



Universidad de Granada

**Diseño de materiales multicomponente con apatitos
nanocristalinos y cocristales farmacéuticos antiinflamatorios
para aplicaciones en biomedicina**

**Design of multicomponent materials involving nanocrystalline
apatite and antiinflammatory pharmaceutical cocrystals for
biomedical applications**

FRANCISCO JAVIER ACEBEDO MARTÍNEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Francisco Javier Acebedo Martínez
ISBN: 978-84-1195-442-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/94985>

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa pienso en todas aquellas personas que me han acompañado en el proceso, empezando por las que han colaborado de una u otra manera en el proyecto de Tesis Doctoral, y siguiendo por las que me han apoyado y hecho el camino más fácil. Sólo tengo palabras de agradecimiento hacia ellas por haber estado ahí cuando las he necesitado.

Agradezco al profesor Juan Antonio Marchal y su equipo, del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, por la oportunidad que me brindó de aprender en su laboratorio las técnicas de cultivos celulares necesarias para evaluar la biocompatibilidad de algunos de los materiales obtenidos.

Quiero agradecer también al profesor Jorge Fernando Fernández Sánchez, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por sus enseñanzas y estudios de luminiscencia de los materiales dopados con tierras raras. Sin su participación esta Tesis no tendría el mismo valor y calidad.

Gracias al profesor Fernando Martínez Checa del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, por su disposición a colaborar en el trabajo de esta Tesis con los estudios de actividad antibacteriana.

Gracias al profesor Antonio Frontera del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares, por sus estudios teóricos de los cocristales obtenidos a lo largo de la Tesis. Sus resultados han sido de gran utilidad para mi aprendizaje sobre las interacciones presentes en estos materiales.

Gracias a todo el personal técnico del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por el trabajo realizado y la infinita amabilidad, siempre atentos y abiertos a cualquier petición.

Tengo que agradecer profundamente al profesor Francisco Javier Blanco, coordinador del programa de Doctorado en Biomedicina, y al tutor de mi Tesis, el profesor Sergio Manuel Granados del departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Muchas gracias por ayudarme en todo momento las mil veces que he acudido a vosotros.

Agradezco enormemente a las personas del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, en especial a los profesores Antonio Rodríguez y Sara Rojas, y a sus chicos, Amalia, Samuel y María del Carmen. Siempre habéis tenido un momento cuando necesitaba ayuda, sin importar la hora o el día. Ha sido un auténtico placer poder conocerlos y trabajar con vosotros.

Agradezco profundamente a la profesora Antonia Follenzi del *Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale*, en Novara (Italia) por permitirme realizar una estancia tan productiva en su grupo de investigación. Gracias a ella he conocido a personas como la Dra. Francesca Oltolina, quien siempre ha tenido una sonrisa para ayudarme y enseñarme las técnicas de cultivos celulares. De todo corazón muchas gracias por haber estado ahí. Pero no solo a ellos sino a todo el equipo del laboratorio de Histología, Células y Terapia Génica de la Università de Piemonte Orientale. Gracias por haberme acogido y tratado como uno de vosotros haciendo muy agradable mi paso por el laboratorio.

Debo detenerme en el Departamento de Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, para dar infinitas gracias a la profesora Alicia Domínguez Martín, por tus consejos, tu amabilidad y tu ayuda incondicional. También debo dar gracias al profesor Juan Niclós, por tus historias y tu sabiduría. De todo corazón mil gracias.

Por supuesto debo dar gracias a todos los miembros del Laboratorio de Estudios Cristalográficos con los que he podido trabajar y aprender, Alfonso, Luis, Sara, Melese, Joaquín, Ismael... así como a todos los estudiantes que han pasado este laboratorio, Noelia, Milena, Alejandro, Carolina, Julián, Clara... siento mucho no poder nombraros a todos, pero sí que os doy las gracias a todos por vuestro trabajo, entusiasmo y gratitud. Sobre todo, quiero dar gracias de todo corazón al aquelarre formado por Carmen, Paqui, Raquel, Sandra y Aurora, con el que he compartido gran parte de mis días. Si me ha gustado tanto mi paso por este laboratorio ha sido gracias a vosotras.

En especial quiero dar gracias al Dr. Cristóbal Verdugo Escamilla por sus lecciones de difracción de rayos X de polvo y sus profundos conocimientos de “cacharreo informático”. A pesar de los duros días de trabajo que hemos compartido siempre has

sabido sacarme una sonrisa, teniendo en mente mi bienestar. No puedo estar más agradecido por haberte conocido.

Dejándolos para el final, debo dar mis más profundos agradecimientos a mis directores de Tesis, quienes os habéis convertido en auténticos amigos y compañeros, el Dr. Jaime Gómez Morales y el Dr. Duane Choquesillo Lazarte. Jaime, gracias por compartir conmigo tu experiencia, y por haber sido una guía constante para el desarrollo de mis conocimientos, lo que se traduce hoy en esta Tesis. Duane, ¿qué decir?, has conseguido sacar lo mejor de mí, como investigador y como persona, enseñándome valores como la disciplina y la constancia, pero sin dejar de lado la cercanía y la amistad. Gracias a los dos por creer en mí desde el principio, por todos los momentos y viajes que hemos compartido y por supuesto, gracias por hacer de mí un investigador.

El trabajo que se recoge en esta memoria no sería nada sin las personas que han estado a mi lado día tras día, ayudándome a construir mi camino hacia el futuro.

Infinitas gracias a mi pareja, Leticia, no puedo decirte nada que no sepas, pero quiero agradecerte por haberme acompañado desde el principio, verme crecer y mejorar como persona. Gracias por hacerme reír cuando más lo necesitaba, por darme fuerzas, escucharme, transmitirme paz y tranquilidad y apoyarme incondicionalmente. No tengo palabras para describir lo que has hecho por mí, por eso quiero dejar grabado este Gracias en tu nombre.

Finalmente, mi familia, os doy las gracias por todo lo que habéis hecho y hacéis. Mis hermanos, Antonio y Elisa, dos pilares fundamentales en los que apoyarme, me habéis enseñado a ser amable y a compartir todo lo que tengo, así que este trabajo es tan vuestro como mío. A mi madre, eres la persona que me ha enseñado a ser feliz y vivir tal y como quiero, apoyándome en todo momento y dedicando tu vida a nosotros. Al igual que para mis hermanos, este trabajo también es tuyo. Por último, a mi padre, mi referente, me has enseñado a disfrutar de las pequeñas cosas y a ser un hombre noble. Esa frase, “venga, campeón”, es lo que me ha llevado hasta aquí y me llevará a todas las metas de mi vida. Te haré sentir orgulloso.

