], [18]. Aproximadamente a 1625 cm^{-1} se registró la vibración de estiramiento del grupo cetona del C4 del FAQ [7], [19], que se solapó con la banda asignada a vibraciones de flexión del agua. La presencia de los enlaces C-H de los grupos metil ($-\text{CH}_3$), etil ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$) y $=\text{C-H}$ se evidenció por las pequeñas bandas ubicadas entre los $2860\text{ - }3100\text{ cm}^{-1}$ [6], [10]. También, se observaron bandas alrededor de los 1444 cm^{-1} y 1262 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de tensión C-C y C-N de los anillos aromáticos [7]. La posición de las bandas mencionadas fue similar entre los LDH-Nal y las muestras de referencia NaNal y Mg(Nal)_2 . Por el contrario, no se presentaron bandas alrededor de los 1718 cm^{-1} (νCOOH), característica del FAQ protonado (HNal) [6]. Esto confirmó la ausencia de la forma ácida del FAQ y su intercalación como anión Nal en los sistemas LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte.

Finalmente, la presencia de Mg(Nal)_2 en el sistema LDH-Nal-pHcte se verificó por las bandas ubicadas a 495 cm^{-1} y 542 cm^{-1} , asignada a la $\nu(\text{M-O})$ [15]. Estas bandas

fueron similares a las obtenidas en el espectro de $Mg(Nal)_2$ (Figura 3.3.f) y a las reportadas en otras investigaciones de complejos de Nal obtenidos con Ca^{2+} y Fe^{3+} [15]. Por el contrario, estas bandas no se presentaron en el espectro de LDH-Nal-pHvar, indicando la ausencia de este tipo de sales en la muestra.

3.1.1.3. Curvas de titulación

Los resultados de DRXP y FTIR indicaron la presencia de una fase de LDH que incorporó el anión Nal en la muestra LDH-Nal-pHvar y una fase adicional de $Mg(Nal)_2$ en LDH-Nal-pHcte. La presencia de $Mg(Nal)_2$ en la muestra se debe a la capacidad del HNal de formar complejos metálicos [15].

Entonces, la composición de los LDH-Nal puede explicarse debido a dos reacciones en competencia, una correspondiente a la formación de LDH intercalados con Nal y otra de precipitación de $Mg(Nal)_2$, complejo metálico del Nal con una relación 1:2 de Mg:Nal [20]. Las reacciones involucradas en el proceso de síntesis de los LDH-Nal se estudiaron por medio de las curvas de titulación que se presentan en la Figura 3.4.

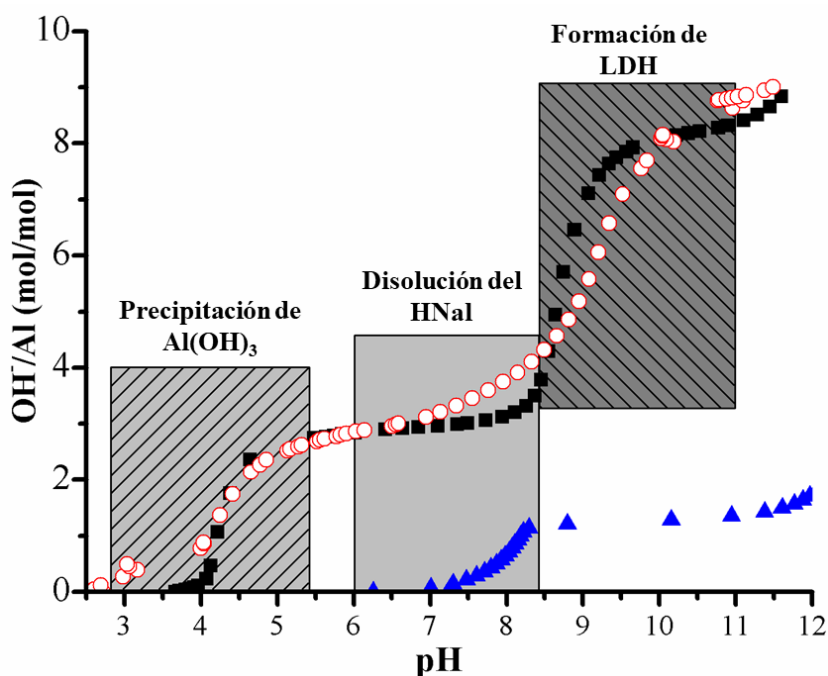


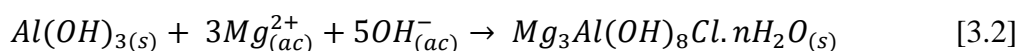
Figura 3. 4. Curvas de titulación de: ■ $MgCl_2$: $AlCl_3$ con relación molar 3:1, ○ $MgCl_2$: $AlCl_3$: HNal con relación molar 3:1:1 y ▲ HNal puro como referencia. Las zonas marcadas señalan las reacciones producidas en cada rango de pH

La curva de titulación de la solución de metales en ausencia del FAQ mostró un consumo de OH⁻ en dos pasos: el primero, ubicado a pH entre 3,5 y 5,0, correspondió a la formación de Al(OH)₃, de acuerdo con la ecuación 3.1. Lo cual se podía esperar puesto que el Al(OH)₃ presenta menor solubilidad que el Mg(OH)₂ [21].

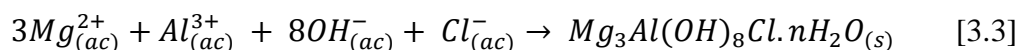


Consecuentemente, se obtuvo un primer punto de equivalencia en una relación OH/Al de aproximadamente 3.

El segundo paso se presentó entre un pH de 8,0 a 9,5 y se asignó a la formación de LDH con intercalación de Cl⁻. Este incremento de pH tuvo un consumo de aproximadamente 5 mol de OH⁻ adicionales. En la ecuación 3.2 se presenta la reacción de formación del LDH-Cl.



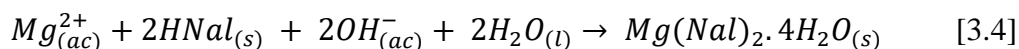
De acuerdo con esto, la ecuación general de precipitación de LDH-Cl estaría dada por la ecuación 3.3.



La curva de titulación en presencia del HNaI exhibió los dos pasos antes mencionados y un paso adicional correspondiente a la deprotonación del HNaI (disolución del FAQ), previo a la formación del LDH intercalado con NaI⁻.

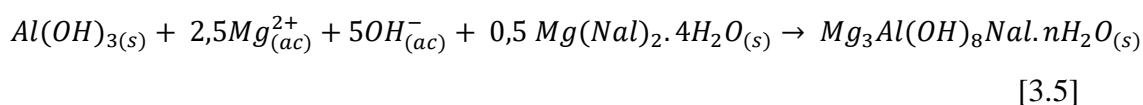
Un aspecto importante a considerar en la síntesis de LDH-NaI, es la interacción del anión NaI con los iones metálicos Mg²⁺ y Al³⁺ [22]. Primero, la curva de titulación con HNaI inició a un pH más bajo, lo cual indica que una porción de HNaI se deprotonó para formar aniones NaI⁻ que pudieron interactuar con los iones metálicos del medio. Segundo, la disolución del HNaI inició luego de la precipitación de Al(OH)₃, por lo que los aniones de NaI⁻ generados quedaron libres para interactuar con el Mg²⁺ y de esta

manera formar el complejo metálico $Mg(Nal)_2 \cdot 4H_2O$, como se muestra en la ecuación 3.4.

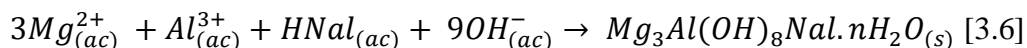


Así, esta reacción compite con la reacción de formación de LDH intercalados con Nal en la síntesis de LDH-Nal.

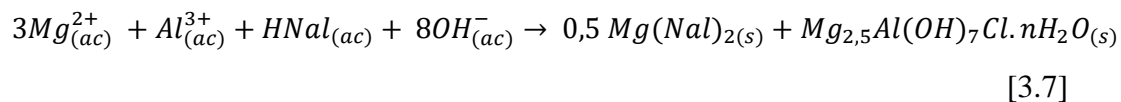
De acuerdo con las curvas de titulación, los LDH se formaron conforme el pH incrementó, según la reacción que se presenta en la ecuación 3.5.



Entonces, la reacción general para esta titulación puede describirse como se muestra en la ecuación 3.6.



Esta reacción es consistente con el punto de equivalencia alcanzado a una proporción de OH/Al alrededor de 8,8. Se debe notar que, si el $Mg(Nal)_2 \cdot 4H_2O_{(s)}$ no se disolviera, el valor teórico para la relación OH/Al debería ser menor, de acuerdo con la reacción descrita en la ecuación 3.7.



Por lo tanto, de manera general, las reacciones que intervienen en la síntesis de LDH-Nal son las representadas en la ecuación 3.4 y la ecuación 3.6. La obtención de LDH o de complejo metálico, estuvo determinada por las condiciones de síntesis, principalmente, por la concentración de OH^- . Las condiciones en las que se mantuvo un exceso de aniones OH^- , como en la síntesis a pH variable, favorecieron la reacción presentada en la ecuación 3.6; mientras que, las condiciones que mantuvieron una

cantidad justa de OH^- para producir la precipitación de LDH, como en la síntesis a pH constante, produjeron la competencia entre estas dos reacciones y la presencia tanto de la fase de LDH con Nal incorporado como de la fase del complejo metálico.

3.1.1.4. Incorporación de Nal sobre LDH-Cl

Para profundizar el estudio de la interacción existente entre los aniones Nal^- con las láminas de LDH y el efecto del complejo metálico ($\text{Mg}(\text{Nal})_2$) sobre las propiedades de los LDH-Nal obtenidos, en la Figura 3.5 se presenta la capacidad de incorporación de Nal por LDH-Cl junto con determinaciones de d_H , ζ , y patrones de DRXP.

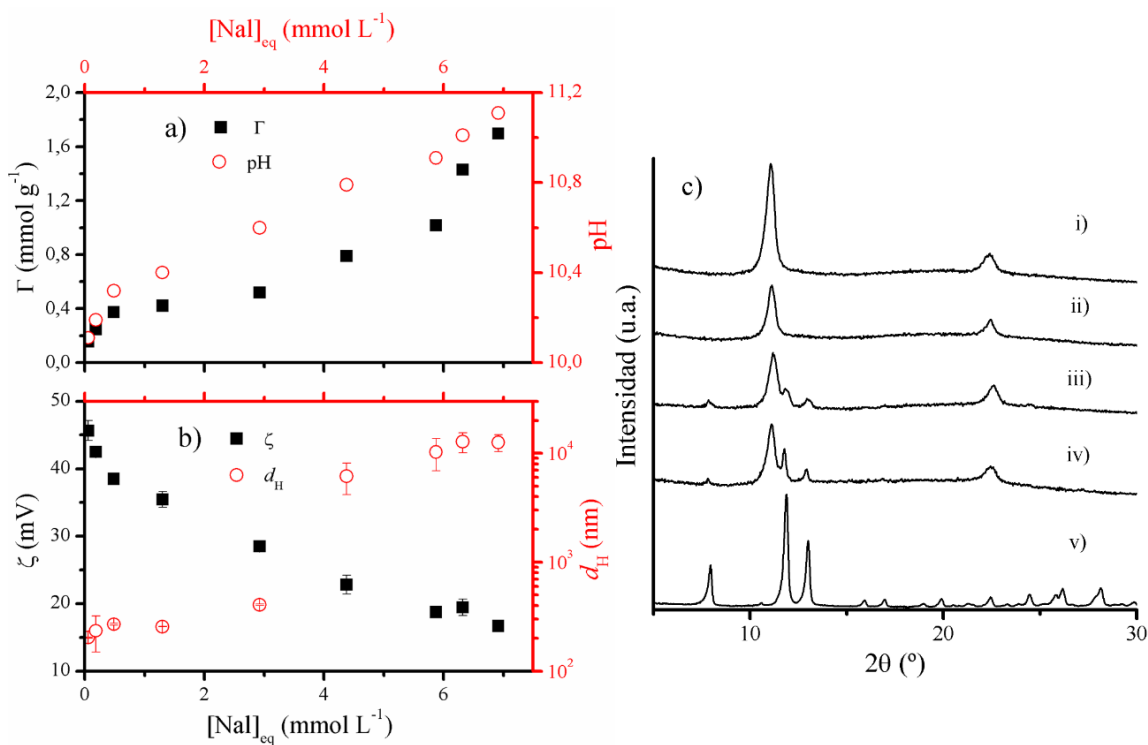
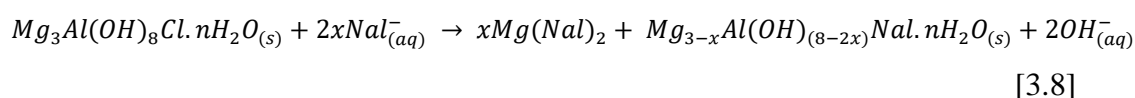


Figura 3.5. a) y b) curvas de adsorción de Nal (Γ), pH, ζ y d_H en función de la $[\text{Nal}]$ en dispersiones de 1 g L⁻¹ de LDH-Cl con incrementos de la $[\text{Nal}]$ inicial c) patrones de DRXP de los sólidos obtenidos a $[\text{Nal}]_{\text{eq}}$ i) 0,18 mmol L⁻¹ ii) 1,30 mmol L⁻¹ iii) 4,38 mmol L⁻¹ iv) 6,32 mmol L⁻¹; así como de la muestra referencia v) $\text{Mg}(\text{Nal})_2$

La isoterma de adsorción (Figura 3.5.a) muestra dos etapas: a baja $[\text{Nal}]_{\text{eq}}$, la incorporación del anión alcanza un *plateau* alrededor de $\Gamma=0,4$ mmol g⁻¹, correspondiente

a un 15 % de la capacidad de intercambio aniónico de los LDH-Cl. Esta primera etapa se asoció con la adsorción e intercalación de los aniones Na^+ . En esta etapa, se produjo una disminución del ζ , lo cual indica que los aniones Na^+ poseen una afinidad mayor por la superficie de los LDH en comparación con los aniones Cl^- . Sin embargo, la disminución del ζ no produjo una inversión de la carga, lo que implica que el Na^+ solo tiene interacciones electrostáticas con la superficie de los LDH [23]. Como resultado de esta baja disminución del ζ , las partículas de LDH-Cl no se agregaron y, consecuentemente, mantuvieron un pequeño tamaño de partícula. La segunda etapa, a $[\text{Na}^+]_{\text{eq}} > 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, no alcanzó un *plateau* en el rango de experimentación evaluado. Esta etapa se asoció con una disolución parcial de los iones Mg^{2+} de las láminas de LDH, lo cual resultó en la formación del complejo metálico con los aniones Na^+ :



En concordancia, los patrones de DRXP de los sólidos obtenidos en esta etapa presentaron picos de la muestra de referencia $\text{Mg}(\text{Na})_2$. Además, el incremento de pH en esta etapa fue consistente con la reacción propuesta en la ecuación 3.8. Este proceso condujo a una disminución del ζ y un incremento del d_H , lo cual se condice con el mayor tamaño de partícula y ζ negativo determinado para la muestra de referencia del $\text{Mg}(\text{Na})_2$ ($-13,5 \pm 0,3 \text{ mV}$).

Estos resultados mostraron la limitada capacidad de incorporación de Na^+ entre las láminas de LDH por intercambio aniónico, lo cual se relacionó con su dificultad de intercalarse en el espaciado interlaminar por su mayor radio iónico en comparación con el del anión Cl^- . Al tener un menor tamaño, los aniones Cl^- tendrían una mayor interacción electrostática con las láminas y, consecuentemente, se presentó una mayor fuerza de unión entre las láminas, lo que impidió su reemplazo por el Na^+ . Por otra parte, la mayor capacidad de incorporación de Na^+ en los LDH obtenidos por síntesis directa se debe a que la formación de las láminas y la intercalación del anión se dio en un proceso simultáneo. Así mismo, los resultados indicaron la capacidad que tiene el anión Na^+ de disolver al catión Mg^{2+} , lo que provocó un equilibrio entre las fases de LDH y del complejo $\text{Mg}(\text{Na})_2$, que puede ser desplazado por cambios en la $[\text{Na}^+]$.

3.1.1.5. TGA y DTA

El estudio de las fases presentes en los portadores se profundizó mediante el análisis de las curvas de TGA/DTA que se muestran en la Figura 3.6. Además, las pérdidas de peso en la curva de TGA fueron de utilidad para determinar la composición de las muestras.

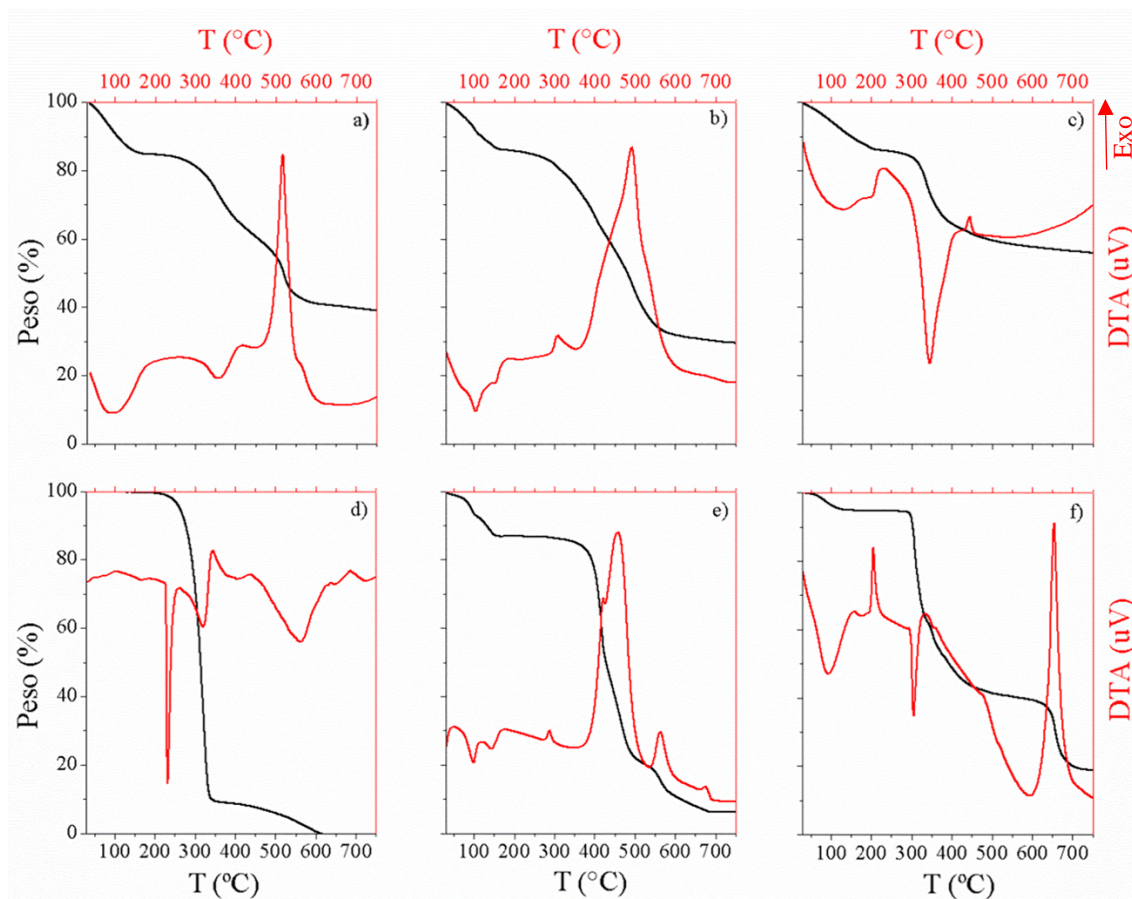


Figura 3. 6. Curvas de TGA/DTA de a) LDH-Nal-pHvar, b) LDH-Nal-pHcte, c) LDH-Cl, d) HNal, e) MgNal₂, f) NaNal

Las curvas de LDH-Nal-pHvar (Figura 3.6.a) mostraron los tres procesos principales involucrados con la descomposición térmica de los LDH, denominados: deshidratación, deshidroxilación y descomposición del anión. El proceso de deshidratación se extendió hasta los 180 °C aproximadamente, con un pico asociado a un efecto endotérmico centrado en los 90 °C; mientras que, la pérdida de peso debido a la

deshidroxilación y pérdida del anión Nal se produjo entre los 250 °C y 600 °C, donde el pico principal registrado alrededor de los 520 °C fue de carácter exotérmico.

Estos procesos también se observaron en la muestra de LDH-Cl (Figura 3.6.c), pero a diferencia del LDH-Nal-pHvar la pérdida del anión se presentó como un proceso endotérmico. Esto se debe a la naturaleza del anión interlaminar, que es inorgánico para el LDH-Cl y orgánico para el LDH-Nal-pHvar; por lo que, la degradación exotérmica del anión orgánico puede asociarse a un proceso de combustión del Nal.

Por otra parte, las curvas de la muestra LDH-Nal-pHcte (Figura 3.6.b) presentaron un comportamiento intermedio entre LDH-Nal-pHvar y MgNal₂ (Figura 3.6.e).

La descomposición de MgNal₂ mostró dos eventos endotérmicos centrados en 100 y 140 °C, asignados a un proceso de deshidratación; mientras que, el proceso oxidativo del FAQ produjo una pérdida de peso que inició desde los 400 °C, exhibiendo picos exotérmicos a 460, 560 y 670 °C. De forma adicional, el remanente de la descomposición térmica a 750 °C (% P₇₅₀) fue de 6,3 %, lo que se corresponde con la fórmula química propuesta Mg(Nal)₂.4H₂O, si se considera que el único residuo a esta temperatura es MgO.

La descomposición térmica del LDH-Nal-pHcte mostró un proceso de deshidratación con dos eventos endotérmicos centrados en temperaturas similares a las registradas en el MgNal₂, pero enmarcados dentro de una banda amplia, similar a la del LDH-Nal-pHvar. Así mismo, tanto la pérdida de peso continua en el rango entre 250 y 500 °C, como el pico exotérmico a 490 °C fueron similares a los de LDH-Nal-pHvar, lo que indicaría que principalmente se obtuvo una fase de LDH intercalada con Nal. Esto pudo confirmarse debido a que el (% P₇₅₀) fue de 29,5 % para LDH-Nal-pHcte, el cual fue menor al del LDH-Nal-pHvar (39,0 %), pero mayor que el del Mg(Nal)₂ (6,3 %).

Los eventos térmicos observados para las muestras LDH-Nal-pHvar y LDH-Nal-pHcte fueron totalmente diferentes a los obtenidos para las muestras de HNal o NaNal (Figuras 3.6.d y f), lo que indicaría que ninguna de estas dos formas del FAQ precipitó junto con la fase de LDH.

3.1.1.6. *Análisis químico elemental y establecimiento de la fórmula química*

Una vez determinadas las fases presentes en las muestras fue posible establecer una fórmula química utilizando los datos del análisis químico elemental, junto con las pérdidas de peso de los LDH-Nal obtenidas de las curvas de TGA, el contenido del anión determinado por intercambio aniónico y la relación molar de los metales que componen las láminas determinadas por EDS. En la Tabla 3.1 se presentan los resultados de los análisis y las fórmulas químicas propuestas.

Como se observa, existe una buena correlación entre los valores experimentales y los calculados sobre la base de la fórmula propuesta, lo cual indica una adecuada aproximación a la composición real de los LDH-Nal.

La fórmula de LDH-Nal-pHvar se propuso considerando la presencia de una única fase de LDH intercalada tanto con aniones Na^+ como con Cl^- .

La relación Mg:Al (3,3:1) fue similar a la de la solución de partida, mientras que el contenido de Nal indicó que los aniones Na^+ ocuparon el 56 % de los sitios intercambiables.

Por otra parte, la fórmula de LDH-Nal-pHcte fue propuesta considerando la presencia de dos fases, una correspondiente a LDH intercalados con Na^+ y otra fase correspondiente al complejo $\text{Mg}(\text{Nal})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

De acuerdo con la fórmula química propuesta, aproximadamente el 85 % de los aniones de Na^+ fueron incorporados entre las láminas de la fase de LDH, con una relación Mg:Al 2,3:1, concordante con la disolución parcial de los iones Mg^{2+} y una ocupación del 73 % de los sitios de intercambio de los LDH. Por otra parte, el 15 % restante de aniones Na^+ formó parte del complejo $\text{Mg}(\text{Nal})_2$.

Tabla 3. 1. Resultados de análisis elemental y fórmula propuesta para los LDH-Nal. Los valores teóricos de acuerdo a la fórmula propuesta se encuentran entre paréntesis

Muestra	Mg:Al ^a	% C ^b	% N ^b	% H ₂ O ^c	% P ₇₅₀ ^d	% NaI ^{interc} ^e	Fórmula
LDH-Cl	2,8 (2,8)	--	--	14,1 (14,0)	55,9 (54,2)	--	Mg _{0,74} Al _{0,26} (OH) ₂ Cl _{0,26} · 0,62 H ₂ O
LDH-Nal- pHvar	3,3 (3,3)	18,3 (18,0)	3,3 (3,4)	15,3 (15,3)	39,0 (41,2)	32,0 (27,9)	Mg _{0,77} Al _{0,23} (OH) _{2,00} NaI _{0,13} · Cl _{0,10} · 0,88 H ₂ O
LDH-Nal- pHcte	2,4 (2,4)	28,4 (26,7)	5,1 (5,1)	14,0 (14,1)	29,5 (31,9)	35,7 (36,1)	Mg _{0,70} Al _{0,30} (OH) _{2,00} NaI _{0,22} · Cl _{0,08} · 0,99 H ₂ O + 0,02 Mg(NaI) ₂ · 4 H ₂ O
Mg(NaI) ₂	--	50,4 (51,6)	10,2 (10,0)	12,7 (12,9)	6,3 (7,2)	5,4 (0)	Mg(NaI) ₂ · 4 H ₂ O

^a mol mol⁻¹ determinado por EDS

^b p p⁻¹ determinado por el método Pregl-Dumas

^c peso residual a 175 °C determinado por TGA (Figura 3.6)

^d peso residual a 750 °C determinado por TGA (Figura 3.6), los valores teóricos fueron calculados considerando que los únicos residuos a esta temperatura son óxidos metálicos

^e porcentaje de NaI intercambiable (p p⁻¹), determinado por espectrometría UV-Vis en dispersiones 1 g L⁻¹ en PBS7,4

Los porcentajes de Nal intercambiable ($\% \text{Nal}_{\text{interc}}$), determinados en PBS7,4, exhibieron un buen ajuste tanto para LDH-Nal-pHvar como para LDH-Nal-pHcte. Sin embargo, para esta última muestra se consideró que solamente los iones Nal^- en la fase de LDH eran intercambiables y que los iones Nal de $\text{Mg}(\text{Nal})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ no fueron liberados en este medio. En efecto, la muestra de referencia $\text{Mg}(\text{Nal})_2$ mostró un bajo $\% \text{Nal}_{\text{interc}}$ (5,4 %) en el mismo medio, confirmando que la liberación no se produce por intercambio iónico sino por disolución para este sólido.

3.1.1.7. DLS, DLE y SEM

Las muestras de LDH presentaron un valor positivo alto de ζ , siendo de 41 ± 3 y $43,7 \pm 0,4$ mV para LDH-Cl y LDH-Nal-pHvar, respectivamente; mientras que, la presencia de $\text{Mg}(\text{Nal})_2$ ($-13,5 \pm 0,3$ mV) hizo que el ζ de LDH-Nal-pHcte disminuya a 37 ± 2 mV.

Como se observa en la Figura 3.7.a, las partículas de LDH-Cl presentaron una morfología laminar con simetría hexagonal, típica de los LDH; mientras que, las nanopartículas de LDH-Nal-pHvar (Figura 3.7.b) se mostraron más delgadas, más pequeñas y de forma irregular. La morfología de las partículas LDH-Nal-pHvar, delgadas y nanométricas, fue consistente con los picos anchos obtenidos para las fases de LDH en los patrones de DRXP, que indicaron la baja cristalinidad y pobre apilamiento de las láminas.

De acuerdo con la Figura 3.7.f, el sistema LDH-Nal-pHvar presentó un amplio rango de distribución de tamaños, con un d_H de $(27 \pm 2) \cdot 10^1$ nm y un índice de polidispersidad (IP) de $0,27 \pm 0,06$; el d_H estuvo en el mismo orden que el obtenido para LDH-Cl, que fue de 87 ± 8 nm con un IP de $0,11 \pm 0,02$. Consecuentemente, los mayores valores de d_H registrados para el sistema LDH-Nal-pHvar en comparación con LDH-Cl estuvieron asociados a una aglomeración o agregación de estas partículas.

Las imágenes de SEM de LDH-Nal-pHcte (Figura 3.7.c y d) mostraron las mismas partículas pequeñas que las observadas para LDH-Nal-pHvar, correspondientes a la fase de LDH-Nal, pero también se pudieron observar otras partículas con forma de varilla y

de longitud micrométrica, las cuales fueron asignadas al complejo $Mg(NaI)_2$. Estas partículas presentaron una morfología similar a las de la muestra de referencia de $Mg(NaI)_2$ (Figura 3.7.e), pero en el caso de LDH-Nal-pHcte se presentaron cubiertas por las nanopartículas de LDH-Nal.

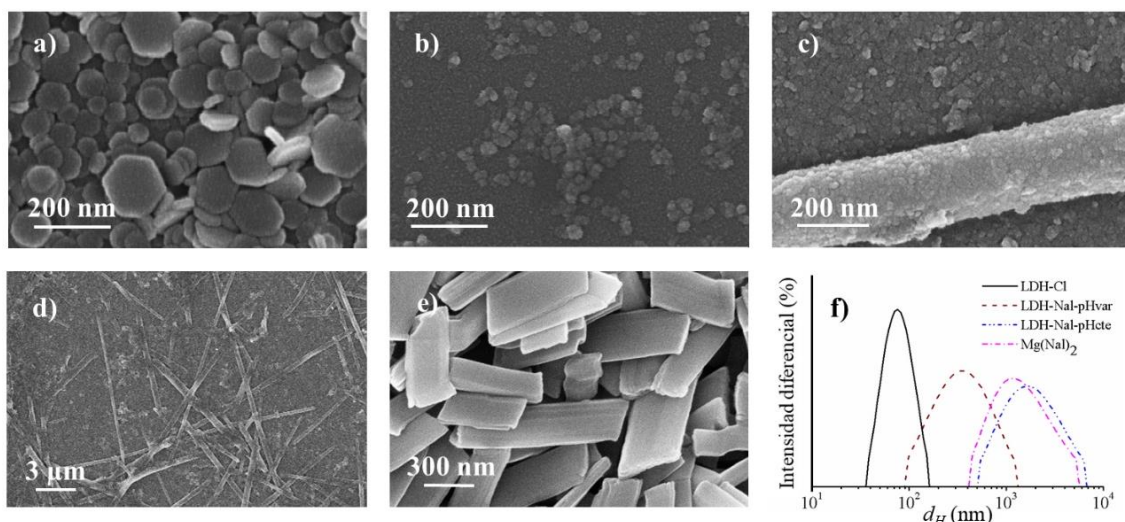


Figura 3. 7. Imágenes SEM de: a) LDH-Cl, b) LDH-Nal-pHvar, c) y d) LDH-Nal-pHcte, e) $Mg(NaI)_2$. f) distribución de tamaños por intensidad de los LDH-Nal y de muestras de referencia

La distribución de tamaños de partícula de LDH-Nal-pHcte (Figura 3.7.f) se mostró más amplia y desplazada al rango micrométrico, con un $d_H = 1,8 \pm 0,1 \mu m$ y un IP de $0,48 \pm 0,03$. En este caso, el incremento del d_H para LDH-Nal-pHcte no fue atribuido a la agregación de nanopartículas de LDH, sino a la presencia de la fase de $Mg(NaI)_2$ que presentó un d_H promedio de $1,97 \pm 0,06 \mu m$ y un IP de $0,62 \pm 0,06$.

3.1.2. Estudios de liberación *in vitro* del FAQ

La liberación de Nal desde los LDH-Nal se estudió para determinar el mecanismo de liberación del FAQ desde el SP y evaluar la velocidad de liberación en distintos medios biorrelevantes para la vía de administración tópica (Figura 3.8). El ajuste de los datos de liberación con modelos cinéticos (orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas) permitió establecer el paso determinante de la liberación del FAQ y el mecanismo de liberación involucrado (Tabla 3.2). Los perfiles cinéticos teóricos obtenidos con los mejores ajustes

de cada muestra y en cada medio de liberación (marcados con un asterisco en la Tabla 3.2) fueron incluidos en la Figura 3.8 para dar una guía e indicación de la calidad del ajuste de los modelos. En todos los casos, se realizó una evaluación comparativa contra el FAQ puro como referencia.

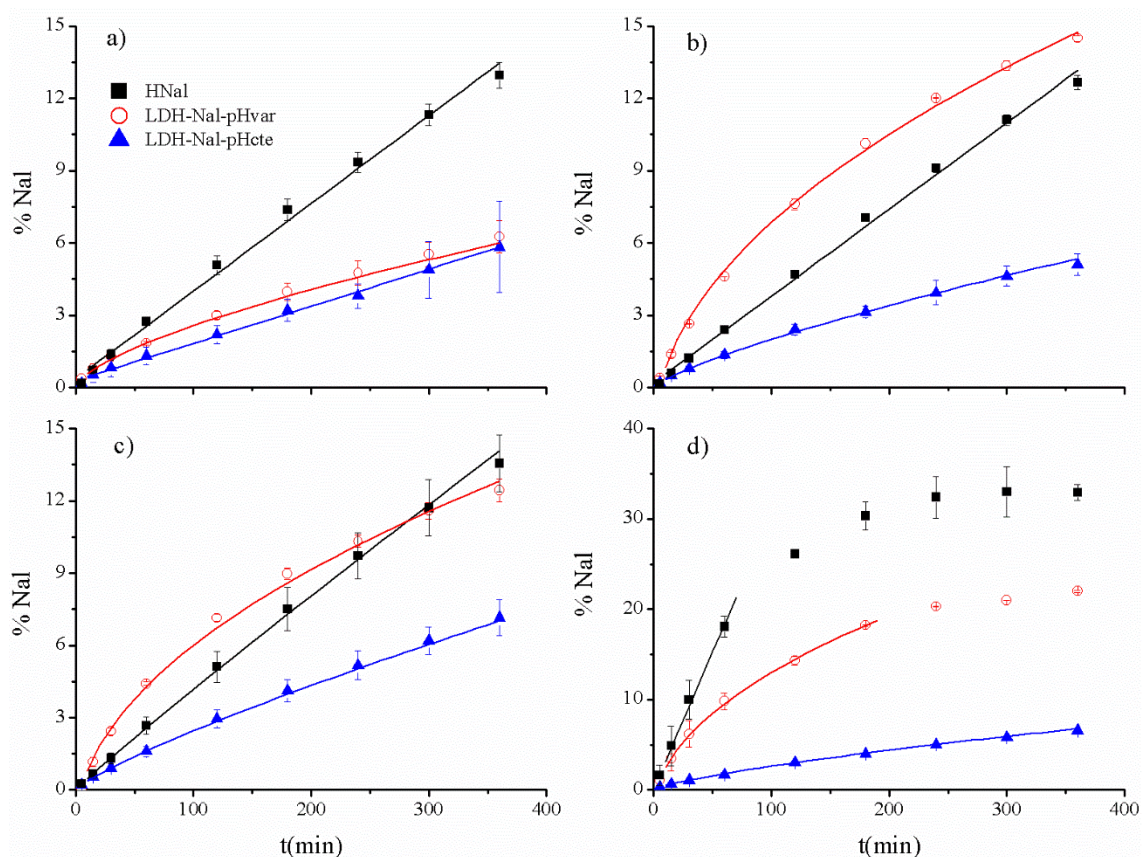


Figura 3. 8. Perfiles de liberación *in vitro* de Nal, a partir de los LDH-Nal colocados como dispersiones en el compartimento donante, y de una solución del FAQ puro como referencia, liberado hacia: a) agua (pH = 5,6), b) NaCl 0,9 % (pH = 5,6), c) PBS5,8 y d) PBS7,4. Las líneas continuas representan los perfiles teóricos determinados con los modelos que presentaron el mejor ajuste en cada experimento.

El FAQ puro presentó un comportamiento de liberación similar para agua, NaCl 0,9 % y PBS5,8, lo cual produjo una liberación acumulativa de Nal a 360 min (%Nal₃₆₀) de aproximadamente 13 %.