LISTA DE ABREVIATURAS 17

RESUMEN / ABSTRACT 21

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción.....31

1.1.1. El Hueso33

1.1.2. El Apatito.....35

1.1.2.1. Aplicaciones del apatito37

1.1.2.1.1. Nanosondas para imagen de contraste.....37

1.1.2.1.2. Administración de fármacos.....38

1.1.2.1.3. Recubrimiento y funcionalización de superficies.....39

1.1.2.2. Métodos para la síntesis de apatito42

1.1.3. Reparación de tejidos óseos.....47

1.1.3.1. Etapas de la regeneración ósea48

1.1.3.2. Problemas asociados a la inflamación50

1.1.4. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....51

1.1.4.1. Descripción y clasificación.....51

1.1.4.2. Estrategias para la mejora de las propiedades de fármacos.....53

1.1.5. Materiales multicomponente farmacéuticos (MMFs)54

1.1.5.1. Definición y clasificación de los MMFs54

1.1.5.2. Propiedades afectadas por la formación de MMFs55

1.1.5.3. Interacciones no covalentes en MMFs59

1.1.5.4. Estrategias de síntesis de MMFs63

1.1.5.4.1. Síntesis en estado sólido63

1.1.5.4.2. Síntesis en solución67

1.1.6. Referencias71

1.2. Objetivos.....89

CAPÍTULO 2: MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1. Difracción de rayos X.....95

2.1.1. Difracción de rayos X de polvo95

2.1.2. Difracción de rayos X de monocristal95

2.2. Espectroscopía.....96

2.2.1. Espectroscopía de infrarrojos96

2.2.2. Espectroscopía RAMAN96

2.2.3. Espectroscopía de luminiscencia96

2.3. Microscopía97

2.3.1. Microscopía electrónica de transmisión97

2.3.2. Microscopía electrónica de barrido	97
2.3.3. Microscopía de fuerza atómica.....	97
2.4. Espectrometría.....	98
2.5. Dispersión dinámica de luz y movilidad electroforética	98
2.6. Análisis térmico.....	98
2.7. Estudios de solubilidad.....	99
2.8. Estudios teóricos de etenzamida y sus cocristales.....	100
2.9. Estudios de actividad antimicrobiana	100
2.10. Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	100
2.10.1. Células seleccionadas	100
2.10.2. Cultivos celulares	101
2.10.3. Citotoxicidad	101
2.10.4. Citometría de flujo y microscopía confocal	102
2.10.5. Ensayos de diferenciación osteogénica	103
2.10.5.1. Protocolo de diferenciación.....	103
2.10.5.2. PCR cuantitativa en tiempo real.....	103
2.10.5.3. Tinción de fosfatasa alcalina	104
2.10.5.4. Tinción de rojo de alizarina.....	104
2.10.6. Análisis estadístico	105
2.11. Referencias	106

CAPÍTULO 3: MATERIALES MULTICOMPONENTE DE APATITO

3.1. Síntesis de nanopartículas de apatito biomiméticas dopadas con Tb³⁺ mediante descomplejación térmica	111
3.1.1. Introducción.....	113
3.1.2. Síntesis de nanopartículas de apatito dopadas con Tb ³⁺	113
3.1.3. Resultados y discusión	114
3.1.3.1. Propiedades estructurales, composicionales, espectroscópicas, morfológicas y coloidales.....	114
3.1.3.2. Estudio de las propiedades luminiscentes en estado sólido y en solución acuosa	123
3.1.3.3. Estudios de las propiedades biológicas	125
3.1.4. Referencias	129
3.2. Preparación de nanopartículas de apatito dopadas con iones Mg²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺ mediante un método hidrotermal <i>one-step</i> partiendo de CaCO₃ biogénico (bCCP).....	133
3.2.1. Introducción.....	135
3.2.2. Síntesis de nanopartículas.....	136
3.2.3. Resultados y discusión	136
3.2.3.1. Influencia de la temperatura en la transformación de bCCP en micro-nanopartículas de apatito dopadas con iones metálicos	136
3.2.3.2. Estudios de las propiedades biológicas	143
3.2.3.2.1. Citotoxicidad celular	143

3.2.3.2.2.	Inducción de la diferenciación osteogénica.....	145
3.2.3.2.2.1.	Expresión génica	145
3.2.3.2.2.2.	Tinción Fosfatasa Alcalina	147
3.2.3.2.2.3.	Tinción Rojo de Alizarina	148
3.2.4.	Referencias	151
3.3.	Nucleación de apatito sobre láminas de grafeno y óxido de grafeno	
	funcionalizadas mediante difusión de vapor en microgotas	155
3.3.1.	Introducción.....	157
3.3.2.	Síntesis de los nanocomposites	158
3.3.3.	Resultados y discusión	159
3.3.3.1.	Especiación, sobresaturación y propiedades físico-químicas.....	159
3.3.3.2.	Propiedades mecánicas de los nanocomposites.....	168
3.3.3.3.	Propiedades luminiscentes de los nanocomposites	172
3.3.3.4.	Propiedades biológicas de los nanocomposites.....	174
3.3.4.	Referencias	178
CAPÍTULO 4: MATERIALES MULTICOMPONENTE DE FÁRMACOS		
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS		
4.1.	Estudio de la influencia del sintón en la formación de cocristales	
	farmacéuticos de etenzamida (ETZ)	183
4.1.1.	Introducción.....	185
4.1.2.	Síntesis de cocristales farmacéuticos de ETZ.....	186
4.1.2.1.	Diseño teórico de los cocristales de ETZ	186
4.1.2.2.	Síntesis mecanoquímica en estado sólido.....	188
4.1.2.3.	Síntesis en solución	188
4.1.3.	Resultados y discusión	189
4.1.3.1.	Evaluación de la formación de cocristales de ETZ	189
4.1.3.2.	Análisis estructural de los cocristales obtenidos de ETZ	191
4.1.3.2.1.	ETZ–CAT	192
4.1.3.2.2.	ETZ–RES	193
4.1.3.2.3.	ETZ–HQ	194
4.1.3.2.4.	ETZ–PHL	195
4.1.3.3.	Estudio teórico de los cocristales de ETZ	198
4.1.3.4.	Estudio de las propiedades de los cocristales de ETZ.....	204
4.1.3.4.1.	Análisis térmico.....	204
4.1.3.4.2.	Estudio de estabilidad termodinámica.....	206
4.1.3.4.3.	Solubilidad y perfil de disolución.....	207
4.1.4.	Referencias	210
4.2.	Mejora de la solubilidad de fármacos AINEs mediante la formación de	
	materiales multicomponente tipo fármaco-fármaco con ciprofloxacino	
	(CIP).....	215
4.2.1.	Introducción.....	217
4.2.2.	Preparación de las sales de CIP–AINEs	219

4.2.2.1. Diseño de sales moleculares	219
4.2.2.2. Síntesis mecanoquímica	220
4.2.2.3. Síntesis en solución	220
4.2.3. Resultados y discusión	221
4.2.3.1. Evaluación de la formación de sales moleculares	221
4.2.3.2. Análisis estructural de las sales moleculares CIP–AINEs.....	222
4.2.3.2.1. CIP–MEF	224
4.2.3.2.2. CIP–MEF·H ₂ O	225
4.2.3.2.3. CIP–TLF	226
4.2.3.2.4. CIP–SLD	227
4.2.3.2.5. CIP–DIC	228
4.2.3.2.6. CIP–KET	229
4.2.3.2.7. CIP–DKT	230
4.2.3.3. Estudio de las propiedades de las sales moleculares	234
4.2.3.3.1. Estabilidad térmica	234
4.2.3.3.2. Estabilidad termodinámica	235
4.2.3.3.3. Estudio de solubilidad	238
4.2.3.3.4. Actividad antibacteriana	239
4.2.4. Referencias	242
4.3. Sales moleculares de Metformina (MTF)–AINEs: Un camino para mejorar la biodisponibilidad oral y la estabilidad.....	247
4.3.1. Introducción.....	249
4.3.2. Preparación de las sales de MTF–AINEs	251
4.3.2.1. Diseño de las sales moleculares.....	251
4.3.2.2. Síntesis de MTF·HCl.....	251
4.3.2.3. Síntesis mecanoquímica	252
4.3.2.4. Síntesis en solución	252
4.3.3. Resultados y discusión	253
4.3.3.1. Evaluación de la formación de las sales moleculares.....	253
4.3.3.2. Análisis estructural de las sales de MTF–AINEs	254
4.3.3.2.1. MTF–MEF y MTF–TLF	255
4.3.3.2.2. MTF–NIF y MTF–NIF·2H ₂ O	257
4.3.3.2.3. MTF–DIF	260
4.3.3.2.4. MEF–FLF	261
4.3.3.3. Estudio de las propiedades de las sales moleculares	266
4.3.3.3.1. Estabilidad térmica	266
4.3.3.3.2. Estabilidad termodinámica	267
4.3.3.3.3. Estudios de solubilidad.....	270
4.3.4. Referencias	272

CAPÍTULO 5: SALES MOLECULARES: CAPACIDAD PARA AUMENTAR LA CARGA DE FARMACOS EN NANOPARTÍCULAS DE APATITO

5.1. Introducción.....	277
------------------------	-----

5.2. Síntesis de materiales	278
5.2.1. Síntesis de nanopartículas de apatito	278
5.2.2. Síntesis de MTF-FKT	278
5.2.3. Síntesis de Ap-MTF-DKT	279
5.3. Resultados y discusión	279
5.3.1. Evaluación de la formación de MTF-DKT	279
5.3.2. Estructura cristalina de MTF-DKT	282
5.3.3. Estudio de las propiedades de MTF-DKT	285
5.3.3.1. Estabilidad térmica y termodinámica de MTF-DKT	285
5.3.3.2. Solubilidad y perfil de disolución de MTF-DKT	287
5.3.4. Nanopartículas de apatito dopadas con MTF-DKT	289
5.4. Referencias	296
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	297

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de calcio amorfo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADNcomplementario
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AINE	Antiinflamatorio No Esteroideo
ALP	Fosfatasa alcalina
Ap	Apatito
API	Principio Activo Farmacéutico
ARN	Ácido ribonucleico
bCCP	Carbonato cálcico biogénico
BFDH	Bravais–Friedel–Donnay–Harker
BGLAP	Proteína gamma-carboxiglutamato ósea
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2
CaP	Fosfato cálcico
CAT	Catecol
CIP	Ciprofloxacino
Cit	Citrato
CNT	Nanotubos de carbono
COL1A	Colágeno tipo A
CP	Puntos críticos
CSD	Base de Datos Estructural de Cambridge
CTB	Banda de transferencia de carga
DIC	Diclofenaco
DIF	Diflunisal
DKT	Dexketoprofeno
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DOXO	Doxorrubicina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDX	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ETZ	Etenzamida
Eu	Europio
FBS	Suero bovino fetal

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLF	Flurbiprofeno
FTIR	Espectroscopía infrarrojo de transformada de Fourier
G	Grafeno multicapa
GO	Óxido de Grafeno
HA	Hidroxiapatito
HAADF	Microscopía de imagen de campo oscuro de alto ángulo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HQ	Hidroquinona
HR	Humedad Relativa
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
KET	Ketoprofeno
LAG	<i>Liquid-Assisted-grinding</i>
L-Aln	L-Alanina
L-Arg	L-Arginina
L-Asp	Ácido L-Aspártico
LPE	<i>Liquid phase exfoliation</i>
M	Iones Metálicos
MEF	Ácido Mefenámico
MEP	Potencial electrostático molecular
MMF	Material Multicomponente Farmacéutico
MTF	Metformina
MTF·HCl	Metformina clorhidrato
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nAp	Nanopartículas de Apatito
NG	<i>Neat-Grinding</i>
NIF	Ácido Niflúmico
OCP	Fosfato octacálcico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	<i>Buffer phosphate solution</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PHL	Fluoroglucinol

PI	Propiedad intelectual
PLA	Ácido poli-láctico
PSD	Distribución de tamaño de partícula
PXRD	<i>Powder X-ray Diffraction</i>
q-RT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R.L.I.	Intensidad relativa de luminiscencia
RANKL	Activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B
RES	Resorcinol
RMS	Propiedades mecánicas
RMSD	Desviación cuadrática media
SAED	Difracción de electrones en área seleccionada
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SCXRD	<i>Single-crystal X-ray Diffraction</i>
SDVD	<i>Sitting drop vapour difusión</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLD	Sulindac
SPP1	Fosfoproteína secretada 1
STEM	Microscopía electrónica de transmisión de barrido
Tb	Terbio
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
TLF	Ácido Tolfenámico
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
W	Whitlockita
α-TCP	α -Fosfato tricálcico
β-TCP	β -Fosfato tricálcico

RESUMEN

El apatito (Ap), principal constituyente inorgánico de huesos y dientes, se define como una fase de fosfato de calcio no estequiométrica, que presenta deficiencias en iones Ca^{2+} y OH^- además de sustituciones iónicas de grupos CO_3^{2-} , Na^{2+} y Mg^{2+} , entre otras. Estas deficiencias, además de su tamaño nanométrico, le proporcionan una solubilidad mayor que su homólogo estequiométrico hidroxiapatito $[\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$, la fase más estable e insoluble de los fosfatos de calcio. Esta solubilidad diferencial sumada a la presencia de una capa hidratada no apatítica es fundamental en el intercambio y adsorción iónica, permitiendo la interacción con moléculas orgánicas, y su actuación como "reservorio" iónico para garantizar la regulación y homeostasis, entre muchas otras funciones.