Tabla 3. 2. Datos cinéticos obtenidos por el modelado de los perfiles de liberación de Nal con modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Los mejores ajustes con base en el R² están marcados con un asterisco

Modelo cinético		Orden cero			Higuchi			Korsmeyer-Peppas		
Medio receptor	Muestra	%Nal ₀	k _C	R ²	%Nal ₀	k _H	R ²	-log(k _P)	n	R ²
Agua	HNal	0,36*	0,0364*	0,995*	-2,6	0,78	0,981	1,37	0,99	0,993
	LDH-Nal-pHvar	0,71	0,0163	0,984	-0,66	0,35	0,994	0,90*	0,66*	0,999*
	LDH-Nal-pHcte	0,29*	0,0154*	0,997*	-0,95	0,33	0,971	1,31	0,80	0,995
NaCl 0,9 %	HNal	0,20*	0,036*	0,997*	-2,71	0,77	0,975	1,46	1,02	0,997
	LDH-Nal-pHvar	1,57	0,040	0,960	-1,94*	0,88*	0,998*	0,88	0,83	0,985
	LDH-Nal-pHcte	0,41	0,014	0,985	-0,76	0,30	0,992	1,24*	0,77*	0,999*
PBS5,8	HNal	0,29	0,038	0,997	-2,79	0,81	0,976	1,28*	0,95*	1,000*
	LDH-Nal-pHvar	1,50	0,034	0,939	-1,6*	0,76*	0,997*	1,67	1,17	0,861
	LDH-Nal-pHcte	0,36	0,020	0,995	-1,25	0,42	0,982	1,25*	0,82*	1,000*
PBS7,4	HNal	0,42	0,30	0,997	-6,02	3,03	0,986	0,48*	0,98*	0,999*
	LDH-Nal-pHvar	2,45	0,094	0,959	-2,31*	1,53*	1,000*	0,42	0,77	0,980
	LDH-Nal-pHcte	0,54	0,018	0,988	-0,95	0,38	0,990	1,06*	0,74*	1,000*

k_C está expresado como (% min⁻¹) y k_H como (% min^{-0,5})

Además, los perfiles de liberación fueron lineales en todos los casos, como lo indican los valores del coeficiente de regresión (R^2), mayores a 0,99 para el modelo de orden cero. Esto indicó que, el paso determinante para la liberación de Nal desde el FAQ puro fue la disolución desde la superficie de la partícula.

En cambio, en PBS7,4 el %Nal₃₆₀ alcanzado fue de alrededor del 33 % y de forma contraria a lo obtenido en los otros medios antes mencionados, la concentración del FAQ en el medio receptor alcanzó un máximo y se estabilizó dentro del tiempo de experimentación. Sin embargo, el mejor ajuste para el perfil (hasta el 80 % de la liberación total máxima alcanzada) se obtuvo para un modelo de Korsmeyer-Peppas con un $n \sim 1$, lo cual, como se indicó anteriormente, se relaciona con un modelo de orden cero. Consecuentemente, la disolución del FAQ sigue siendo el paso determinante y la única diferencia que se observó fue debida al pH neutro del medio receptor que incrementó la solubilidad del HNal.

Los perfiles de liberación de Nal desde LDH-Nal-pHvar presentaron una dependencia con el medio receptor, en comparación con el FAQ puro. Así, el %Nal₃₆₀ se incrementó en el siguiente orden: agua << PBS5,8 < NaCl 0,9% << PBS7,4 (con alrededor de 6, 12, 14 y 22 %, respectivamente). El mejor ajuste se obtuvo para el modelo de Higuchi, el cual indica que la difusión fue el paso determinante para la liberación del FAQ. Este comportamiento es típico de los LDH a pH superior a 5, donde la disolución de las láminas es mínimo y el intercambio aniónico es el principal mecanismo de liberación [24]. En consecuencia, la liberación más rápida fue observada en PBS7,4 debido a la presencia de aniones divalentes HPO_4^{2-} , los cuales presentan una alta afinidad por los LDH [25]. La excepción fue el perfil de liberación en agua, cuyo mejor ajuste fue obtenido para el modelo de Peppas, con $n = 0,66$. En este medio, el intercambio aniónico es limitado por la ausencia de aniones, por lo que, otros procesos, tales como la disolución de la matriz [26], [27], contribuyeron a la liberación del FAQ desde el portador.

Finalmente, la presencia de $Mg(Nal)_2$ en LDH-Nal-pHcte produjo varios cambios con respecto a los obtenidos para LDH-Nal-pHvar. El %Nal₃₆₀ fue menor (alrededor del 6 a 7%) e independiente del medio receptor. Además, los mejores ajustes no se obtuvieron para el modelo de Higuchi, lo que implica un cambio en el mecanismo de liberación. Para el caso del agua, el mejor ajuste se obtuvo para el modelo de orden cero, lo que indica

que el intercambio aniónico fue totalmente suprimido. Para los medios restantes, el mejor ajuste se obtuvo para el modelo de Korsmeyer-Peppas con un valor de n entre 0,74 y 0,82. Entonces, la presencia de $Mg(Nal)_2$ en LDH-Nal-pHcte, a pesar de su baja concentración, consigue una modulación significativa del perfil de liberación, lo cual indica que, aunque el intercambio aniónico desde LDH-Nal es el principal mecanismo de liberación, este fue modulado por la presencia del complejo.

Estos resultados indican que ambos LDH-Nal permiten modular la liberación del FAQ, aunque sus características intrínsecas dan lugar a comportamientos de liberación completamente diferentes. Por lo tanto, la liberación de Nal desde LDH-Nal-pHvar hacia los medios que simulan condiciones fisiológicas de la piel intacta (PBS5,8) y del exudado plasmático (PBS7,4) indica un comportamiento pH-dependiente que no se presenta desde la muestra LDH-Nal-pHcte. Este comportamiento puede conducir a una rápida liberación en áreas lastimadas de la piel, donde el FAQ es mayormente requerido. Además, debido a la rápida liberación desde LDH-Nal-pHvar, en comparación con LDH-Nal-pHcte, se esperaría que el primer sistema mencionado alcance los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con mayor rapidez, mientras que, el segundo sistema mencionado proporcionaría una acción más sostenida en el tiempo.

Debido a que la concentración del FAQ se determinó por espectrofotometría UV-Vis, se logró verificar que los espectros de absorción del FAQ liberado de los LDH-Nal fueron similares al del FAQ previo a su incorporación en los LDH; es decir, no se presentaron cambios en el espectro de absorción del FAQ asociados a la fotodegradación [28]. Esto permitió inferir que no hubo degradación del Nal luego de su incorporación en el SP. Por lo tanto, el FAQ preservó su actividad, lo cual se confirmó posteriormente con los ensayos de actividad antimicrobiana.

3.1.3. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Los estudios relacionados con la sensibilidad antimicrobiana de los LDH-Nal se realizaron frente a *S. aureus*, el cual es un microorganismo oportunista que suele causar infecciones tópicas [29].

La CIM determinada experimentalmente para el HNal fue de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual es igual a la reportada previamente por otros autores [30], [31]; mientras que, para LDH-Nal-pHcte y LDH-Nal-pHvar fue de 64 y 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 3.9.a). Estos resultados indican que la incorporación de Nal en los LDH incrementó la actividad antimicrobiana en comparación con el FAQ puro. Dado que, la muestra de LDH-CI presentó una ausencia de actividad antimicrobiana en el rango estudiado, la mayor actividad de los LDH-Nal se relacionó exclusivamente con la acción antimicrobiana del Nal vehiculado.

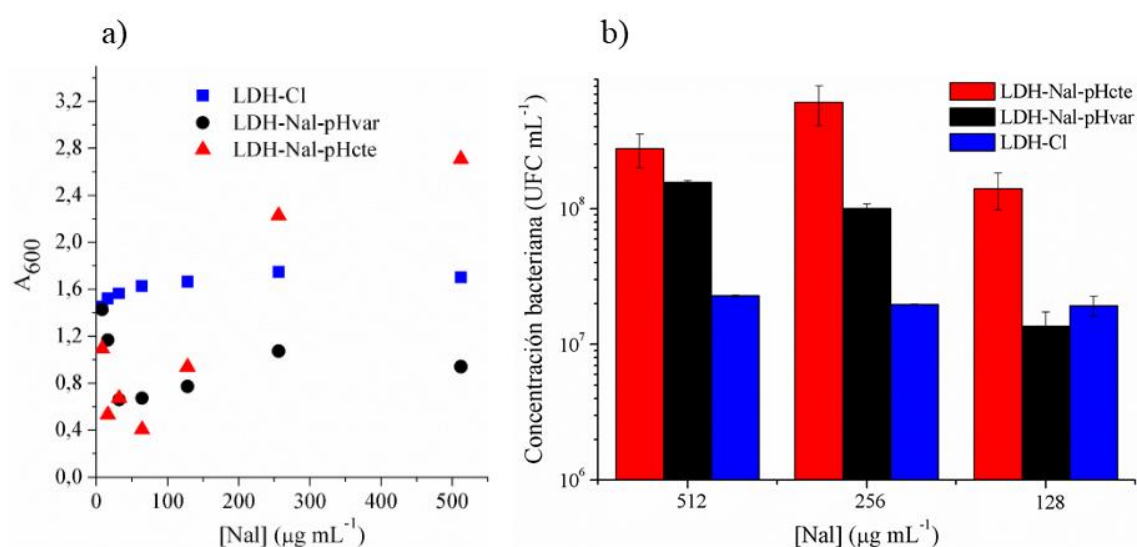


Figura 3. 9. Estudios microbiológicos de LDH-Nal y LDH-CI relacionados con la CIM: a) absorbancia a $\lambda = 600$ nm de los cultivos bacterianos (A_{600}) en función de la $[\text{Nal}]$ en cada sistema y b) recuento de bacterias en AMH de las muestras que contenían una $[\text{Nal}]$ superior a la CIM

La disminución de la CIM puede explicarse mediante el mecanismo de acción del HNal y los efectos producidos por la vehiculización del FAQ en los LDH. La actividad antimicrobiana del HNal se basa en la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos [32], específicamente afecta a la ADN girasa [33]. Consecuentemente, la penetración de la membrana celular bacteriana es esencial para su acción antimicrobiana. Debido a la carga positiva y tamaño nanométrico de los LDH-Nal, éstos son capaces de interactuar con la membrana celular, incrementando la permeabilidad del Nal [34], [35]. De esta manera se facilita la acción del Nal y como resultado se logran menores CIM.

Por otro lado, las dispersiones de los LDH-Nal se volvieron cada vez más turbias con el incremento de la concentración del Nal, lo cual no solo se debió al aumento de la concentración de partículas, sino también a la proliferación bacteriana, según los resultados del recuento de bacterias presentados en la Figura 3.9.b.

Este tipo de comportamiento ha sido previamente reportado para los FAQ [36], [37]; es así que, para el HNal se obtiene una mayor actividad antimicrobiana en un rango de concentraciones entre 50 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra la mayoría de bacterias Gram negativas; mientras que, a una concentración mayor su actividad disminuye [38].

Sin embargo, las explicaciones para este comportamiento, denominado paradójico porque se produce una inhibición de la acción antimicrobiana a altas concentraciones de los FAQ, aún no están del todo claras y definidas. Según unos autores, debido a que la acción bactericida del HNal es dependiente de la síntesis de proteínas y ARN (que no se ven afectados a concentraciones óptimas), este comportamiento es el resultado de la inhibición de estos procesos cuando se aplican altas concentraciones de FAQ, lo que conduce a una reducción de la actividad antimicrobiana [38], [39]. Así mismo, estudios realizados con la proteasa Lon, conocida por degradar proteínas dañadas y producidas en exceso, indicaron que la deficiencia de esta proteasa disminuía este efecto paradójico. Como consecuencia, se relacionó a esta proteasa con la eficacia de la letalidad de los FAQ y se sugirió que los complejos ADN-topoisomerasaII-FAQ que se forman a altas concentraciones son diferentes a los complejos formados a concentraciones bactericidas óptimas para estos FAQ [37]. Además, se planteó que las diferentes concentraciones de FAQ afectan los estados metabólicos celulares, de manera que las bacterias se vuelven más o menos susceptibles a la acción de estos FAQ [33].

En la presente investigación, los resultados relacionados con la CIM se complementaron con ensayos de difusión en AMH a diferentes concentraciones (Figura 3.10.a), en los que se pudo apreciar la zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Figura 3.10.b).

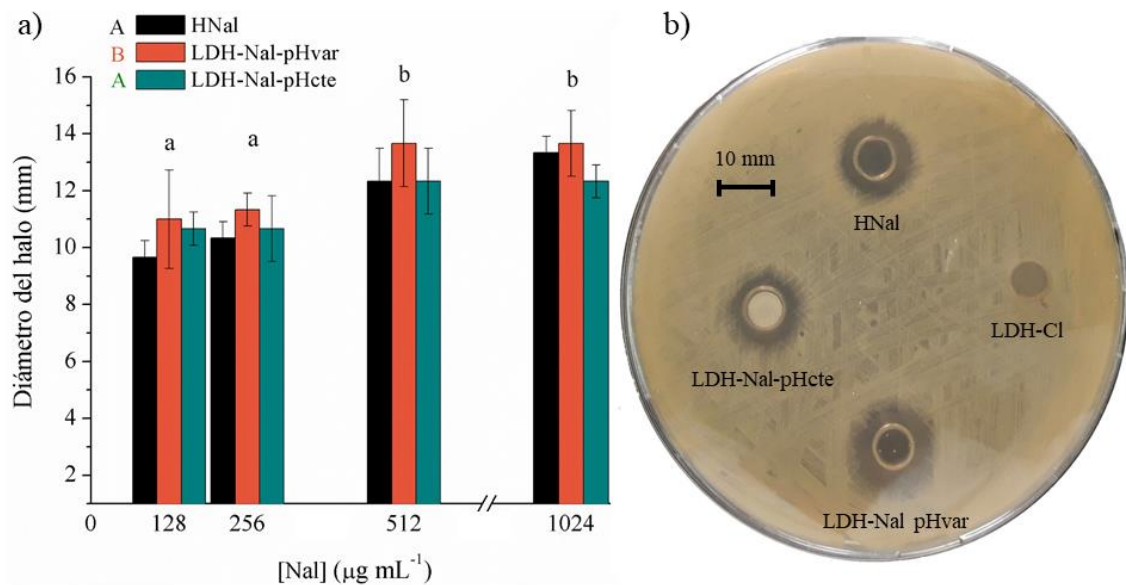


Figura 3. 10. a) Diámetro del halo de inhibición para los sistemas LDH-Nal y FAQ en función de la [Nal]. La diferencia estadísticamente significativa para los sistemas está indicada por letras mayúsculas; mientras que, para las concentraciones se indica con letras minúsculas, con un 95 % de confianza ($p < 0,05$) según la prueba LSD; b) Halos de inhibición a $[Nal] = 512 \mu\text{g mL}^{-1}$ en AMH

Si bien los diámetros del halo para todos los tratamientos indican que la cepa bacteriana es resistente, tanto al HNal como a los LDH-Nal, existió un efecto estadísticamente significativo entre LDH-Nal-pHvar en comparación con LDH-Nal-pHcte y el FAQ puro. Por otro lado, no se presentó un efecto estadísticamente significativo debido a la interacción de las variables de estudio (sistema y concentración), pero sí hubo un efecto debido a la concentración de FAQ utilizada. En este ensayo, se presentó un incremento del halo de inhibición a una concentración de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que, a $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ no se presentaron diferencias significativas, lo cual estaría en concordancia con lo descrito anteriormente respecto de la concentración de FAQ y su actividad antimicrobiana, pues el HNal tiene concentraciones inhibitorias óptimas fuera de las cuales disminuye la eficacia de su actividad.

De acuerdo con los resultados obtenidos, al considerar la concentración de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ como óptima, el diámetro del halo de inhibición para el FAQ puro fue de alrededor de 12 mm, lo cual indica su pobre actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

LDH-Nal-pHvar presentó una acción ligeramente mayor, exhibiendo un halo con un diámetro de alrededor de 14 mm, lo cual concuerda con la menor CIM obtenida para esta muestra. Mientras que, LDH-Nal-pHcte no presentó diferencias significativas con el FAQ puro, lo cual fue consistente con la mayor CIM y su cinética de liberación más lenta en comparación con LDH-Nal-pHvar.

3.2. Conclusiones parciales

El método de síntesis afectó a los SP obtenidos debido a la presencia de una reacción de formación de complejos metálicos con FAQ. La variación de las condiciones de síntesis permitió obtener SP de FAQ con base en nanopartículas de LDH con una fase pura, por co-precipitación a pH variable o con una fase adicional asignada al complejo metálico, por medio de una coprecipitación a pH constante.

La liberación del FAQ a partir de los LDH se produjo principalmente por un mecanismo de intercambio aniónico y su velocidad fue dependiente de la concentración y naturaleza de los aniones intercambiables, así como del pH del medio receptor. La presencia del complejo metálico ($Mg(Nal)_2$) produjo una modificación del mecanismo de liberación y una disminución de la velocidad de liberación, resultando en una liberación más sostenida e independiente del medio de liberación.

La vehiculización de FAQ en LDH de tamaño nanométrico produjo un incremento estadísticamente significativo de la actividad antimicrobiana, en comparación con el FAQ puro.

Los sistemas obtenidos presentan características interesantes como SP de FAQ, pero es necesaria una cuidadosa selección del método de síntesis para controlar las interacciones de los FAQ con los iones metálicos que forman las láminas de los LDH y, por lo tanto, las propiedades de los sistemas obtenidos.

3.3. Referencias bibliográficas

- [1] X. Yue, W. Liu, Z. Chen, and Z. Lin, “Simultaneous removal of Cu(II) and Cr(VI) by Mg–Al–Cl layered double hydroxide and mechanism insight,” *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 53, no. 11, pp. 16–26, 2016.
- [2] S. Özgümüş, M. K. Gök, A. Bal, and G. Güçlü, “Study on novel exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg-Al-Cl layered double hydroxide: Synthesis and characterization,” *Chem. Eng. J.*, vol. 223, pp. 277–286, 2013.
- [3] C. X. Liu, W. G. Hou, Y. Li, and L. F. Li, “Synthesis and Characterization of Camptothecin Intercalated into Mg/Al Layered Double Hydroxide,” *Chinese J. Chem.*, vol. 26, no. 10, pp. 1806–1810, 2008.
- [4] Z. Wang, E. Wang, L. Gao, and L. Xu, “Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil,” *J. Solid State Chem.*, vol. 178, no. 3, pp. 736–741, 2005.
- [5] V. Rives, M. Arco, and C. Martín, “Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release : A review,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [6] S. Ghamami, A. Lashgari, and M. Golzani, “Controlled drug release study of a quinolone antibiotic coupled to layered zinc hydroxide nanohybrids and its chitosan nanocarriers,” *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 88, no. 1–2, pp. 1–14, 2017.
- [7] H. Nabipour, M. H. Sadr, and N. Thomas, “Synthesis, controlled release and antibacterial studies of nalidixic acid–zinc hydroxide nitrate nanocomposites,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 1, pp. 238–244, 2016.
- [8] Z. Rezvani and M. Shahbaei, “Bionanocomposites Based on Alginate and Chitosan/Layered Double Hydroxide with Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties,” *Polym. Polym. Compos.*, pp. 1–7, 2014.

- [9] D. Aristizabal-Bedoya, C. Vasti, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Risedronate functionalized layered double hydroxides nanoparticles with bone targeting capabilities," *Appl. Clay Sci.*, vol. 141, pp. 257–264, 2017.
- [10] C. Jaubertie, M. J. Holgado, M. S. San Roman, and V. Rives, "Structural characterization and delamination of lactate-intercalated Zn,Al-layered double hydroxides," *Chem. Mater.*, vol. 18, no. 13, pp. 3114–3121, 2006.
- [11] D. Mosangi, S. Kesavan Pillai, L. Moyo, and S. S. Ray, "Inorganic layered double hydroxides as a 4-hexyl resorcinol delivery system for topical applications," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 81, pp. 77709–77716, 2016.
- [12] S. P. Lonkar, A. Leuteritz, and G. Heinrich, "Antioxidant intercalated layered double hydroxides: A new multifunctional nanofiller for polymers," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 5, pp. 1495–1501, 2013.
- [13] D. G. Evans and R. C. T. Slade, "Structural Aspects of Layered Double Hydroxides," in *Structure & Bonding*, vol. 119, no. 2005, D. G. Evans and X. Duan, Eds. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 1–87.
- [14] V. Rives, *Layered double hydroxides: present and future*. New York: Nova Science Publishers, 2001.
- [15] F. A. I. Al-Khodir and M. S. Refat, "Synthesis, structural characterization and biological studies of some nalidixic acid-metal complexes: Metalloantibiotic complexes of some divalent and trivalent metal ions," *J. Mol. Struct.*, vol. 1094, pp. 22–35, 2015.
- [16] J. T. Klopogge and R. L. Frost, "Infrared and Raman Spectroscopic Studies of Layered Double Hydroxides (LDHs)," in *Layered Double Hydroxides: Present and Future*, V. Rives, Ed. New York: Nova Science Publishers, 2006, pp. 153–215.
- [17] R. Rojas, Y. Garro, S. L. Cuffini, G. A. Monti, and C. E. Giacomelli, "Structural and physicochemical aspects of drug release from layered double hydroxides and layered hydroxide salts," *Appl. Clay Sci.*, vol. 109–110, pp. 119–126, 2015.

- [18] N. Barba-Behrens, G. Mendoza-Diaz, and D. M. L. Goodgame, "Metal complexes of the antibiotic nalidixic acid," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 125, no. 1, pp. 21–26, 1986.
- [19] B. Stuart, *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, UK: Wiley, 2005.
- [20] M. Nakano, M. Yamamoto, and T. Arita, "Interactions of Aluminium, Magnesium, and Calcium Ions with Nalidixic Acid," *Chem Pharm Bull*, vol. 26, no. 5, pp. 1505–1510, 1978.
- [21] J. Bocclair and P. Braterman, "Synthesis and characterisation of layered double hydroxide dispersions in organic solvents," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 2, pp. 298–302, 1999.
- [22] I. Turel, "The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 232, no. 1–2, pp. 27–47, 2002.
- [23] R. Rojas, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 463, pp. 37–43, 2014.
- [24] M. del Arco, A. Fernández, C. Martín, and V. Rives, "Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg,Al,Fe-hydrotalcites," *Appl. Clay Sci.*, vol. 42, no. 3–4, pp. 538–544, 2009.
- [25] R. Rojas, M. C. Palena, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex," *Appl. Clay Sci.*, vol. 62–63, pp. 15–20, 2012.
- [26] M. L. Parello, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 134–139, 2010.
- [27] J. W. Bocclair and P. S. Braterman, "Layered double hydroxide stability. 1. Relative stabilities of layered double hydroxides and their simple counterparts," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 2, pp. 298–302, 1999.

- [28] F. Vargas, C. Rivas, and R. Machado, "Decarboxylation and singlet oxygen production in the photolysis of nalidixic acid," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 11, pp. 81–85, 1991.
- [29] M. C. García *et al.*, "Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 175, pp. 75–86, 2017.
- [30] A. L. Barry, R. N. Jones, C. Thornsberry, L. W. Ayers, E. H. Gerlach, and H. M. Sommers, "Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 25, no. 5, pp. 633–637, 1984.
- [31] H. L. Muytjens, J. Van Der Ros Van De Repe, and G. Van Veldhuizen, "Comparative activities of ciprofloxacin (Bay o 9867), norfloxacin, pipemidic acid, and nalidixic acid," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 24, no. 2, pp. 302–304, 1983.
- [32] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria," *Am. J. Infect. Control*, vol. 34, no. 5 SUPPL., 2006.
- [33] A. Gutierrez, J. Stokes, and I. Matic, "Our Evolving Understanding of the Mechanism of Quinolones," *Antibiotics*, vol. 7, no. 2, p. 32, 2018.
- [34] S. Malekkhaiat Häffner *et al.*, "Membrane interactions and antimicrobial effects of layered double hydroxide nanoparticles," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 35, pp. 23832–23842, 2017.
- [35] C. Vasti, V. Pfaffen, E. Ambroggio, M. R. Galiano, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "A systematic approach to the synthesis of LDH nanoparticles by response surface methodology," *Appl. Clay Sci.*, vol. 137, pp. 151–159, 2017.
- [36] G. Cheng, H. Hao, M. Dai, Z. Liu, and Z. Yuan, "Antibacterial action of quinolones: From target to network," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 66, pp. 555–562, 2013.
- [37] M. Malik, J. Capecci, and K. Drlica, "Lon protease is essential for paradoxical survival of *Escherichia coli* exposed to high concentrations of quinolone," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 7, pp. 3103–3105, 2009.

- [38] G. C. Crumplin and J. T. Smith, "Nalidixic acid: an antibacterial paradox.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 8, no. 3, pp. 251–261, 1975.
- [39] L. J. Piddock, R. N. Walters, and J. M. Diver, "Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli.*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, no. 12, pp. 2331–2336, 1990.

CAPÍTULO IV

**SP de Cip con base en LDH y su
adecuación para una vía de
administración tópica**

Capítulo IV: SP de Cip con base en LDH y su adecuación para una vía de administración tópica

La experiencia previa adquirida con el desarrollo de LDH-Nal facilitó la obtención de un SP de Cip, con base en LDH de Zn y Al, sintetizado por co-precipitación a pHvar y la comprensión de las propiedades del sistema.

En este capítulo se presentan las características del SP de Cip, el cual fue empleado para el diseño preliminar de una forma farmacéutica adaptada para una administración tópica, bajo la forma de films a manera de apósito, empleando una matriz polimérica de HS y Gli como plastificante, con la finalidad de estudiar las potencialidades del SP de Cip para la profilaxis y tratamiento de infecciones de la piel.

4.1. Resultados y discusión

4.1.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de los LDH-Cip

Para la obtención de LDH intercalados con Cip se llevaron a cabo ensayos preliminares en los que se estudió, entre otros, el efecto del tipo de metal divalente, de la relación $M^{+2}:M^{+3}$ y del tratamiento hidrotermal.

Después de estos experimentos, se seleccionaron LDH de Zn:Al con relación molar 2:1 de $M^{+2}:M^{+3}$ debido a que estos LDH presentaron reproducibilidad en la síntesis, mayor cristalinidad y mayor incorporación de FAQ, entre todos los sintetizados. Además, no se presentaron complejos metálicos y no se requirió de tratamiento hidrotermal, con lo que se eliminó un paso en el procedimiento de obtención de estos LDH y el gasto energético asociado a este proceso. A continuación, se presenta la caracterización fisicoquímica de este SP.

4.1.1.1. DRXP

Las fases presentes en el sistema LDH-Cip se caracterizaron por medio de su patrón de DRXP y de los patrones de las muestras de referencia (Figura 4.1). Los índices de Miller de la muestra LDH-Cip (Figura 4.1.a) se establecieron de acuerdo con lo reportado en bibliografía [1], [2].

Al igual que los LDH-Nal, el sistema LDH-Cip presentó las reflexiones características de los LDH, reflexiones basales ($00l$) con picos intensos y agudos a 2θ menores a 35° , picos ($0kl$) menos intensos y menos agudos para valores 2θ superiores, y reflexiones (110) alrededor de los $60^\circ 2\theta$. No obstante, LDH-Cip presentó un mayor número de reflexiones $00l$ y sus picos fueron más agudos comparados con los de LDH-Nal, lo cual es indicativo de un gran espaciamiento interlaminar y una alta cristalinidad de la muestra [3].

La intercalación de Cip entre las láminas de los LDH resultó en un valor de d igual a 32 \AA , el cual fue mayor al reportado por Sillion *et al* (2008) y Mishra *et al* (2017) con $20,61 \text{ \AA}$ [4] y $20,73 \text{ \AA}$ [5], respectivamente; y similar al obtenido por Rezvani y Shhbaei (2014) con $30,4 \text{ \AA}$ [6], para LDH de Zn y Al intercalados con Cip. El incremento del d comparado con el de LDH intercalados con el anión cloruro ($7,6 \text{ \AA}$ [1]) confirmó la intercalación del FAQ.

De esta manera, el espacio o dominio interlaminar tendría un tamaño alrededor de $27,2 \text{ \AA}$, obtenido al sustraer el valor del espesor de una lámina ($4,8 \text{ \AA}$) [6] del valor de d . Dado que la molécula de Cip tiene un tamaño aproximado de $12,2 \text{ \AA}$ de largo, $8,0 \text{ \AA}$ de ancho y $4,1 \text{ \AA}$ de espesor [7], [8], el dominio interlaminar tiene el tamaño suficiente como para alojar a los aniones de Cip (Cip^-) en un arreglo vertical en bicapa, con los grupos carboxilato orientados hacia las láminas. El arreglo propuesto de las moléculas intercaladas en el espacio interlaminar se ilustra en la Figura 4.2.

En cuanto al parámetro c , si se considera una estructura $3R$, se obtendría un valor de 96 \AA ; mientras que, el parámetro a sería igual a $3,06 \text{ \AA}$, el cual se corresponde con lo reportado en bibliografía [4] y es similar al de la distancia entre los cationes de Mg y Al

(3,05 Å) obtenido para el SP de NaI, sugiriendo que las láminas con Zn y Al presentan un arreglo similar.

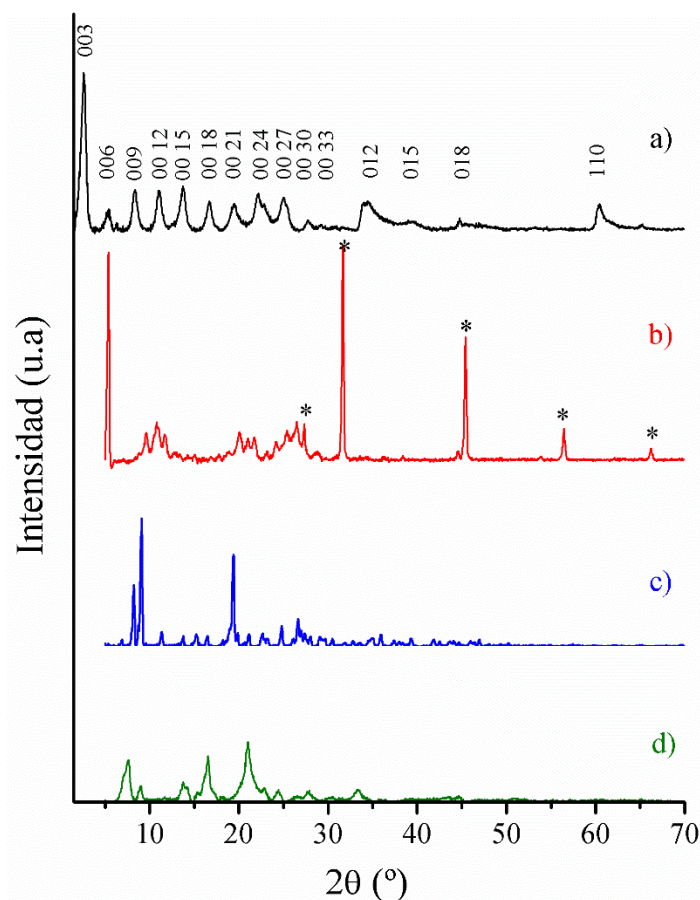


Figura 4. 1. Patrones de DRXP de a) LDH-Cip, b) NaCip (*NaCl), c) CipHCl y d) ZnCip₂

Por otro lado, en LDH-Cip no se presentaron picos correspondientes a fases de CipHCl o NaCip, lo cual indica la ausencia de FAQ puro, ya sea en su forma ácida o básica. La muestra de referencia NaCip presentó una fase adicional señalada por asteriscos (*), correspondiente a NaCl, de acuerdo con el análisis realizado al considerar posibles productos secundarios de la síntesis y la información disponible en la base de datos (ICDS: 00-019-0748). Cabe destacar que, éste se formó al obtener la disolución básica de la forma clorhidrato del FAQ (CipHCl).

El patrón de LDH-Cip tampoco presentó picos correspondientes a la fase de ZnCip₂, es decir que, al igual que los LDH-NaI sintetizados a pHvar, no se presentó un complejo del FAQ con el metal divalente.

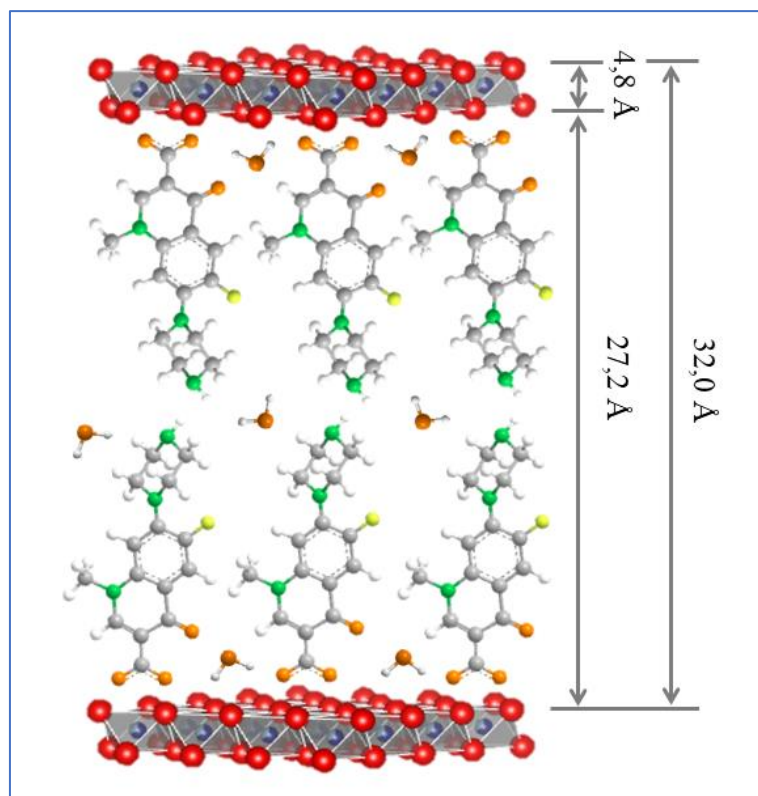


Figura 4. 2. Modelo propuesto para el arreglo de Cip^- en el espacio interlaminar de LDH de Zn y Al

4.1.1.2. FTIR

En la Figura 4.3 se presentan los espectros FTIR de LDH-Cip y de las muestras de referencia.

En el espectro FTIR de LDH-Cip (Figura 4.3.a) se identificaron las bandas de absorción características de los LDH: una banda amplia de absorción centrada en 3430 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión de los grupos OH, tanto de la lámina como del agua adsorbida e interlaminar; y, bandas en la región por debajo de los 900 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones de enlace de los metales con el oxígeno [6], similares a las observadas para las muestras de LDH intercalados con NaI. También, se presentaron bandas correspondientes a la Cip: a 1395 cm^{-1} y 1580 cm^{-1} , debidas a las vibraciones simétricas y antisimétricas del grupo carboxilato, respectivamente; a 1625 cm^{-1} , por la vibración de tensión del grupo cetona; entre 2790 y 3130 cm^{-1} debido a

modos de vibración de enlaces C-H [5], [6], [9] y a 1490 cm^{-1} por las vibraciones de tensión C-C de los anillos aromáticos [6].

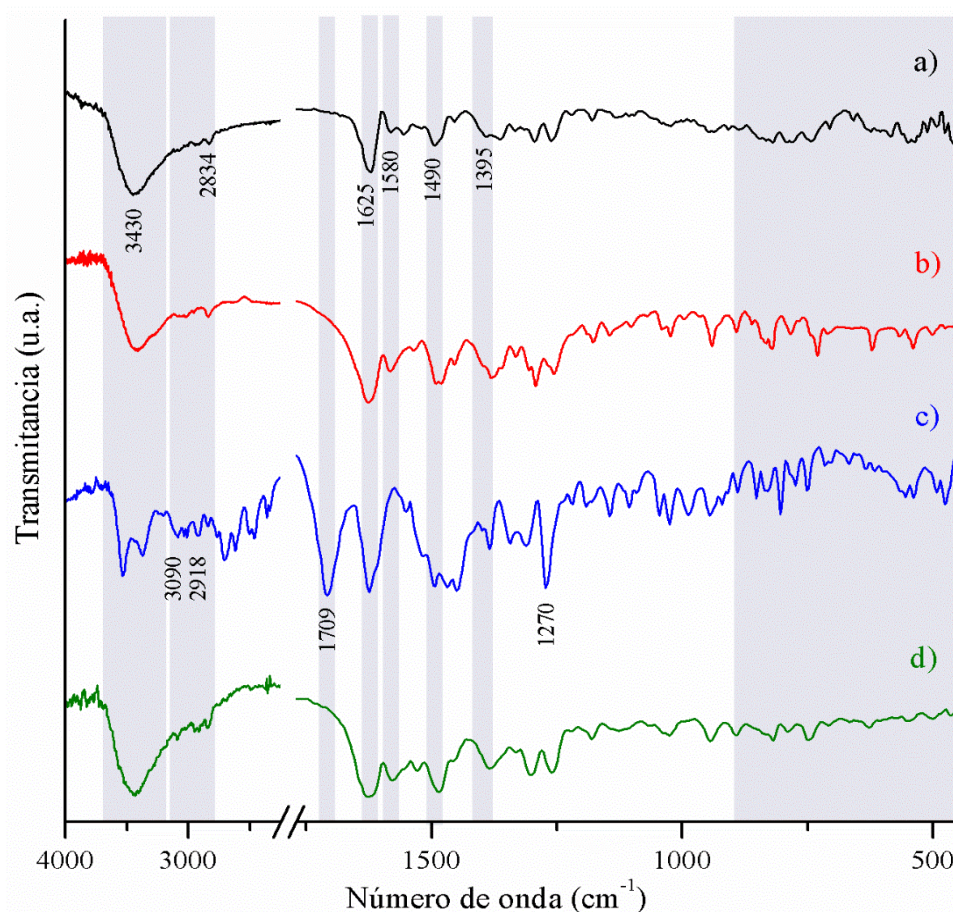


Figura 4. 3. Espectros FTIR de a) LDH-Cip, b) NaCip, c) CipHCl, d) ZnCip₂

La posición de las bandas características de la Cip, fue similar entre LDH-Cip (Figura 4.3.a) y las muestras de referencia CipNa (Figura 4.3.b) y ZnCip₂ (Figura 4.3.d). Por el contrario, no se presentaron bandas alrededor de los 1709 cm^{-1} (ν_{COOH} [6]), lo que confirmó la ausencia de la forma ácida del FAQ (Figura 4.3.c).