Debido a sus implicaciones biológicas, existe un gran interés en la investigación y el desarrollo de nuevos materiales híbridos basados en Ap, ya que permiten combinar las propiedades intrínsecas del Ap (biocompatibilidad, bioactividad y osteoinductividad) con las propiedades de otros materiales (luminiscencia, fluorescencia, actividad antimicrobiana o propiedades mecánicas). El uso de materiales híbridos multicomponente se ha extendido en diversas áreas de la biomedicina, principalmente en bioimagen, nanomedicina o ingeniería tisular, permitiendo su uso en aplicaciones de transporte de fármacos, nanopartículas de marcaje (nanosondas), o recubrimiento de superficies en materiales de refuerzo e implantes, mejorando la integración y la regeneración del tejido.

En el ámbito clínico traumatológico, las condiciones fisiológicas que pueden encontrarse en procesos quirúrgicos, politraumatismos, infecciones o diversas enfermedades, dan lugar a procesos inflamatorios que, sostenidos en el tiempo, inhiben el proceso de reparación ósea. Una estrategia para evitar este tipo de problemas, es la administración prolongada de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Sin embargo, la escasa solubilidad de los AINEs se asocia con la necesidad de dosis más altas y mayor posibilidad de efectos secundarios en el paciente. De este modo, y al igual que en el caso del Ap, el estudio y desarrollo de nuevos materiales multicomponente basados en AINEs (sales y cocrystalos farmacéuticos) permiten modificar las propiedades del fármaco de referencia, mejorando su solubilidad, estabilidad, e incluso permitiendo

fenómenos de sinergia. Estos materiales, están formados por un principio activo (API) y un componente que co-forma la estructura cristalina, denominado coformador, el cual no debe ser tóxico o presentar efectos secundarios adversos. La nueva estructura formada entre el API y el coformador, se mantiene mediante interacciones no covalentes, por lo que el API no es modificado covalentemente, manteniendo su actividad intacta.

Como ya se ha mencionado, el uso combinado de fármacos AINEs en procedimientos de reparación ósea, en los que interviene el apatito, es una práctica común. Es por ello que la síntesis de nanopartículas de apatito (nAp), dopadas con este tipo de fármacos permitiría combinar las propiedades biológicas del Ap, con una actuación controlada, local y precisa del fármaco. A pesar de que este tipo de estrategias han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, uno de los factores limitantes en el proceso de carga de las nanopartículas es la solubilidad intrínseca del fármaco. Esta tesis, plantea una nueva aproximación que estudia la combinación de sales y cocristales basadas en AINEs para mejorar su solubilidad acuosa y aumentar el límite de carga del fármaco en nAp, generando así un material híbrido que pueda ser utilizado en traumatismos, infecciones y regeneración de defectos óseos.

Todas estas consideraciones confluyen en la presente tesis doctoral, la cual se centra en el diseño y desarrollo de nuevos materiales multicomponente basados en Ap y fármacos AINEs, con propiedades híbridas que permiten su aplicación en biomedicina. Los resultados y discusión de este trabajo de investigación se muestran en los siguientes tres capítulos.

El CAPÍTULO 3 expone los resultados de la síntesis y caracterización de 1) nAp dopadas con Tb^{3+} con propiedades luminiscentes mediante la técnica de descomplejación térmica. 2) nAp dopadas con iones Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} con propiedades osteoinductoras obtenidas mediante transformación hidrotermal en un solo paso de $CaCO_3$ biogénico de conchas marinas. 3) Nanocomposites grafeno multicapa/nanoapatito (G/nAp) y óxido de grafeno/nanoapatito (GO/nAp) funcionalizados con biomoléculas como L-Arginina, L-Alanina, ácido L-Aspártico o Citrato, e iones Tb^{3+} , con propiedades mecánicas, luminiscentes, y biológicas mejoradas.

El CAPÍTULO 4 se centra en la síntesis y caracterización de materiales multicomponente (cocristales y sales) con propiedades antiinflamatorias usando 1)

etenzamida y polifenoles, 2) AINEs y ciprofloxacino, y 3) AINEs y metformina. Especial atención se presta al estudio de la relación entre la estructura y las propiedades de los nuevos materiales.

En el desarrollo de la tesis doctoral los dos capítulos mencionados han permitido adquirir el conocimiento necesario sobre los procedimientos de síntesis y caracterización de materiales híbridos de complejidad creciente. En el caso del Ap, partiendo desde la producción de nanopartículas hasta llegar a la mineralización de superficies funcionalizadas, y en el caso de los materiales multicomponente farmacéuticos, partiendo desde sales y cocristales en los que el coformador es una molécula orgánica sencilla, hasta la obtención de materiales fármaco-fármaco lo cual permite generar sinergia y actividades combinadas.

Por último, en el CAPITULO 5, se plantea la novedosa estrategia de funcionalizar nAp con materiales multicomponentes farmacéuticos permitiendo la obtención de un material híbrido con una eficiencia de carga mucho mayor que la que se obtiene funcionalizando con el fármaco de referencia. El material seleccionado será el constituido por dexketoprofeno y metformina, que combinan actividad antiinflamatoria y antidiabética, lo cual lo hace altamente atractivo para tratamientos de regeneración ósea en pacientes cuya patología está además comprometida por la diabetes.