4.1.1.3. TGA y DTA

El estudio de las fases presentes de los SP se profundizó mediante el análisis de las curvas de TGA/DTA (Figura 4.4). Además, las pérdidas de peso en la curva de TGA

permitieron determinar la composición de las muestras, como se apreciará más adelante en la determinación de la fórmula química de los LDH-Cip.

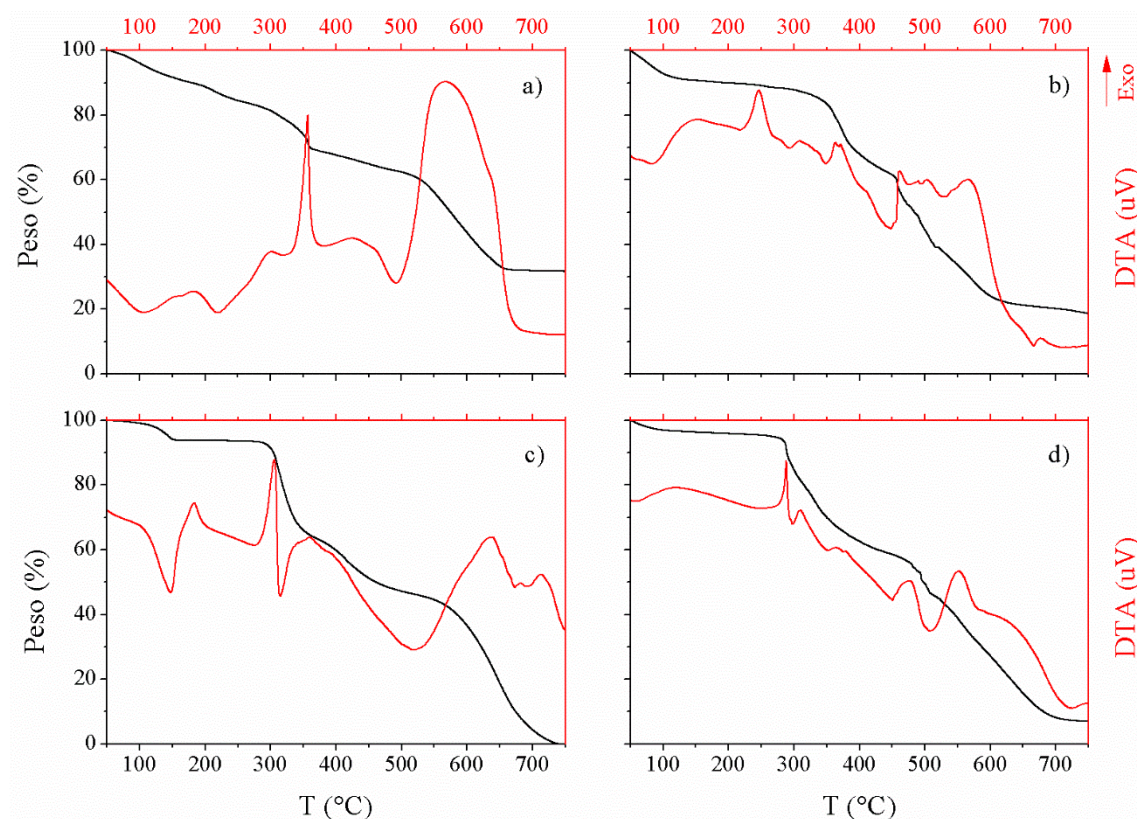


Figura 4. 4. Curvas TGA/DTA de a) LDH-Cip, b) CipNa, c) CipHCl y d) ZnCip₂

Las curvas de LDH-Cip (Figura 4.4.a) mostraron los tres procesos característicos de la descomposición térmica de los LDH (deshidratación, deshidroxilación y descomposición del anión), observados también, de forma previa, en la descomposición de LDH-Nal. La deshidratación de la muestra presentó dos eventos endotérmicos, uno centrado alrededor de los 100 °C, asociado a la remoción de agua adsorbida y otro centrado en 220 °C, correspondiente a la eliminación del agua interlaminar; mientras que, la pérdida de peso debido a la deshidroxilación y pérdida del anión (Cip intercalada) se produjo entre los 300 °C y 700 °C, donde los principales eventos registrados, ubicados alrededor de los 355 y 560 °C, fueron de carácter exotérmico. Si bien el proceso de deshidroxilación de las láminas de LDH es de carácter endotérmico [3], este proceso queda solapado con la degradación exotérmica del anión interlaminar, el cual es de

naturaleza orgánica y, consecuentemente, estos eventos térmicos están asociados a la combustión de la Cip.

La descomposición térmica de la CipHCl (Figura 4.4.c) presentó un primer evento endotérmico en el rango entre 104-140 °C debido a la deshidratación de la muestra. Luego, se presentó un evento exotérmico en el rango entre 152,8 a 184 °C lo cual es característico de una cristalización desordenada o una fase amorfa del FAQ [10]. A continuación, se observó la fusión del FAQ y su descomposición exotérmica en el rango de 285 a 315 °C atribuido al inicio de su descomposición por combustión.

Los procesos de descomposición térmica de la muestra LDH-Cip fueron diferentes a los presentados en las muestras de CipHCl, NaCip o ZnCip₂ (Figuras 4.4. b, c y d), lo que concuerda con la ausencia de estas formas del FAQ en el SP.

4.1.1.4. Análisis químico elemental y establecimiento de la fórmula química

Una vez determinada la fase presente en LDH-Cip fue posible establecer su fórmula química utilizando los datos del análisis químico elemental, junto con los datos de pérdida de peso del TGA y del contenido del anión, determinado por espectrofotometría UV-Vis. En la Tabla 4.1 se presentan los resultados del análisis elemental y la fórmula química propuesta.

Tabla 4. 1. Resultados del análisis elemental y fórmula propuesta para LDH-Cip

Resultados	Zn:Al ^a	% C ^b	% N ^b	% H ₂ O ^c	% P ₇₅₀ ^d	% Cip ^e
Experimentales	2,0	30,0	5,9	8,6	68,3	57,8
Teóricos	2,0	28,9	5,9	8,6	69,7	54,6
Fórmula	$Zn_{0,67}Al_{0,33}(OH)_{2,00}Cip_{0,33} \cdot 1,13H_2O$					

^a mol mol⁻¹ determinada por EDS

^b p p⁻¹ obtenido con el método Pregl–Dumas

^c peso residual entre 180 y 300 °C determinado por TGA (Figura 4.4)

^d peso residual a 750 °C determinado por TGA (Figura 4.4), los valores teóricos fueron calculados considerando que los únicos residuos a esta temperatura son óxidos metálicos

^e porcentaje de Cip intercalada (p p⁻¹), determinado por espectrofotometría UV-Vis en dispersiones 0,15 g L⁻¹ en HCl 0,2 M

Como se observa, existió una buena correlación entre los valores experimentales y los calculados sobre la base de la fórmula propuesta (valores teóricos), lo que indica una aproximación adecuada a la composición real de los LDH-Cip.

La relación Zn:Al de la muestra de LDH-Cip analizada fue la misma que la de la solución de partida para la síntesis del SP (2:1), lo que indicó que prácticamente todo el Zn y el Al utilizados formaron parte de las láminas de LDH; mientras que, el contenido de Cip indicó que los aniones ocuparon el 100 % de sus sitios intercambiables.

4.1.1.5. DLS, DLE y SEM

El sistema LDH-Cip presentó un ζ de $36,7 \pm 0,5$ mV, levemente inferior a los obtenidos de forma previa para LDH-Cl (41 ± 3 mV) y LDH-Nal-pHvar ($43,7 \pm 0,4$ mV).

Por otra parte, la imagen SEM del SP (Figura 4.5.a) evidenció que los LDH-Cip presentaron una morfología de tipo laminar, similar a la reportada por Rezvani y Shahbaei (2014) para LDH intercalados con Cip [6]. Algunas láminas se ubicaron de forma transversal, lo que permitió apreciar que éstas eran delgadas. Además, los LDH-Cip se mostraron agregados y con tamaño micrométrico. Estos resultados fueron concordantes con los resultados de DLS, que evidenciaron un amplio rango de distribución de tamaños (Figura 4.5.b), con un d_H promedio alrededor de $2,2 \pm 0,6$ μm y un IP de $0,8 \pm 0,2$. Este orden de tamaño fue atribuido a la agregación y aglomeración de las partículas, producto de la mayor ocupación de Cip en la superficie de las partículas de LDH, lo cual disminuyó el valor de su ζ , dando lugar a una mayor interacción entre las partículas. El proceso de deshidratación empleado para la conservación y almacenamiento de los LDH-Cip también contribuyó a la agregación [11]. Este resultado se contrasta con lo obtenido para los LDH-Nal, donde la menor incorporación de Nal en la superficie de las partículas ocasionó un mayor valor de ζ dando lugar a una mayor repulsión electrostática que provocó su menor agregación; además, los LDH-Nal se mantuvieron en dispersión.

Aunque los LDH-Cip presentaron tamaño micrométrico, este orden de tamaño no condicionó la obtención de los films, ya que, como se verá más adelante en la sección 4.1.2, se obtuvieron films con propiedades adecuadas. Por su parte, varios estudios

señalan que la velocidad de liberación del FAQ está determinada por el tamaño de partícula y que el incremento de la agregación o apilamiento de las láminas de los LDH conducen a tiempos de liberación más largos [12]–[14]. En este sentido, los LDH-Cip actuarían como un reservorio del FAQ, cuya aglomeración conllevaría a una liberación prolongada del FAQ desde el SP.

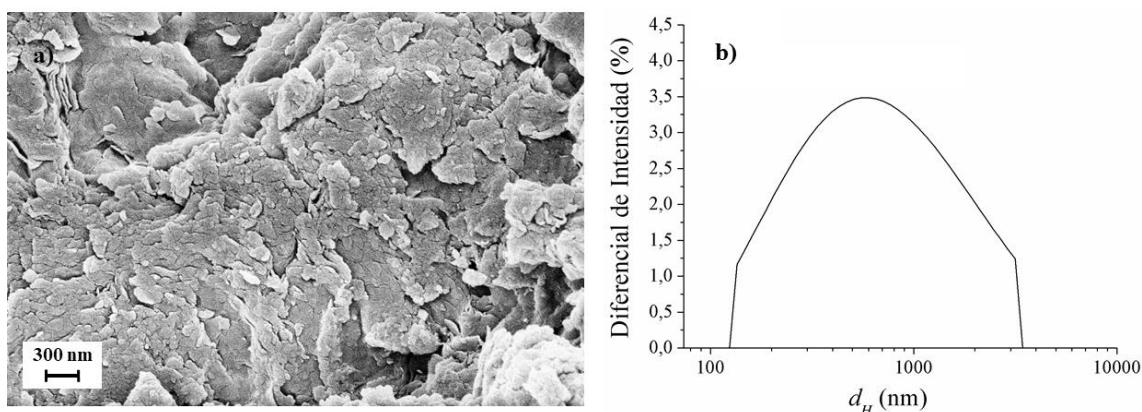


Figura 4. 5. a) Imagen SEM de LDH-Cip y b) distribución de tamaños por intensidad de los LDH-Cip

4.1.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de los films (LDH-Cip)/HS

La adecuación de LDH-Cip para una administración tópica consistió en la obtención de films a manera de apósitos, con HS como matriz polimérica y Gli como plastificante. La apariencia macroscópica del film con el SP ((LDH-Cip)/HS) y de los films de referencia (HS y Cip/HS) se presenta en la Figura 4.6. El film constituido solo por HS y Gli fue totalmente transparente (Figura 4.6.c). La adición de CipHCl a la matriz polimérica produjo un film con una leve coloración blanca (Figura 4.6.b); mientras que, la adición del SP a la matriz polimérica produjo un film opaco de color blanco (Figura 4.6.a). La inspección visual de los films indicó que su superficie fue lisa; no obstante, su análisis microscópico evidenció distintos niveles de rugosidad, como se presenta en la sección 4.1.2.4.

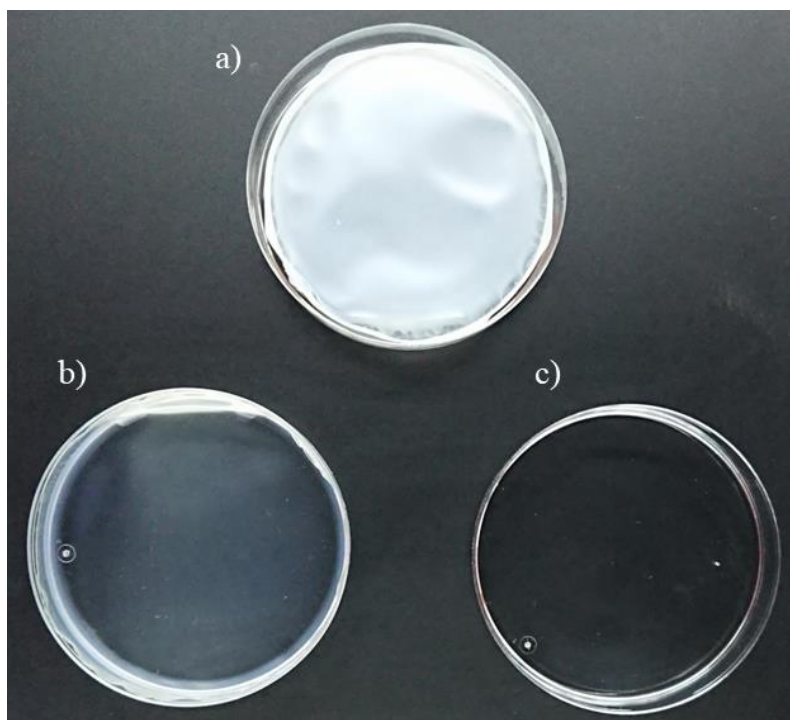


Figura 4. 6. Aspecto macroscópico de los films: a) (LDH-Cip)/HS, b) Cip/HS, c) HS

4.1.2.1. DRX

Los patrones de DRX del film (LDH-Cip)/HS y de los films de referencia se presentan en la Figura 4.7; su análisis fue utilizado para estudiar la interacción entre el sistema LDH-Cip y la matriz polimérica.

El patrón de DRX del film HS (Figura 4.7.c) presentó un solo pico amplio alrededor de los 20° (2θ), lo cual indica la ausencia de cristalinidad de esta muestra. La incorporación de CipHCl a HS (Figura 4.7.b) resultó en un patrón característico de materiales amorfos, similar al del HS pero con una pérdida de la intensidad y un mayor ensanchamiento del pico ubicado a 20° (2θ). La ausencia de reflexiones características de la fase cristalina correspondiente a la CipHCl (Figura 4.1.c) puede ser indicativo de que existió una interacción entre el FAQ y el hialuronato, la cual según trabajos previos con PE ácidos-F, es de carácter electrostático y resulta en la formación de un complejo iónico [15]–[19]. En este caso, la posible formación del complejo estaría dada por la interacción entre grupos carboxilato del HS con la amina protonada de la Cip. Por otro lado, la incorporación del sistema LDH-Cip a la matriz polimérica (Figura 4.7.a) resultó

en un patrón de DRX con picos de difracción correspondientes a la fase del sistema LDH-Cip pero con menor intensidad con respecto a los del patrón de LDH-Cip puro (Figura 4.1.a), lo cual podría atribuirse a la dilución realizada al preparar la dispersión para la obtención del film [20], pues el SP (LDH-Cip) se agregó en un 0,34 % p v⁻¹, mientras que el HS se agregó en un 2,0 % p v⁻¹, resultando en una relación de 1:6 entre estos dos componentes. Sin embargo, según Zhang et. al (2010) la interacción electrostática entre grupos carboxilato de cadenas poliméricas y la carga positiva de los LDH también podría contribuir a la disminución de la intensidad de los picos de LDH [20].

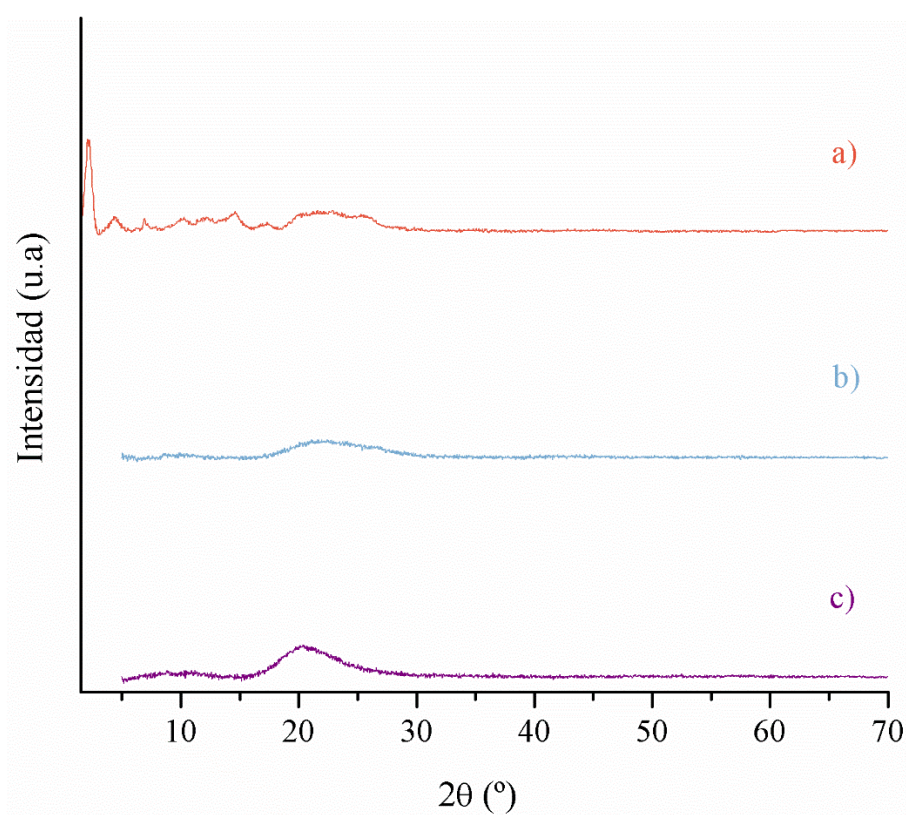


Figura 4. 7. Patrones de DRX de a) (LDH-Cip)/HS, b) Cip/HS c) HS

Debido a que el patrón de DRX de (LDH-Cip)/HS mantuvo los picos característicos del patrón de DRXP de LDH-Cip (Figura 4.1.a), se puede decir que la interacción de las cadenas poliméricas con los LDH no provocó una delaminación del SP y, consecuentemente, no se produjo un desplazamiento del FAQ durante el procedimiento realizado para la obtención del film. Así, se obtuvo un material compuesto con estructura

tradicional, o microcomposite, en el que las cadenas poliméricas recubren a los LDH [21], como se presenta en el esquema de la Figura 4.8.

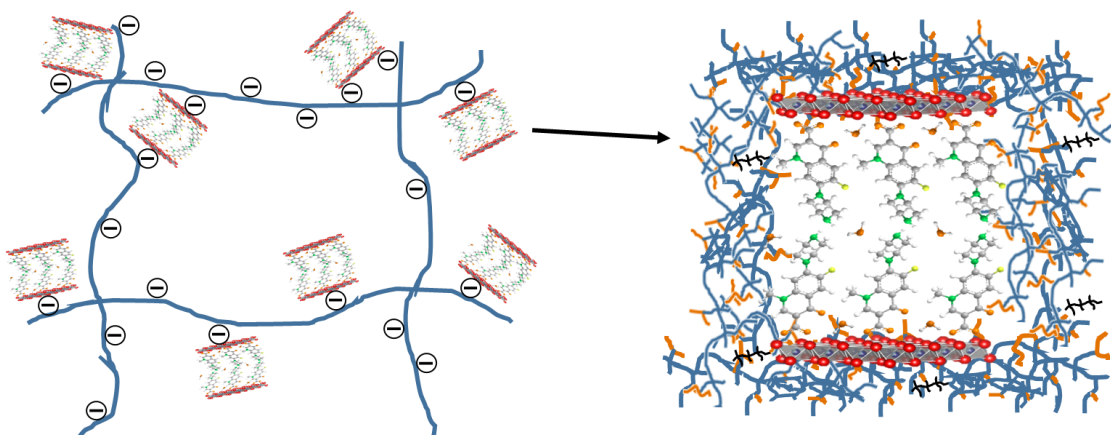


Figura 4. 8. Representación esquemática de la interacción entre los LDH-Cip y el HS

4.1.2.2. ATR-FTIR

En la Figura 4.9 se muestra el espectro ATR-FTIR del film (LDH-Cip)/HS, así como de los films de referencia.

El espectro ATR-FTIR de HS (Figura 4.9.c) presentó bandas características del hialuronato de sodio, centradas en: 3295 cm^{-1} , correspondiente a $\nu(\text{O-H})$ y $\nu(\text{N-H})$; 2898 cm^{-1} , por $\nu(\text{C-H})$; 1407 y 1610 cm^{-1} , por $\nu_s(\text{COO}^-)$ y $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, respectivamente; 1562 cm^{-1} por modos de vibración de la amida secundaria ($\nu(\text{C-N})$) acoplado a la flexión en el plano C-N-H); 1375 cm^{-1} , asignada al enlace CH; 1151 cm^{-1} por la $\nu_{as}(\text{C-O-C})$; 1028 cm^{-1} , por $\nu(\text{C-OH})$; 858 cm^{-1} , por la flexión C₁-H (anómero β) y 924 cm^{-1} por la vibración C-O-C del anillo fuera del plano [22]–[25].

En el espectro del film Cip/HS (Figura 4.9.b) se registraron bandas adicionales a las descritas anteriormente, una centrada en 1274 cm^{-1} , asignada a $\nu(\text{C-F})$ y otra, centrada en 1719 cm^{-1} (νCOOH) [26], característica de la Cip en su forma ácida. Estas bandas fueron similares a las del espectro de CipHCl de la Figura 4.3.c.

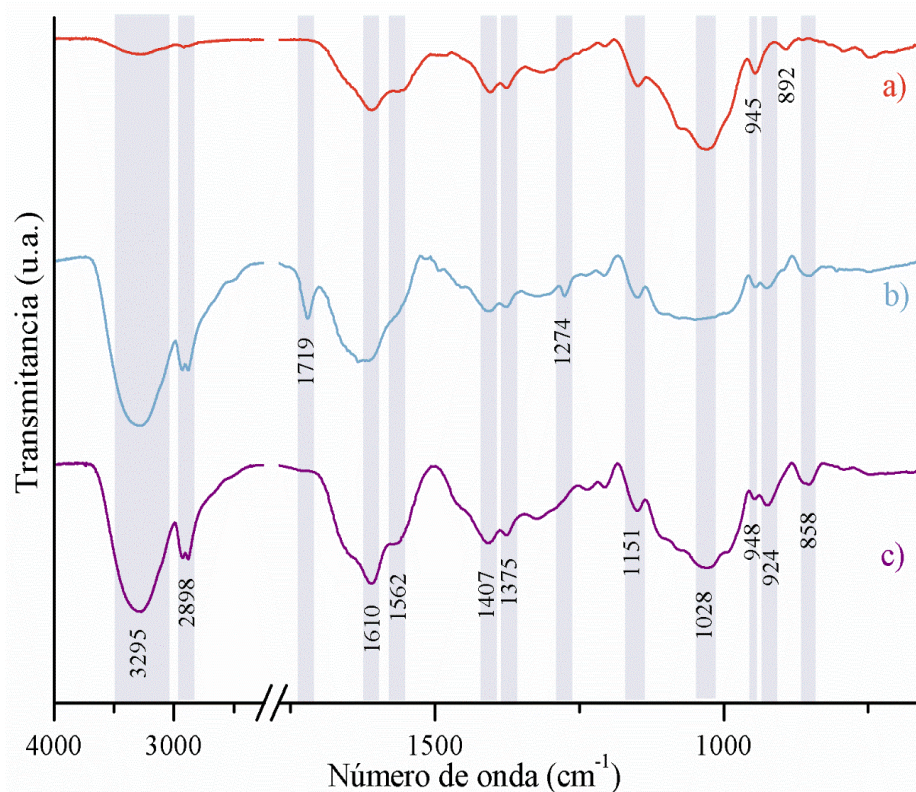


Figura 4. 9. Espectros ATR-FTIR de los films a) (LDH-Cip)/HS, b) Cip/HS c) HS

Por otro lado, la incorporación de LDH-Cip en HS (Figura 4.9.a) produjo el desplazamiento de las bandas ubicadas a 858 y 924 cm^{-1} en el espectro del HS hacia 892 y 945 cm^{-1} , respectivamente, y la ausencia de la banda centrada en 948 cm^{-1} en el film HS. Estas diferencias probablemente se deban a una fuerte interacción entre el hialuronato y las láminas de los LDH, lo cual concuerda con los resultados de DRX. Además, como se esperaba, no se presentaron bandas alrededor de los 1719 cm^{-1} correspondientes a la Cip protonada, lo que indica su ausencia en el film (LDH-Cip)/HS.

4.1.2.3. TGA y DTA

En la Figura 4.10 se presentan las curvas de TGA/DTA del film (LDH-Cip)/HS y de los films de referencia.

La descomposición térmica del film HS inició con un evento endotérmico registrado hasta aproximadamente 170 $^{\circ}\text{C}$, asignado a la deshidratación del film. Las

pérdidas de peso a temperaturas superiores correspondieron a la descomposición de material polimérico, cuyo remanente a 1000 °C (% P₁₀₀₀) fue del 3,8 %. En cuanto al film Cip/HS, se presentó una pérdida de peso adicional entre 545 y 620 °C, de carácter exotérmico, la cual fue relacionada con los últimos eventos exotérmicos de la combustión del FAQ (Figura 4.4.c). Por otra parte, el inicio de la degradación térmica del film (LDH-Cip)/HS (Figura 4.10) se produjo a una temperatura superior a la de los films de referencia, lo que indica que la adición del SP incrementó la estabilidad térmica del material compuesto. El mayor % P₁₀₀₀ de (LDH-Cip)/HS (9,7 %), con respecto al de Cip/HS (1,6 %) estuvo asociado a la formación de óxidos metálicos, producto de la descomposición térmica de los LDH.

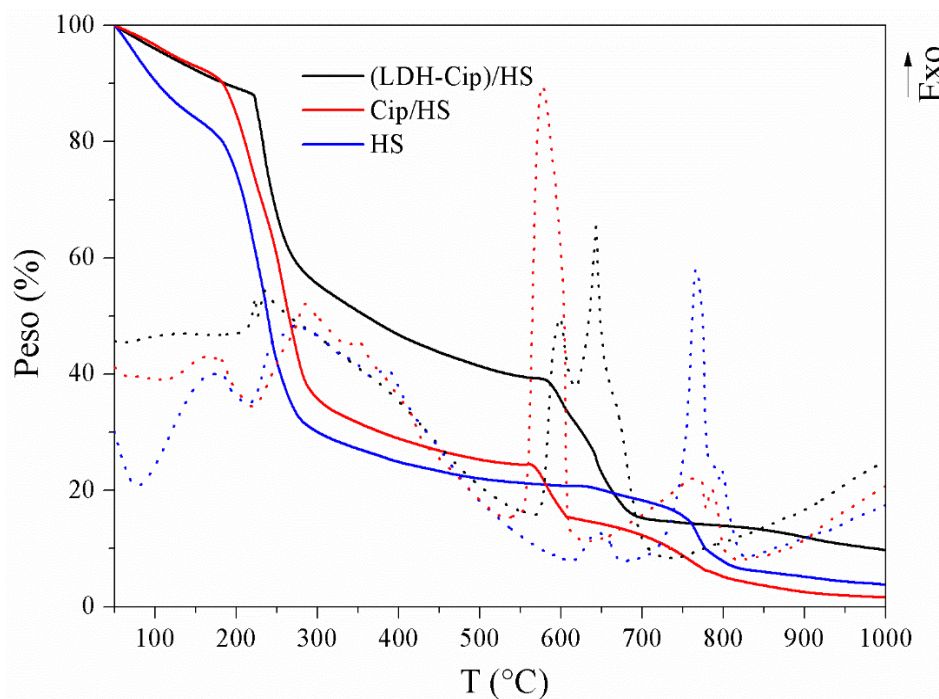


Figura 4. 10. Curvas de TGA (líneas continuas) y DTA (líneas entrecortadas) de los films (LDH-Cip)/HS, Cip/HS y HS

4.1.2.4. DLE y MC

Para estudiar la interacción entre los LDH y la matriz polimérica, se determinó el ζ sobre la dispersión realizada para obtener el film (LDH-Cip)/HS. La adsorción del HS sobre los LDH-Cip produjo un apantallamiento de la carga positiva de los LDH-Cip,

obteniéndose un ζ de -34 ± 2 mV. Esto indicó que el hialuronato, tiene la capacidad de adsorberse fuertemente en los LDH, como ocurre en general con los PE aniónicos sobre la superficie de estos sólidos [27].

Puesto que, la obtención de los films se realizó por el método de *casting*, en el cual, un lado de la superficie del film se encontró en contacto con la placa de Petri, en la Figura 4.11 se presentan las imágenes de MC de ambos lados de los films HS, Cip/HS y (LDH-Cip)/HS. Como se esperaba, las superficies en contacto con la placa de Petri (Figura 4.11. a, c y e) se presentaron más uniformes, lisas y con menos imperfecciones en comparación con la superficie opuesta respectiva (Figura 4.11. b, d y f). Entre las superficies que no estuvieron en contacto con la placa de Petri, el film HS presentó una superficie lisa y uniforme, y al ser transparente, se tuvieron que registrar las imperfecciones para notar su presencia en las imágenes de MC. El film Cip/HS mostró una mayor rugosidad, pero se aprecia una distribución uniforme de los componentes en el film. Por último, en las imágenes de (LDH-Cip)/HS se observaron aglomerados y agregados de LDH-Cip recubiertos por la matriz polimérica, lo cual es típico de materiales compuestos como los representados en la Figura 4.8.

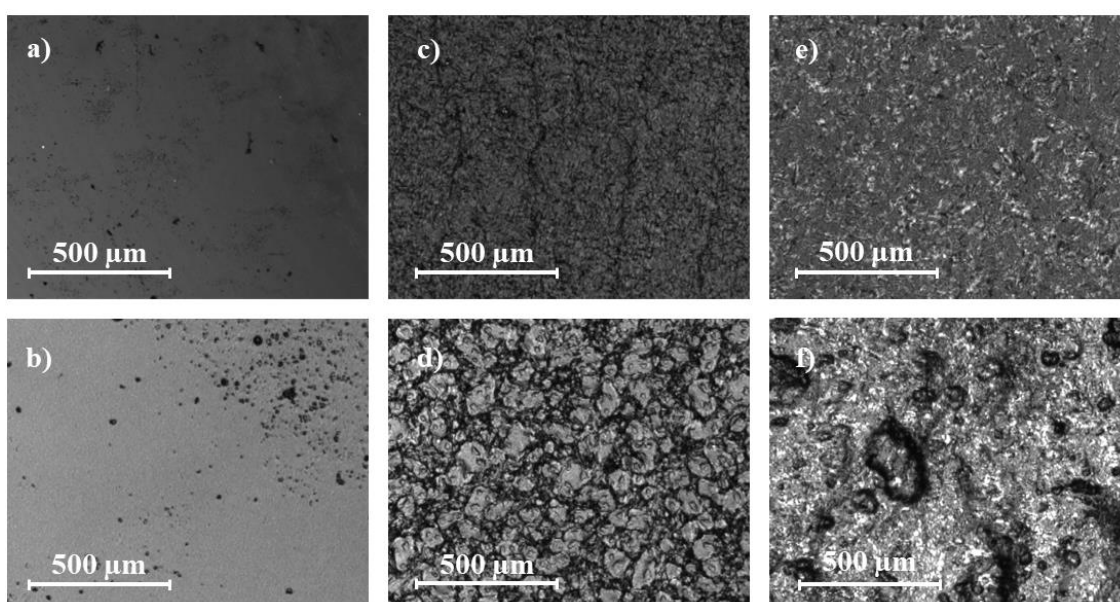


Figura 4. 11. Imágenes de MC de los films: a) y b) HS, c) y d) Cip/HS, e) y f) (LDH-Cip)/HS. Las imágenes a), c) y e) corresponden a las superficies de los films en contacto con la caja Petri; mientras que, las imágenes b), d) y f) corresponden a las superficies de los films sin contacto con la caja Petri

Las características de la superficie de los films pueden influir en sus propiedades de hinchamiento y, en consecuencia, impactar en las propiedades de liberación del F [28]. La rugosidad en la superficie de los films (Figura 4.11. b, d y f) aumenta la superficie de contacto entre el sistema y la zona de aplicación. Esto puede favorecer la captura de fluidos, lo cual sería relevante al considerar la presencia de exudados plasmáticos en condiciones de piel lesionada [29]. En virtud de lo expuesto, se seleccionó la cara rugosa de los films para llevar a cabo los estudios de liberación del FAQ y de sensibilidad antimicrobiana.

4.1.3. Caracterización biofarmacéutica de los films (LDH-Cip)/HS

La uniformidad de unidades de dosificación, propiedades de hinchamiento y estudios de liberación *in vitro* forman parte de la caracterización biofarmacéutica de los films.

4.1.3.1. *Uniformidad de unidades de dosificación: uniformidad de peso y contenido*

Puesto que la uniformidad de unidades de dosificación para una forma farmacéutica para administración tópica no está codificada en la Farmacopea Argentina, los requerimientos de calidad de los films desarrollados a manera de apósito se establecieron de acuerdo con el análisis del coeficiente de variación (% Cv), tal como se ha reportado previamente para films poliméricos conteniendo Cip [28]. Cabe destacar que, si bien los autores consideraron como aceptables % Cv < 5 %, los criterios de aceptabilidad suelen ser más amplios y, por ejemplo, para la validación de métodos bioanalíticos se aceptan % Cv < 15 % [30].

Así, dado que el presente es un estudio preliminar del diseño de una formulación farmacéutica, para evaluar la uniformidad de peso y contenido de Cip en los films, se definió que, las unidades de dosificación evaluadas para cada film debían presentar un % Cv inferior al 15 %, lo que daría cuenta de un adecuado procedimiento de obtención y una distribución homogénea del FAQ en toda la extensión del film, respectivamente.

Los resultados de uniformidad de peso ($n = 20$) y contenido de Cip ($n = 3$) correspondientes a secciones circulares de 6 mm de diámetro de film se presentan en la Tabla 4.2. Cabe destacar que se decidió trabajar con discos de 6 mm de diámetro ya que esta es la medida que presentan los sensi-discos clínicamente utilizados en los bioensayos de sensibilidad antimicrobiana.

Tabla 4. 2. Peso de secciones circulares de 6 mm de diámetro de film ($n = 20$) y contenido de Cip en dicha sección ($n = 3$)

Parámetro	Film		
	(LDH-Cip)/HS	Cip/HS	HS
Peso (mg)	$4,1 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,5$
Contenido de Cip (mg)	$0,33 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,04$	-

El % Cv para la uniformidad de peso en los films (LDH-Cip)/HS, Cip/HS y HS fue de 7,3, 6,6 y 6,8 %, respectivamente. En el caso de la uniformidad de contenido los valores del % Cv fueron 6,1 y 10,8 % para los films (LDH-Cip)/HS y Cip/HS, respectivamente. La baja dispersión de los resultados ($\% Cv < 15 \%$) demostró que el procedimiento de obtención utilizado en este diseño preliminar fue adecuado y que hubo una distribución homogénea del FAQ en toda la extensión del film, por lo que se pueden asegurar dosis uniformes de Cip al utilizar diferentes secciones circulares de 6 mm de los films.

4.1.3.2. Hinchamiento

En la Figura 4.12 se muestran los perfiles de hinchamiento de secciones circulares de film de 6 mm de diámetro tanto de (LDH-Cip)/HS como de Cip/HS, determinados por el incremento del diámetro de los films en contacto con un medio acuoso (PBS5,8 o PBS7,4).