ABSTRACT

Apatite (Ap), the main inorganic constituent of bones and teeth, is defined as a non-stoichiometric calcium phosphate, which exhibits deficiencies in Ca^{2+} and OH^- ions as well as ionic substitutions of CO_3^{2-} , Na^{2+} , and Mg^{2+} , among others. These ionic deficiencies, along with its nanometric size, provide a higher solubility than its stoichiometric counterpart, hydroxyapatite $[\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$, the most stable and insoluble phase of calcium phosphates. This differential solubility, combined with the presence of a non-apatitic hydrated layer, is crucial for ionic adsorption and exchange, allowing interaction with organic molecules, and acting as an ionic "reservoir" to ensure homeostasis, among many other functions.

Due to its biological implications, there is a great interest in the research and development of new hybrid materials based on Ap, as they allow combining the intrinsic properties of biocompatibility, bioactivity, and osteoinductivity of Ap with others such as luminescence, fluorescence, antimicrobial activity, or mechanical properties, provided by the other components of the material. The use of multicomponent hybrid materials has reached various areas of biomedicine, specifically bioimaging, nanomedicine, or tissue engineering, allowing their use in drug delivery applications, nanoparticle labelling (nanoprobles), or surface coating in reinforcement materials and implants to improve integration and bone repair.

In the clinical traumatology field, the physiological conditions that can be found in surgical processes, polytrauma, infections, or various diseases, lead to inflammatory processes that, sustained over time, inhibit the bone repair process. One strategy to avoid these types of problems is the prolonged administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which have low solubility associated with the need for higher doses and a greater possibility of side effects in the patient. In this way, and as in the case of Ap, the study and development of new multicomponent materials based on NSAIDs (pharmaceutical salts and cocrystals) allow modifying the properties of the reference drug, improving its solubility, stability, and even allowing synergy phenomena. These materials are formed by an active pharmaceutical ingredient (API) and a component that co-forms the crystalline structure, called cofomer, which must not be

toxic or present adverse side effects. The new structure formed between the API and the coformer is maintained through non-covalent interactions, so, in addition to allowing the design of new materials with unique properties, the API is not covalently modified, maintaining its innate activity.

As already mentioned, the combined use of NSAIDs in bone repair procedures, in which apatite is involved, is a common practice. Therefore, the synthesis of apatite nanoparticles (nAp), doped with this type of drug, would allow combining the biological properties of Ap with a controlled, local, and precise action of the drug. Although these types of strategies have been widely studied, one of the limiting factors in the nanoparticle loading process is the intrinsic solubility of the drug. However, a new approach proposes the combination of salts and cocrystals based on NSAIDs, which allows improving their aqueous solubility and increasing the drug loading limit on nAp, thus generating a hybrid material that can be used in traumas, infections, and bone defects regeneration.

All these considerations converge in the present doctoral thesis, which focuses on the design and development of new multicomponent materials with hybrid properties for their application in the biomedicine field. The results and discussion are presented in the following three chapters.

CHAPTER 3 presents the results of the synthesis and characterization of 1) nAp doped with Tb^{3+} with luminescent properties using the thermal decomposition technique. 2) nAp doped with Co^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+} ions with osteoinductive properties obtained through one-step hydrothermal transformation of biogenic $CaCO_3$ from seashells. 3) Multilayer graphene/nanoapatite (G/nAp) and graphene oxide/nanoapatite (GO/nAp) nanocomposites functionalized with biomolecules such as L-arginine, L-alanine, L-aspartic acid, or citrate, and Tb^{3+} ions, with improved mechanical, luminescent, and biological properties.

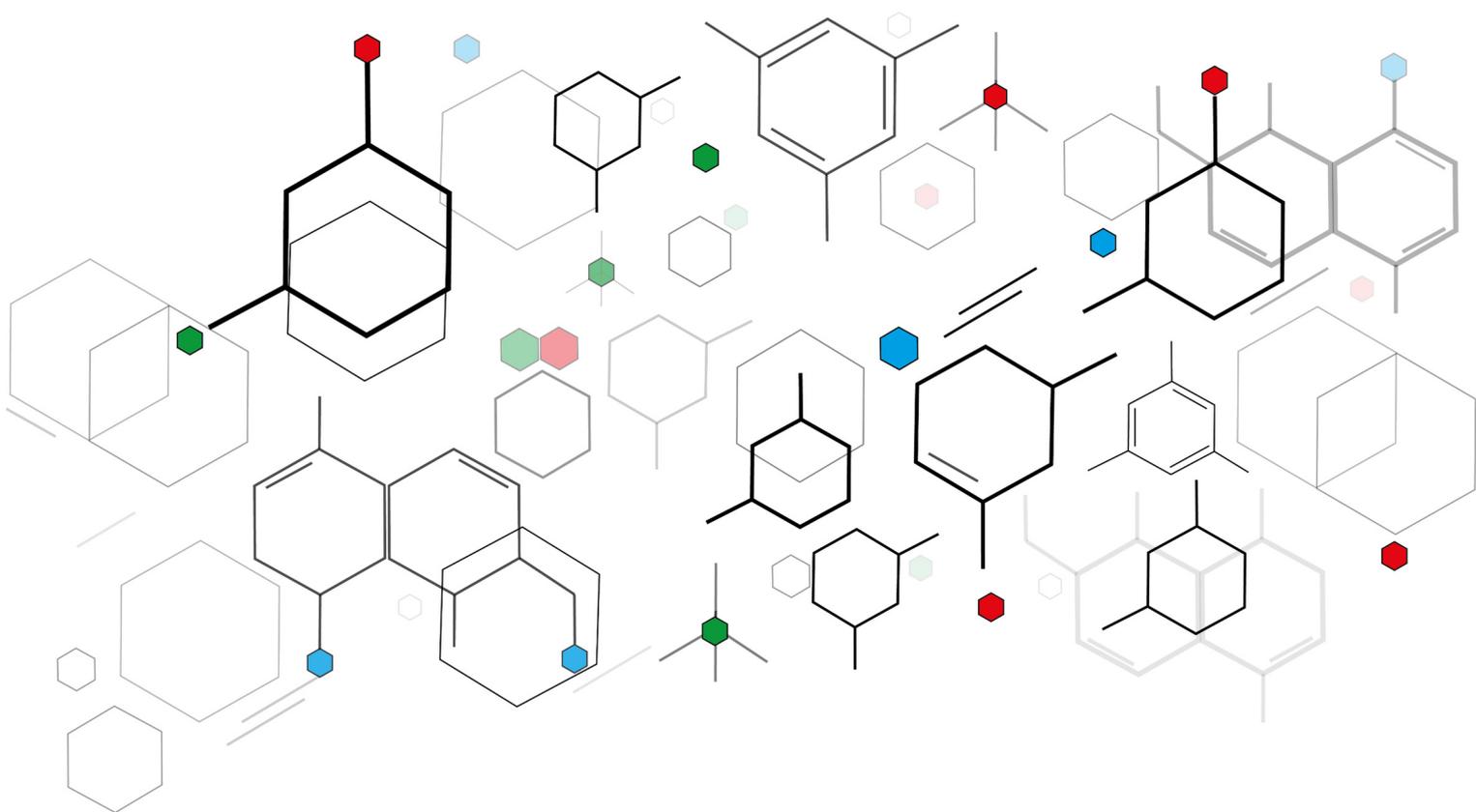
CHAPTER 4 focuses on the synthesis and characterization of multicomponent materials (cocrystals and salts) with anti-inflammatory properties using 1) ethenzamide and polyphenols, 2) NSAIDs and ciprofloxacin, and 3) NSAIDs and metformin. Special attention is paid to studying the relationship between the structure and the properties of the new materials.