En el medio PBS5,8, los perfiles de hinchamiento para ambos films se mostraron diferentes, alcanzándose un hinchamiento de $227 \pm 7 \%$ para el film (LDH-Cip)/HS y de $103,5 \pm 0,9 \%$ para Cip/HS. Esta diferencia de comportamiento se asignó a la inestabilidad

de los LDH en medio ácido [31], que pudo provocar la disolución de la matriz portadora. Al ser este un proceso superficial, pudo producirse una disminución del tamaño de partícula de los LDH incorporados en el film, generando espacios que podían ser ocupados por el medio acuoso, facilitando la hidratación del material polimérico y, consecuentemente, la expansión del film. Según Ravivarapu, et. al. 2006, la interacción iónica entre el F y la matriz polimérica es un factor importante a considerar. Por ejemplo, cuando un F básico interacciona con una cadena polimérica biodegradable, se forman matrices más rígidas y menos hidrofílicas; mientras que, la interacción entre F ácidos y neutros da lugar a una interacción iónica más débil que resulta en la precipitación de los F [32]. De acuerdo con el diagrama de distribución de especies presentado en la Figura 1.4, en estas condiciones de pH, alrededor del 50 % de las moléculas de Cip se encontraban como $CipH_2^+$, lo que favoreció su interacción con la carga negativa del PE en el film Cip/HS. Esto pudo dar lugar a una mayor interacción con el polímero y, por tanto, una disminución del hinchamiento, comparado con el perfil a pH 7,4.

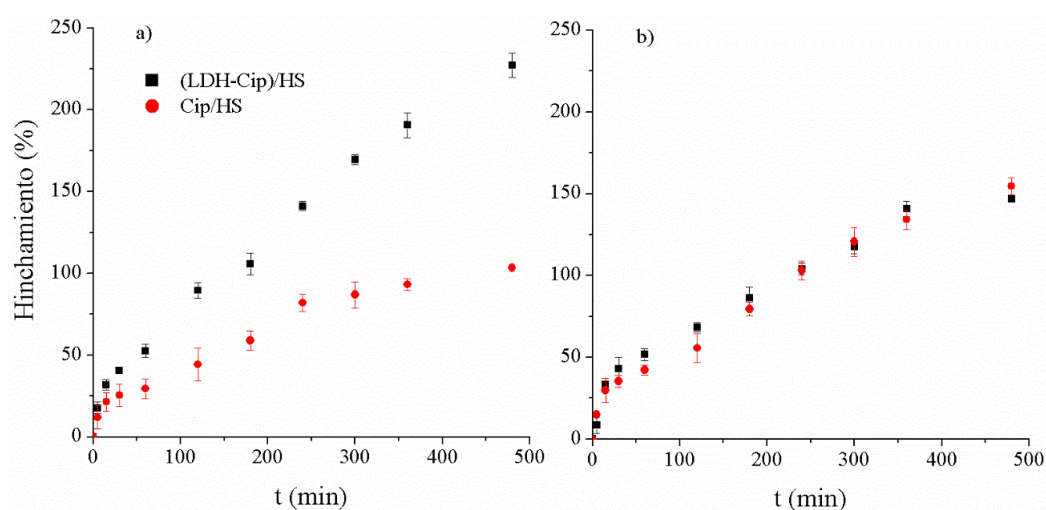


Figura 4. 12. Porcentaje de hinchamiento de secciones circulares de 6 mm de diámetro de los films (LDH-Cip)/HS y Cip/HS en contacto con los medios: a) PBS5,8 y b) PBS7,4

Por otro lado, en PBS7,4 no se presentaron diferencias entre el perfil de (LDH-Cip)/HS y Cip/HS. Para ambos films, se observaron porcentajes de hinchamiento de aproximadamente 150 %, luego de 8 h de estudio. Esto se debe a que (LDH-Cip)/HS se encuentra en un medio a pH neutro y, consecuentemente, las láminas de LDH permanecen intactas, por lo que el hinchamiento fue menor, comparado con el perfil a pH 5,8. Además, en un pH de 7,4, las moléculas de Cip se encontraban prácticamente en su

totalidad como $CipH^{\pm}$, por lo que su interacción fue menor con el PE, en comparación con las especies de Cip en pH 5,8.

A pesar de que no se muestra un perfil de hinchamiento para el film HS, debido a que se presentó totalmente transparente y, consecuentemente, se dificultó su medición, el hinchamiento de los films observado en los ensayos microbiológicos (sección 4.1.4) permite inferir que, en pH cercanos a la neutralidad, la matriz polimérica presenta un menor hinchamiento en comparación con los films (LDH-Cip)/HS y Cip/HS. Estos resultados concuerdan con la mayor rugosidad de estos films en comparación con el film HS, lo que les permitió tener una mayor superficie de contacto para adsorber fluidos y consecuentemente facilitar su hinchamiento [29].

4.1.3.3. *Estudios de liberación in vitro del FAQ*

La liberación de Cip desde el film (LDH-Cip)/HS se estudió para evaluar las propiedades del SP para modular la liberación del FAQ y determinar el mecanismo y velocidad de liberación en medios biorrelevantes para la vía de administración tópica (Figura 4.13). El ajuste de los datos de liberación con modelos cinéticos representativos (orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas) permitió establecer el paso determinante de la liberación del FAQ y el mecanismo de liberación involucrado (Tabla 4.3). Los perfiles cinéticos teóricos obtenidos con los mejores ajustes para cada muestra y en cada medio de liberación (marcados con un asterisco en la Tabla 4.3) fueron incluidos en la Figura 4.13 para dar una guía e indicación de la calidad del ajuste con dichos modelos. En todos los casos, se realizó una evaluación comparativa contra el film Cip/HS como referencia.

El film de referencia Cip/HS, en PBS5,8, presentó un porcentaje de liberación acumulativa de Cip a 480 min, (%Cip₄₈₀) de 68 ± 6 % y el mejor ajuste se obtuvo con el modelo de Korsmeyer-Peppas con un $n = 0,69$, que indicó un mecanismo de liberación anómalo. Esto es debido a que varios procesos afectaron la liberación del FAQ, como intercambio iónico entre el PE-FAQ y los iones el medio, reacciones superficiales de disolución del FAQ e hinchamiento de la matriz polimérica con la consecuente relajación de las cadenas del polímero. Estudios previos referidos a liberación de Cip desde films poliméricos demostraron que el hinchamiento del film puede ser un factor determinante

para la liberación del FAQ y los perfiles en PBS 5,8 se ajustaron a un mecanismo no-fickiano o anómalo [28], similar al comportamiento observado para los films Cip/HS.

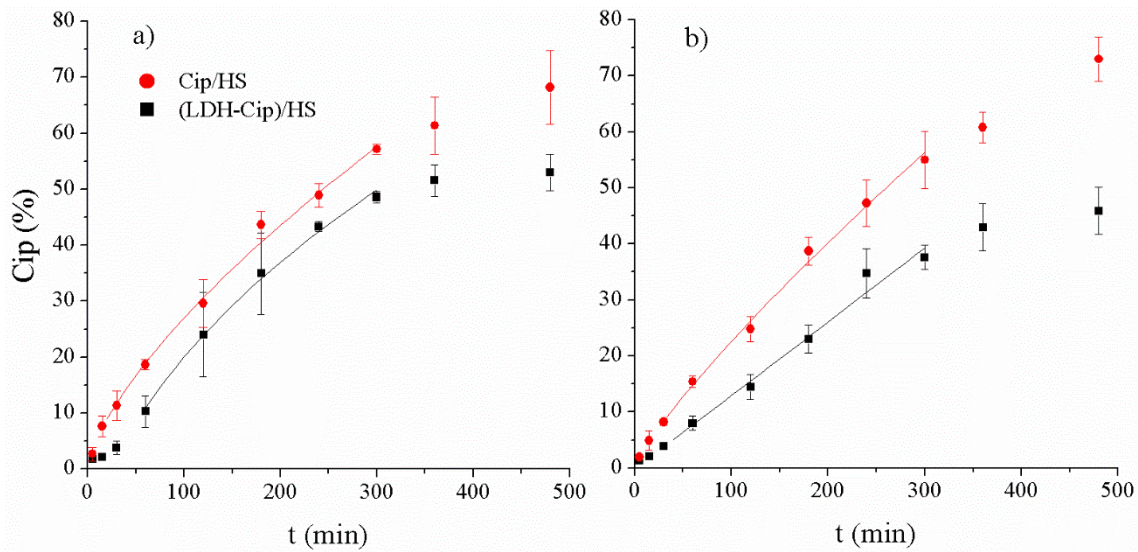


Figura 4. 13. Perfiles de liberación *in vitro* de Cip, a partir de secciones circulares de 6 mm de diámetro de los films Cip/HS y (LDH-Cip)/HS colocados en el compartimento donante y liberado hacia a) PBS5,8 y b) PBS7,4. Las líneas continuas representan los perfiles teóricos determinados con los modelos que presentaron el mejor ajuste para cada condición

Tabla 4. 3. Datos cinéticos obtenidos por el modelado de los perfiles de liberación de Cip con modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeier-Peppas. Los mejores ajustes con base en el R^2 están marcados con un asterisco

Modelo cinético		Orden cero			Higuchi			Korsmeier-Peppas		
Medio receptor	Muestra	%Cip ₀	k _C	R ²	%Cip ₀	k _H	R ²	-log(k _P)	n	R ²
PBS5,8	Cip/HS	7,26	0,1757	0,982	-9,03	3,770	0,992	-0,056*	0,69*	0,997*
	(LDH-Cip)/HS	3,45	0,1598	0,971	-20,68*	4,074*	0,996*	0,694	0,98	0,981
PBS7,4	Cip/HS	4,37	0,1754	0,991	-15,674	4,025	0,990	0,308*	0,83*	0,997*
	(LDH-Cip)/HS	-0,32	0,1326	0,976	-19,597	3,323	0,967	0,913*	1,01*	0,989*

k_C está expresado como (% min⁻¹) y k_H como (% min^{-0,5})

En PBS7,4, el %Cip₄₈₀ desde Cip/HS fue de alrededor de 73 ± 4 % y se mantuvo el modelo cinético y el tipo de transporte del FAQ (anómalo) con un n igual a 0,83. Aunque considerando su mayor cercanía a un $n = 1$, podría esperarse un mayor condicionamiento de la liberación por procesos superficiales, como la disolución del FAQ, el cual, en esta condición de pH presenta menor solubilidad [33]. No obstante, el hinchamiento de los films sigue siendo el principal proceso involucrado en la liberación del FAQ [28]. Estos resultados se condicen con el comportamiento de liberación de compuestos de baja solubilidad a partir de matrices hidrofílicas, cuya cinética de liberación se ajusta a un modelo de orden cero [34].

La liberación del FAQ desde el film (LDH-Cip)/HS fue similar a la del film Cip/HS hacia PBS5,8. Esto se evidenció mediante el análisis estadístico comparativo de los perfiles de liberación en este medio, siendo $f^2 = 55$. Por otra parte, la liberación de Cip desde el film (LDH-Cip)/HS presentó una mayor modulación hacia PBS7,4 comparado con el film de referencia ($f^2 = 43$). Esto puede explicarse por la presencia del SP y su estabilidad en este pH. Así, se debe considerar que la Cip⁻ primero debe liberarse del LDH por medio del intercambio con los aniones presentes en la solución tampón; por lo que, los LDH-Cip actuarían como un reservorio del FAQ que permite una liberación más lenta y prolongada.

Para el film de (LDH-Cip)/HS el mecanismo de liberación de Cip fue diferente para cada medio de liberación. En PBS5,8 el %Cip₄₈₀ liberado fue de 53 ± 3 % y el mejor ajuste se obtuvo con el modelo de Higuchi, lo que indicaría que el paso determinante para la liberación del FAQ fue la difusión. Estos resultados son similares a los obtenidos para la fase pura de los LDH-Nal, donde el mecanismo de liberación fue por intercambio aniónico. La solubilidad de la Cip no fue determinante en este medio, ya que aproximadamente la mitad de las moléculas se encontraban en una forma soluble (CipH₂⁺) [33].

Por otro lado, en PBS7,4 el %Cip₄₈₀ desde (LDH-Cip)/HS fue de 46 ± 4 % y el mejor ajuste se obtuvo para el modelo de Korsmeyer-Peppas con un $n \sim 1$. El perfil de liberación se ajustó entonces a una cinética de orden cero, lo que se refuerza por el buen ajuste obtenido para el modelo de orden cero. Esto indicó que la liberación en este medio está determinada por una reacción superficial, en este caso la disolución del FAQ desde

la superficie del LDH luego de su salida de la interlámina, puesto que en este pH prácticamente la totalidad del FAQ se encuentra como $CipH^{\pm}$ [33]. Además, estos resultados concuerdan con el comportamiento de liberación de compuestos de baja solubilidad desde matrices hidrofílicas [34], como se ha reportado para la liberación de Cip a partir de una matriz de colágeno y ácido hialurónico en períodos de tiempo inferiores a las 24 h [35]. Este resultado contrasta con el régimen difusional obtenido para los LDH-Nal, lo que se explica por la mayor solubilidad del Nal^{-} en este medio [36], por lo que, el paso determinante para la liberación fue el intercambio aniónico.

La mayor modulación de la liberación de Cip en un medio como PBS7,4, que simula condiciones de piel lesionada, indica que formulaciones de films basadas en este SP permitirían una acción del FAQ más sostenida en el tiempo, reduciendo así la frecuencia de administración.

Es notable mencionar que, los espectros de absorción del FAQ liberado fueron similares al espectro del FAQ puro registrado para las curvas de calibración; es decir, no se presentaron cambios en el espectro de absorción del FAQ asociados a la fotodegradación [37]–[39]. Esto permite inferir que no existieron cambios estructurales en el FAQ luego de su interacción con las láminas del LDH para la obtención del SP y que los procedimientos realizados tanto para la obtención del SP LDH-Cip, así como del film (LDH-Cip)/HS fueron adecuados, pues no se presentó degradación del FAQ. Dado que la actividad antibacteriana responde a la integridad estructural del FAQ [40]–[42], el sistema preservó su actividad, lo cual se verificó posteriormente con los resultados del ensayo de sensibilidad antimicrobiana.

4.1.4. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Los ensayos de sensibilidad antimicrobiana de los films se realizaron frente a *S. aureus*, microorganismo oportunista frente al cual la Cip presenta actividad [43]. En la Figura 4.14 se muestran los halos de inhibición obtenidos para secciones circulares de 6 mm de diámetro de los films.

El diámetro total del halo para el film HS fue de 12 ± 1 mm. Si bien al observar la Figura 4.14 parecería que HS presentó un halo de inhibición de crecimiento bacteriano, se debe considerar el hinchamiento del film, el cual fue de 4 ± 1 mm. Por lo tanto, el halo de inhibición real fue 8 ± 1 mm de diámetro, lo cual, de acuerdo a los criterios de interpretación del CLSI [44], indicó que la cepa bacteriana utilizada es resistente a HS.

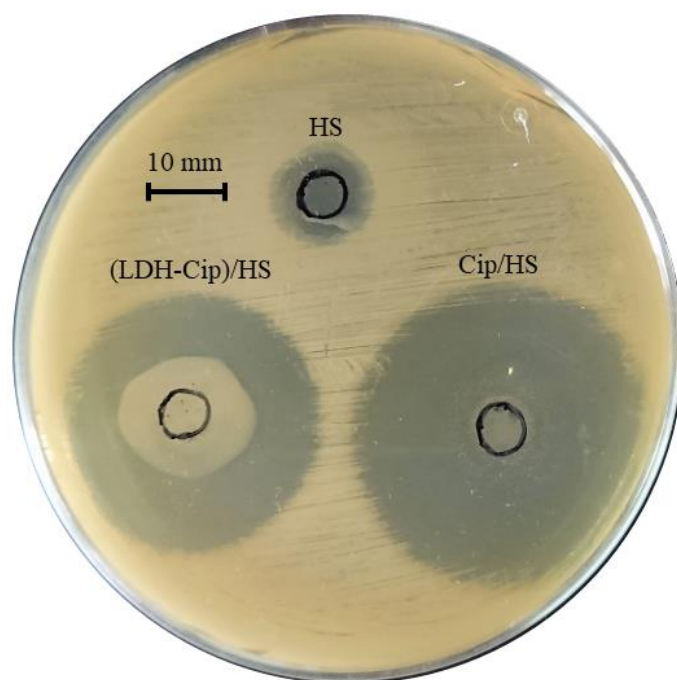


Figura 4. 14. Halos de inhibición de las secciones circulares de los films: HS, (LDH-Cip)/HS y (Cip)/HS con 6 mm de diámetro inicial frente a *S. aureus* en AMH

Por otro lado, el diámetro total del halo para Cip/HS fue de 38 ± 1 mm y para (LDH-Cip)/HS de 33 ± 1 mm. Ambos films presentaron un hinchamiento de 11 ± 1 mm de diámetro, lo cual estuvo acorde con la similitud de los perfiles de hinchamiento para ambas muestras en un pH neutro. Consecuentemente, el halo de inhibición resultante fue de 27 ± 1 mm para Cip/HS y 22 ± 1 mm para (LDH-Cip)/HS. Se puede notar que (LDH-Cip)/HS presentó un diámetro de inhibición menor al del film Cip/HS. Estos resultados se corresponden con los resultados de liberación del FAQ pues el film (LDH-Cip)/HS presentó una mayor modulación de la liberación de Cip en comparación con el film Cip/HS, lo cual fue atribuido a la presencia del SP, en este caso, los LDH intercalados con Cip. Resultados similares fueron obtenidos para SP poliméricos con Cip vehiculizada, donde la modulación de la liberación de Cip generó halos de inhibición menores [15], [28].

Es notable remarcar que, a pesar de la mayor modulación de la liberación del FAQ, el film (LDH-Cip)/HS presentó un diámetro del halo de inhibición mayor a 20 mm, por lo que, de acuerdo con los criterios de interpretación del CLSI [44], la cepa bacteriana utilizada de *S. aureus* mostró una sensibilidad con relevancia clínica tanto frente al film Cip/HS como frente al film (LDH-Cip)/HS.

4.2. Conclusiones parciales

Se sintetizaron LDH intercalados con aniones de Cip y no se presentaron complejos metálicos del FAQ. Los LDH-Cip presentaron alta cristalinidad, una total ocupación de los sitios de intercambio aniónico por el FAQ, tanto del seno como de la superficie, y una expansión del espaciado interlamilar debido a la intercalación del anión en un arreglo en bicapa. Los LDH-Cip exhibieron una morfología laminar irregular, similar a la obtenida para LDH-Nal pero con una mayor agregación debido a la mayor presencia del FAQ en la superficie y a la deshidratación de los LDH-Cip para su conservación.

Además, se llevó a cabo un diseño preliminar de una formulación farmacéutica bajo la forma de film a manera de apósito, con base en este SP, al incorporar los LDH-Cip en una matriz polimérica de HS para su adecuación a una vía de administración tópica. La metodología de obtención del film conteniendo el SP fue adecuada, reproducible y presentó una distribución homogénea del FAQ a lo largo de toda la superficie del film, lo cual aseguró la uniformidad de las unidades de dosificación.

La liberación de Cip desde el film (LDH-Cip)/HS fue dependiente del pH del medio receptor. En el medio que simula las condiciones fisiológicas de la piel intacta (pH 5,8) la liberación estuvo condicionada por el intercambio aniónico; mientras que, en el medio que simula el exudado plasmático (pH 7,4), la liberación fue modulada y el mecanismo de liberación fue determinado por reacciones superficiales de la disolución del FAQ.

El film (LDH-Cip)/HS presentó actividad antimicrobiana con relevancia clínica frente a *S. aureus*, lo que lo hace adecuado para su aplicación tópica tanto para la profilaxis como para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel.

4.3. Referencias bibliográficas

- [1] R. Rojas Delgado, C. P. De Pauli, C. B. Carrasco, and M. J. Avena, "Influence of MII/MIII ratio in surface-charging behavior of Zn-Al layered double hydroxides," *Appl. Clay Sci.*, vol. 40, no. 1–4, pp. 27–37, 2008.
- [2] Z. Rezvani and M. Shahbaei, "Bionanocomposites based on Alginate and Chitosan/Layered Double Hydroxide with Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties," *Polym. Compos.*, vol. 36, no. 10, pp. 1819–1825, 2014.
- [3] V. Rives, *Layered double hydroxides: present and future*. New York: Nova Science Publishers, 2001.
- [4] M. Sillion, M. I. Popa, G. Lisa, and D. Hritcu, "New Hybrid Compounds Containing Intercalated Ciprofloxacin Into Layered Double Hydroxides: Synthesis and characterization," *Rev. Roum. Chim.*, vol. 53, no. 9, pp. 827–831, 2008.
- [5] G. Mishra, B. Dash, D. Sethi, S. Pandey, and B. K. Mishra, "Orientation of Organic Anions in Zn-Al Layered Double Hydroxides with Enhanced Antibacterial Property," *Environ. Eng. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 516–527, 2017.
- [6] Z. Rezvani and M. Shahbaei, "Bionanocomposites Based on Alginate and Chitosan/Layered Double Hydroxide with Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties," *Polym. Polym. Compos.*, pp. 1–7, 2014.
- [7] W. T. Jiang, C. J. Wang, and Z. Li, "Intercalation of ciprofloxacin accompanied by dehydration in rectorite," *Appl. Clay Sci.*, vol. 74, pp. 74–80, 2013.

- [8] A. F. Abdul Latip, M. Z. Hussein, J. Stanslas, C. C. Wong, and R. Adnan, "Release behavior and toxicity profiles towards A549 cell lines of ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide intercalation compound," *Chem. Cent. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [9] Z. Dong, Q. Wang, and Y. Du, "Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release," *J. Memb. Sci.*, vol. 280, no. 1–2, pp. 37–44, 2006.
- [10] A. A. Silva-Júnior, M. V. Scarpa, K. C. Pestana, L. P. Mercuri, J. R. de Matos, and A. G. de Oliveira, "Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique," *Thermochim. Acta*, vol. 467, no. 1–2, pp. 91–98, 2008.
- [11] M. Trikeriotis and D. F. Ghanotakis, "Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides," *Int. J. Pharm.*, vol. 332, no. 1–2, pp. 176–184, 2007.
- [12] P. Gunawan and R. Xu, "Direct Control of Drug Release Behavior from Layered Double Hydroxides through Particle Interactions," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 10, pp. 4367–4378, 2008.
- [13] X. Q. Zhang, M. G. Zeng, S. P. Li, and X. D. Li, "Methotrexate intercalated layered double hydroxides with different particle sizes: Structural study and Controlled release properties," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 117, pp. 98–106, 2014.
- [14] R. Rojas, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 463, pp. 37–43, 2014.
- [15] M. C. García *et al.*, "A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 236–246, 2016.
- [16] J. M. Bermúdez, A. F. Jimenez-Kairuz, M. E. Olivera, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo, "A Ciprofloxacin Extended Release Tablet Based on Swellable Drug Polyelectrolyte Matrices," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 3, pp. 924–930, 2008.

- [17] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 367, no. 1, pp. 518–526, 2012.
- [18] F. D. Battistini, J. Flores-Martin, M. E. Olivera, S. Genti-Raimondi, and R. H. Manzo, "Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2014.
- [19] F. D. Battistini, M. E. Olivera, and R. H. Manzo, "Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 588–594, 2013.
- [20] J. P. Zhang, Q. Wang, X. L. Xie, X. Li, and A. Q. Wang, "Preparation and swelling properties of pH-sensitive sodium alginate/layered double hydroxides hybrid beads for controlled release of diclofenac sodium," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 92, no. 1, pp. 205–214, 2010.
- [21] J. I. Velasco, M. Ardanuy, and M. Antunes, *Layered double hydroxides (LDHs) as functional fillers in polymer nanocomposites*. Woodhead Publishing Limited, 2012.
- [22] G. Ma, Z. Wang, J. Chen, R. Yin, B. Chen, and J. Nie, "Freeze-dried chitosan-sodium hyaluronate polyelectrolyte complex fibers as tissue engineering scaffolds," *New J. Chem.*, vol. 38, no. 3, pp. 1211–1217, 2014.
- [23] M. Safaei and M. Taran, "Optimal conditions for producing bactericidal sodium hyaluronate-TiO₂nanocomposite and its characterization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 449–456, 2017.
- [24] R. Gilli, M. Kacuráková, M. Mathlouthi, L. Navarini, and S. Paoletti, "FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution.," *Carbohydr. Res.*, vol. 263, pp. 315–326, 1994.
- [25] B. Stuart, *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, UK: Wiley, 2005.

- [26] Z. Rezvani and M. Shahbaei, "Bionanocomposites based on Alginate and Chitosan/Layered Double Hydroxide with Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties," *Polym. Compos.*, vol. 36, no. 10, pp. 1819–1825, 2014.
- [27] C. Vasti, A. Borgiallo, C. E. Giacomelli, and R. Rojas, "Layered double hydroxide nanoparticles customization by polyelectrolyte adsorption: mechanism and effect on particle aggregation," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 533, no. June, pp. 316–322, 2017.
- [28] M. C. García *et al.*, "Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 175, pp. 75–86, 2017.
- [29] A. Nussinovitch, A. Gal, C. Padula, and P. Santi, "Physical characterization of a new skin bioadhesive film.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 458–463, 2008.
- [30] S. Bansal and A. DeStefano, "Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules," *AAPS J.*, vol. 9, no. 1, pp. E109–E114, 2007.
- [31] M. L. Parello, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 134–139, 2010.
- [32] H. Ravivarapu, R. Mahalingam, and B. Jasti, "Biodegradable polymeric delivery systems," in *Design of controlled release drug delivery systems*, X. Li and B. Jasti, Eds. California: McGraw-Hill, 2006, pp. 271–303.
- [33] M. E. Roca, M. Baschini, and K. Sapag, "Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite," *Appl. Clay Sci.*, vol. 114, pp. 69–76, 2015.
- [34] P. Liu, T. Ju, and Y. Qui, "Diffusion-controlled drug delivery systems," in *Design of controlled release drug delivery systems*, X. Li and B. Jasti, Eds. California: McGraw-Hill, 2006, pp. 107–137.

- [35] S. N. Park, J. K. Kim, and H. Suh, "Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substitute," *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3689–3698, 2004.
- [36] Q. Wu, Z. Li, and H. Hong, "Adsorption of the quinolone antibiotic nalidixic acid onto montmorillonite and kaolinite," *Appl. Clay Sci.*, vol. 74, pp. 66–73, 2013.
- [37] M. Matsumoto, K. Kojima, H. Nagano, S. Matsubara, and T. Yokota, "Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 36, no. 8, pp. 1715–1719, 1992.
- [38] K. Torniainen, S. Tammilehto, and V. Ulvi, "The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin," vol. 132, pp. 53–61, 1996.
- [39] K. Torniainen and E. Maki, "Development of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for monitoring of ciprofloxacin photodegradation," vol. 697, pp. 397–405, 1995.
- [40] L. Ge *et al.*, "New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes," *Sci. Total Environ.*, vol. 527–528, pp. 12–17, 2015.
- [41] J. Porras, C. Bedoya, J. Silva-Agredo, A. Santamaría, J. J. Fernández, and R. A. Torres-Palma, "Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic ciprofloxacin in water," *Water Res.*, vol. 94, pp. 1–9, 2016.
- [42] T. Paul, M. Dodd, and T. Strathmann, "Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity," *Water Res.*, vol. 44, pp. 3121–3132, 2010.
- [43] BayerHealthCare, "Ciprofloxacin," 2016. [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/019537s086lbl.pdf.
- [44] CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*, vol. 32, no. 2. 2012.

CAPÍTULO V

Conclusiones generales, proyecciones y perspectivas futuras

Capítulo V: Conclusiones generales, proyecciones y perspectivas futuras

5.1. Conclusiones generales

Para el presente trabajo de tesis se desarrollaron (nano)materiales con base en LDH como SP de FAQ. El trabajo se centró en el estudio de las condiciones de síntesis para su obtención, la caracterización de sus propiedades tanto fisicoquímicas como farmacéuticas relevantes y ensayos de actividad antimicrobiana. Además, se llevó a cabo un diseño preliminar de una formulación bajo la forma de films, a manera de apósito, y se evaluó su desempeño con vistas a una aplicación tópica para la profilaxis y tratamiento de infecciones bacterianas de la piel.

La obtención de los LDH con FAQ vehiculizados se logró mediante metodologías sencillas, aunque se requirió un ajuste cuidadoso de las condiciones de síntesis. Entre estas, uno de los factores con mayor influencia fue la reactividad de los FAQ, debido a que son capaces de formar complejos con los metales que componen las láminas de los LDH. Esta reacción se pudo evitar mediante la utilización de condiciones de síntesis con una alta concentración de aniones OH^- (en el caso del HNaI) o mediante el cambio en la composición de las láminas de LDH (en el caso de la Cip). Así, se obtuvieron dos SP constituidos por LDH de Mg y Al conteniendo NaI, uno con una fase pura de LDH (LDH-NaI-pHvar) y otro (LDH-NaI-pHcte), con una fase adicional de un complejo metálico con el FAQ ($\text{Mg}(\text{NaI})_2$). También, se obtuvo otro SP constituido por LDH de Zn y Al conteniendo aniones Cip⁻ (LDH-Cip), el cual fue incluido en una matriz polimérica de HS, estrategia utilizada para llevar a cabo el diseño preliminar de films plausibles de ser aplicados por vía tópica.

En el caso de los LDH-NaI, la disminución de la fuerza iónica del medio luego de la formación de LDH y su conservación como dispersión, permitió obtener nanopartículas de LDH con una baja agregación debido a su alta carga superficial. Estas partículas, contrariamente a las intercaladas con cloruro, presentaron una forma irregular, lo cual es indicativo de una pérdida de cristalinidad. La morfología de estas partículas no se vio afectada por la presencia de $\text{Mg}(\text{NaI})_2$, el cual se presentó como partículas con forma de

varilla, claramente diferenciadas de las de la fase de LDH. Por otro lado, las partículas de LDH-Cip mostraron una mayor agregación, la cual dio lugar a partículas de tamaño micrométrico debido a que, al contrario de las de LDH-Nal, no fueron mantenidas en dispersión para su conservación.

Los estudios de liberación de FAQ desde los LDH indicaron que el proceso de intercambio iónico es determinante para la liberación. Este comportamiento es típico para los LDH en condiciones de pH superiores a 5, donde la disolución de las láminas es menor. Sin embargo, en medios en los que el pH favoreció la presencia de especies insolubles del FAQ, o en muestras con complejos metálicos, los procesos superficiales de disolución se volvieron determinantes para la liberación del FAQ. Además, la liberación de Cip desde films que contenían LDH como SP ((LDH-Cip)/HS), mostró una mayor modulación de la liberación del FAQ en un medio que simula condiciones fisiológicas de piel lesionada (PBS7,4), en comparación con films poliméricos que contenían directamente el FAQ (Cip/HS).

En cuanto a los ensayos de sensibilidad antimicrobiana, el tamaño nanométrico de los LDH-Nal dio lugar a una mayor interacción con las bacterias, lo cual se reflejó en un incremento de la actividad antimicrobiana. Este efecto disminuyó con la presencia de partículas de mayor tamaño, como las de $Mg(Nal)_2$ en la muestra LDH-Nal-pHcte. Por su parte, la obtención de films con base en los LDH-Cip permitió un aseguramiento de dosis uniformes, para las cuales la acción antimicrobiana del FAQ mostraría un efecto prolongado y clínicamente relevante, de utilidad tanto para la profilaxis como para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel. Esto favorecería una administración sitio-específica y podría evitar efectos secundarios sistémicos indeseados. Además, al liberarse el FAQ de manera modulada, se podrían reducir las molestas y costosas aplicaciones repetitivas de los antimicrobianos, lo cual, en última instancia, podría promover una mejor aceptación y finalización del tratamiento farmacoterapéutico por parte de los pacientes.

Por lo tanto, los sistemas desarrollados en este trabajo de tesis presentaron características interesantes como SP de FAQ ya sea en forma de dispersión o como films y resultan en alternativas interesantes para el tratamiento y profilaxis de infecciones tópicas oportunistas comunes.

5.2. Proyecciones a corto plazo y perspectivas futuras

Este trabajo de tesis de maestría abre nuevas perspectivas de investigación, no solo direccionadas a la aplicación de los SP en situaciones terapéuticas específicas, sino también, relacionadas con la evaluación y sistematización de los enfoques de investigación en lo que respecta a los LDH como SP de FAQ. En este sentido, en función de los estudios realizados y los resultados obtenidos, resulta interesante profundizar el estudio de las propiedades interfaciales debido a que, un mejor conocimiento de estas propiedades podría contribuir a la obtención de films con buenas características de bioadhesión. Sería de gran relevancia llevar a cabo estudios de bioadhesividad de los films desarrollados a fin de conocer su capacidad de adherencia o fijación sobre la piel sana o lesionada, e incluso sobre mucosas. De forma complementaria, realizar ensayos mecánicos para conocer la resistencia a la tensión de los films aportará a su completa caracterización.

También, resulta interesante estudiar la incorporación de los SP obtenidos, a otros polímeros biocompatibles (PCL, PLA, PGA) para formar materiales compuestos y evaluarlos como recubrimiento de prótesis o implantes con vistas a evitar infecciones post-quirúrgicas.

Además, podría incorporarse un colorante a la formulación de los films obtenidos con el fin de facilitar la evaluación de los frentes de hinchamiento, aunque debe considerarse la posibilidad de que existan o no interacciones entre el colorante y los componentes del film, por lo que se debería contar con films sin colorantes, como los obtenidos en la presente tesis, como referencias.

Se debe remarcar que los LDH obtenidos en la presente investigación podrían administrarse por otras vías y ejercer su acción sobre otros sitios diana. Así, si se controla la agregación y aglomeración de los LDH-FAQ para conseguir un tamaño entre 50 y 200 nm, se podrían aplicar por vía parenteral puesto que, se prevendría su eliminación por el sistema inmunológico. Además, se podrían realizar funcionalizaciones para mejorar su especificidad; o, si se realiza un recubrimiento que evite su disolución en medio ácido, se podrían administrar por vía gastrointestinal.

También, se podrían ampliar los estudios microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana de los LDH-FAQ obtenidos frente a otras cepas bacterianas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, a los fines de establecer su espectro de acción. Adicionalmente, se podrían vehiculizar otras (fluoro)quinolonas en los LDH y evaluar sus propiedades de relevancia para establecer similitudes y diferencias con los resultados obtenidos para Nal y Cip.

En virtud de lo expuesto, los LDH-FAQ muestran un gran potencial en el área biomédica; y, la realización de diferentes estudios que permitan profundizar el conocimiento sobre estos sistemas ampliaría las posibilidades de su aplicación para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas que pueden ser tratadas con los FAQ. Además, se haría un uso más eficiente de su vehiculización para disminuir efectos secundarios y el número de aplicaciones o administraciones de antimicrobianos e incluso, con perspectivas futuras, podrían facilitar la recuperación post-quirúrgica de los pacientes.

ANEXO

Anexo: Publicaciones generadas a partir de esta tesis

A.1. Publicaciones en revistas con referato

Y. Salguero, M. García, G. Mosconi y R. Rojas. Structural and morphological aspects of (fluoro)quinolone delivery by layered double hydroxide nanoparticles. *New Journal of Chemistry*. DOI: 10.1039/C8NJ03072C.

Y. Salguero, L. Valenti, R. Rojas y M. García. Hyaluronan/layered double hydroxide-based hybrid composite films for controlled topical ciprofloxacin release. En redacción.

A.2. Avances de presentaciones a congresos (Proceedings)

Y. Salguero, M. García y R. Rojas. Nanoláminas y microfibras de hidróxidos dobles laminares intercalados con nalixidato. *XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica*. (2017). e-book ISBN 978-987-688-210-1. Disponible en: <http://miten.com.ar/cafqi/xxcafqi2017.pdf>

A.3. Presentaciones a congresos, simposios y conferencias

A.3.1. Nacionales

Y. Salguero, R. Rojas y M. García. Híbridos hidróxidos dobles laminares/Eudragit L100 para la liberación de fármacos antimicrobianos (Póster). *XII Simposio Argentino de Polímeros*. Córdoba, Argentina (18 al 20 de octubre de 2017)

A.3.2. Internacionales

Y. Salguero, L. Valenti, R. Rojas y M. García. Films poliméricos con base en hidróxidos dobles laminares como portadores de ciprofloxacina para aplicación tópica. *5ta Reunión internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) y 50º Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE)*. San Luis, Argentina (14 al 16 de noviembre de 2018).

R. Rojas, C. Vasti, D. Aristizabal-Bedoya, Y. Salguero y C. Giacomelli. Synthesis, functionalization and biological identity of layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications (Conferencia). *16th International Clay Conference*. Granada, España (17 al 21 de julio de 2017).

A.4. Trabajos de divulgación científica

Y. Salguero, R. Rojas y M. García. Híbridos hidróxidos dobles laminares/Eudragit L100 para la liberación de fármacos antimicrobianos. *VIII Jornadas de Posgrado y II Jornadas de Ciencia y Tecnología*. (2018).

Y. Salguero, M. García y R. Rojas. Materiales inorgánicos/orgánicos como sistemas portadores de antimicrobianos (Bitacor@Posgrado). *Revista Bitacor@Digital* (2018). En revisión.

A.5. Premios

Y. Salguero. Ganadora del PRIMER PREMIO del concurso “Mi tesis en 3 minutos” en el marco de las VIII Jornadas de Posgrado y II Jornadas de Ciencia y Tecnología de la FCQ (UNC).