The development of the doctoral thesis, through the aforementioned two chapters, has allowed acquiring the necessary knowledge about the synthesis and characterization procedures of hybrid materials of increasing complexity. In the case of Apatite, starting from the production of nanoparticles, up to the mineralization of functionalized surfaces, and, in the case of pharmaceutical multicomponent materials, starting from salts and cocrystals in which the cofomer is a simple organic molecule, up to obtaining drug-drug materials which allow generating synergy and combined activities.

Finally, CHAPTER 5 proposes the novel strategy of functionalizing the nAp with pharmaceutical multicomponent materials, allowing the obtaining of a hybrid material with a much higher loading efficiency than that obtained by functionalizing with the reference drug. The selected material will be constituted by dexketoprofen and metformin, which combine anti-inflammatory and antidiabetic activity, making it highly attractive for bone regeneration treatments in patients whose pathology is further compromised by diabetes.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1.1. Introducción

1.1.1. El Hueso

Los huesos son órganos rígidos que forman parte del endoesqueleto de los vertebrados. Sus principales funciones consisten en mover, sostener y proteger los diversos órganos del cuerpo, además de producir células sanguíneas, y ser un reservorio de minerales y diversas moléculas.^{1,2} Los huesos presentan diversas forma, y una estructura compleja que les permiten ser ligeros, duros y resistentes. Para comprender la arquitectura del hueso se han propuesto varios modelos jerárquicos, siendo el más conocido y aceptado el modelo de Weiner y Wagner, que describe siete niveles de jerarquía, tal y como se observa en la **figura 1.1**.³

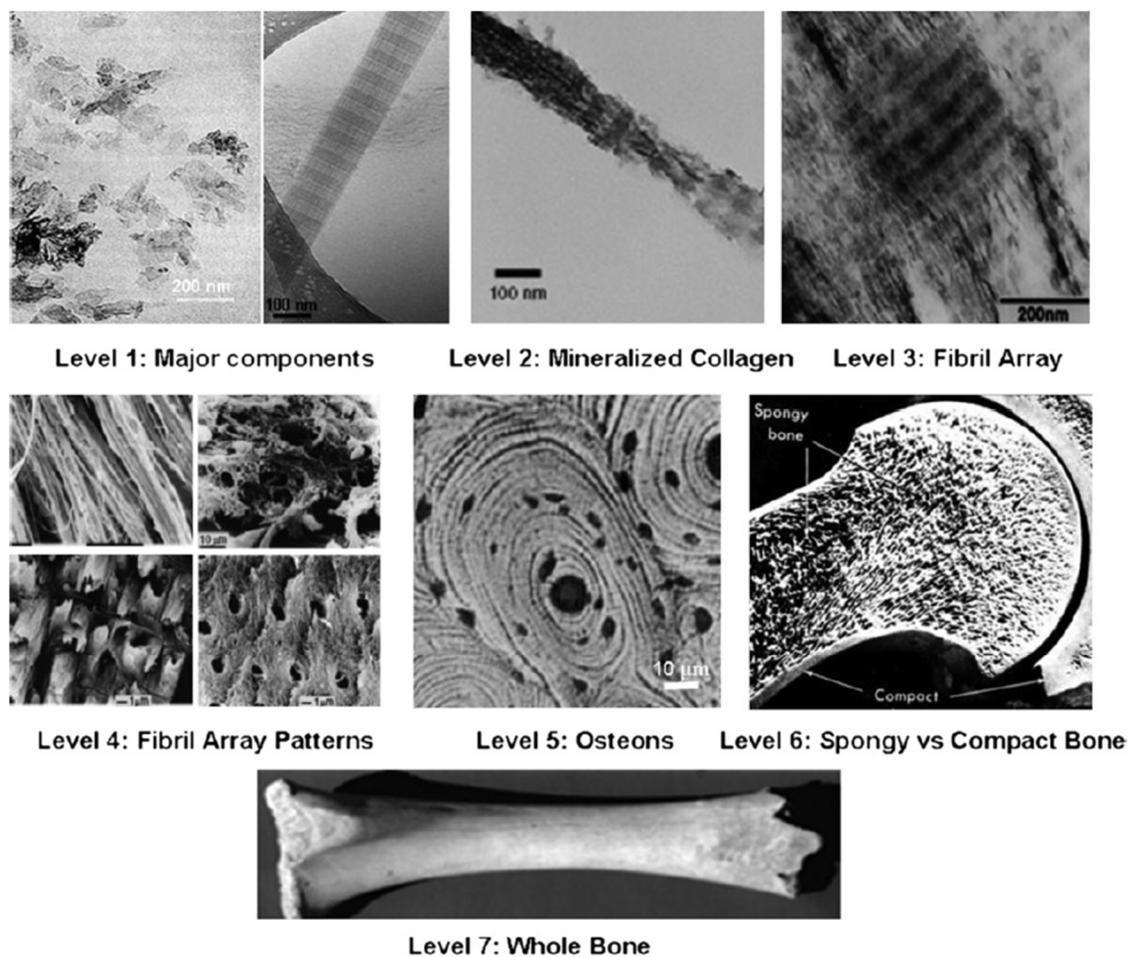


Figura 1.1. Modelo estructural jerarquizado en 7 niveles del tejido óseo de Weiner y Wagner. La autoría de la imagen pertenece a Weiner *et al.*³

Se trata de un modelo “bottom-up” donde el nivel 1 lo forman los componentes a escala nanométrica y moleculares. El tejido óseo está compuesto en un 65% por un tipo

de fosfato de calcio (CaP), concretamente de Ap nanocrystalino (**Tabla 1.1**), un 25% de materia orgánica, principalmente colágeno tipo I, proteínas no colágenas y pequeñas moléculas orgánicas como el citrato (cit), y un 10% en peso de agua. El nivel 2 está formado por fibrillas de colágeno mineralizadas intra y extrafibrilarmente con Ap. En el nivel 3) Las fibrillas de colágeno mineralizadas se entrelazan formando haces y redes.

Tabla 1.1. Fosfatos de calcio relevantes en ingeniería tisular.^{4,5}

CaPs	Fórmula	Ca/P relación
Fosfato dicálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)$	1.0
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato cálcico amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x \text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n = 3–4.5	1.2-2.2
Hidroxiapatito deficiente en calcio (Apatito)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1.5-1.67
α -Fosfato tricálcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
β -Fosfato tricálcico (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Hidroxiapatito (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0

En la escala micrométrica, el nivel 4 está compuesto por matrices de fibrillas entrelazadas que forman diferentes patrones dando lugar a láminas de tejido óseo. En el nivel 5 se observan los osteones, estructuras formadas por una serie concéntrica de laminillas óseas alrededor de un conducto que contiene vasos sanguíneos y nervios, permitiendo la comunicación celular y el intercambio de nutrientes.

En la escala macroscópica, el nivel 6 lo componen el tejido óseo esponjoso y cortical. El hueso esponjoso es extremadamente poroso (75-95% de porosidad en peso) y proporciona espacio para la médula ósea y los vasos sanguíneos, pero tiene una resistencia a la compresión mucho menor que el hueso cortical (compacto), un tejido con menor porosidad (5-10% en peso) que le proporciona gran dureza y resistencia. Finalmente, el nivel 7 describe el hueso como un órgano completo.³

1.1.2. El Apatito

Como ya se ha mencionado, entre los diferentes CaPs, el Ap es el principal constituyente inorgánico de huesos y dientes, pero además se forma en patologías como cálculos renales, salivales y lesiones ateroscleróticas.^{6,7} Debido a su gran implicación biológica, el Ap ha sido ampliamente estudiado y utilizado para el desarrollo de biomateriales. Sin embargo, las características del Ap biológico son únicas y extremadamente complejas de replicar, lo que lo hacen un material escaso de alto valor.

El Ap biológico es una fase no estequiométrica, que presentan deficiencias en iones Ca^{2+} y grupos OH^- , además de una gran cantidad de sustituciones iónicas en su estructura cristalina como son un 4-6% de carbonato (CO_3^{2-}), 0.9% de Na^+ y 0.5% de Mg^{2+} entre otras. Estas sustituciones provocan defectos en la superficie y estructura del Ap, los cuales afectan los parámetros de la red cristalina, su cristalinidad, morfología, solubilidad y estabilidad térmica. De hecho, la superficie cristalina del Ap biológico rara vez es lisa, lo cual también está relacionado con su importancia biológica. Una elevada rugosidad permite aumentar la unión de proteínas en el proceso de mineralización además de mejorar la biocompatibilidad, osteointegración y tener efectos positivos en las reacciones inflamatorias.

Los cristales de Ap tienen un tamaño nanométrico, lo que, sumado a las deficiencias iónicas, le proporcionan una mayor solubilidad en agua que la del hidroxiapatito [HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], la fase estequiométrica más estable de la serie de CaP. Otra característica fundamental del Ap es la presencia de una capa superficial hidratada de naturaleza no apatítica relacionada con el proceso de maduración del Ap. Una mayor solubilidad y la presencia de una capa hidratada son fundamentales para reacciones de intercambio y adsorción de iones, lo que permite su interacción con macromoléculas y fármacos. De este modo el Ap actúa como un "reservorio" de iones garantizando los procesos de regulación y homeostasis. Debido a estas propiedades, el hueso es un tejido vivo, lejos de ser inerte, que continuamente experimenta procesos de remodelación y reparación.⁸

La importancia, pero a su vez escasez del Ap biológico, ha levantado un gran interés en el estudio de los CaPs y Ap sintético. De hecho, años de investigación y caracterización de este tipo de minerales, han demostrado una alta biocompatibilidad,

biodisponibilidad y bioactividad, además de la ausencia de toxicidad o respuestas inflamatorias e inmunológicas. Estas excelentes propiedades biológicas pueden ser potenciadas cuando el Ap sintético presenta características biomiméticas, es decir dimensiones, morfologías, características (nano)estructurales y químicas similares a las del Ap biológico. Aunque se han desarrollado diferentes estrategias para la síntesis de Ap, la obtención de Ap biomimético y nanocrystalino sigue considerándose un desafío científico y tecnológico.^{9,10}

En este contexto, los materiales híbridos basados en Ap pueden tener un potencial enorme en el tratamiento de lesiones y enfermedades óseas, actuando como vehículos transportadores de fármacos, como materiales de contraste en la obtención de imágenes médicas y biológicas, o en el recubrimiento de superficies de implantes, o como material de refuerzo en composites poliméricos (**Figura 1.2**).¹¹



Figura 1.2. Diagrama esquemático de las aplicaciones del Ap biomimético. La autoría de la imagen pertenece a Yotsova *et al.*¹¹

1.1.2.1. Aplicaciones del apatito

1.1.2.1.1. Nanosondas para imagen de contraste

Debido a la excepcional reactividad del Ap su tamaño nanométrico, estas nanopartículas presentan gran potencial en aplicaciones de bioimagen actuando nanosondas. En particular, el uso de Ap dopados con iones lantánidos, como el europio (Eu) o el terbio (Tb) permite la mejora del contraste de imagen mediante luminiscencia.¹²⁻¹⁴ Los sistemas basados en iones lantánidos presentan algunas ventajas sobre otros materiales luminiscentes, ya que no presentan problemas asociados al fotoblanqueo (a diferencia de las tintas orgánicas como la fluoresceína, la proteína fluorescente verde o la rodamina), ni efectos de fotoparpadeo como ocurre en los *quantum dots*. Al igual que estos últimos, los iones lantánidos permiten seleccionar diferentes colores de luminiscencia variando el elemento dopante, por ejemplo, verde para el Tb³⁺ y rojo para el Eu³⁺. Además, los iones lantánidos presentan un espectro de fluorescencia con bandas de emisión estrechas, una alta estabilidad fotoquímica y un tiempo de vida media de la luminiscencia suficientemente largo, todo ello sumado a la posibilidad de excitar las nanopartículas con longitudes de onda de baja energía, lo que permite su uso en el estudio de tejidos y células sin afectarlos.^{13,15,16}

Para el desempeño de estas funciones, el desarrollo de nAp con un tamaño medio inferior a 100 nm es por lo general un requisito, ya que permite la internalización celular, aumenta el tiempo de circulación en la sangre y evita efectos secundarios perjudiciales debido a la inoculación sistémica. Diversos estudios han reportado la preparación de suspensiones coloidales de nAp dopados con elementos luminiscentes, formadas por nanopartículas de tamaños promedio en el rango de 30 a 100 nm. Las nanopartículas presentaban un tiempo de vida de luminiscencia alto y una intensidad de luminiscencia mayor comparada con la autofluorescencia intrínseca de los tejidos biológicos (**Figura 1.3**).¹⁷ También se han reportado datos de luminiscencia utilizando nAp funcionalizadas con moléculas fluorescentes típicas. Por ejemplo, se lograron observaciones en el espectro infrarrojo cercano utilizando nAp dopadas con el verde de indocianina.¹⁸ En este caso, los autores informaron que las partículas podían acumularse en tumores de adenocarcinoma de mama en un modelo de ratón, demostrando así las prometedoras aplicaciones de estas nanopartículas en el campo de la imagen de contraste.

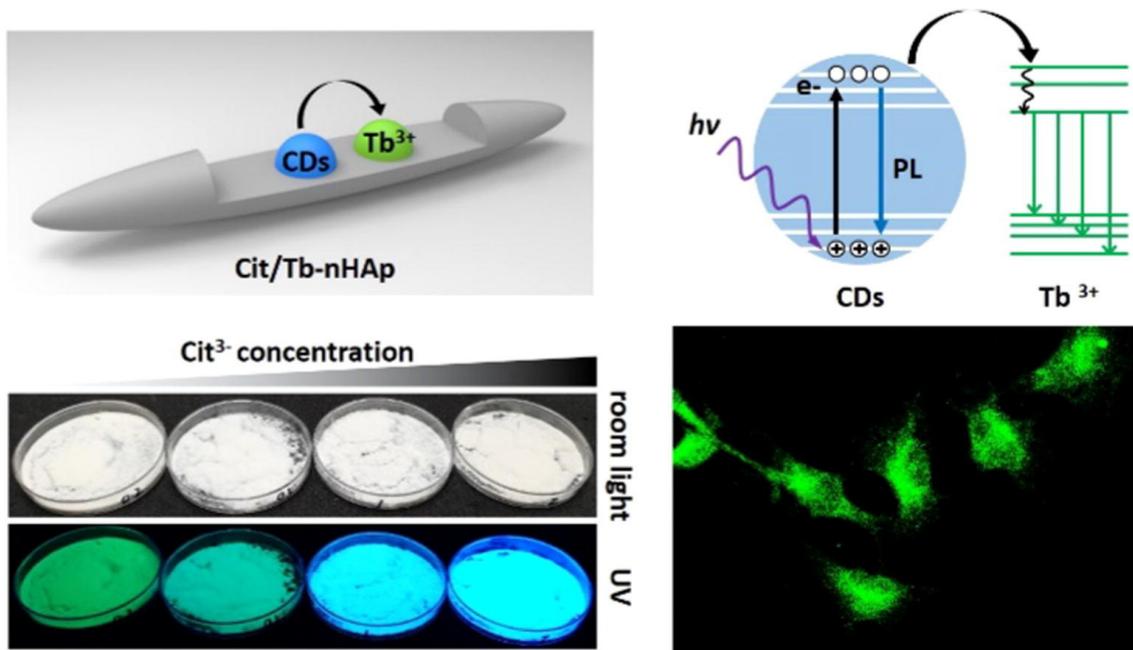


Figura 1.3. Nanopartículas de HA dopadas con citrato y Tb^{3+} e imágenes de sus propiedades luminiscentes macroscópicas y microscópicas testadas *in vitro*. La autoría de la imagen pertenece a Wang *et al.*¹⁷

1.1.2.1.2. Administración de fármacos

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las nAp pueden utilizarse para el transporte de numerosas moléculas con actividad biológica, incluyendo proteínas, aminoácidos, antibióticos, factores de crecimiento, moléculas luminiscentes, fluorescentes y por supuesto, una amplia variedad de fármacos.¹⁹⁻²³ Como transportadores de fármacos, los nAp presentan una serie de ventajas como son su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad; son más solubles y menos tóxicas que la sílice, los *quantum-dots*, los nanotubos de carbono o las partículas magnéticas; son más estables y robustas que los liposomas, lo que los predispone para una entrega de medicamentos más controlada y fiable; pueden contener mayores cantidades de fármacos debido a su elevada área superficial; la solubilidad de las nAp es mayor en medios ácidos, típicamente encontrados en endolisosomas, tumores y ciertas patologías, lo que permite una entrega de fármacos específica y pH-dependiente; son capaces de permeabilizar la membrana celular y penetrar en las células.²⁴⁻²⁷ Otra ventaja importante es el bajo coste de su producción y su excelente capacidad de almacenamiento (no sujetos a degradación microbiana). A diferencia de la mayoría de nanopartículas cerámicas, los nAp pueden prepararse *in situ*, en condiciones ambientales, y con una amplia variedad de morfologías (esferas, placas, varillas, fibras) y composiciones.

Por lo general, las moléculas cargadas negativamente tienden a unirse a los lugares donde se disponen los iones Ca^{2+} , mientras que aquellas moléculas cargadas positivamente a los sitios de PO_4^- . Además, los fármacos también pueden interactuar con las nAp mediante fenómenos de adsorción superficial, sin embargo, se debe tener en cuenta que los fenómenos de adsorción y liberación están afectados en gran medida, no solo por las propiedades químicas de la molécula, sino también por las características químicas y estructurales del Ap.²⁸⁻³⁰ Por ejemplo, la tasa de liberación del cisplatino (fármaco anticancerígeno) puede ser controlada mediante el uso de nAp con diferente grado de cristalinidad, de forma que, un mayor grado de cristalinidad induce una liberación rápida, mientras que menor grado de cristalinidad, conduce a una tasa de liberación más lenta.³¹

1.1.2.1.3. Recubrimiento y funcionalización de superficies

Los tejidos duros en general, y el hueso en particular, presentan excelentes propiedades mecánicas lo que les permite estar constantemente sometidos a altas tensiones y esfuerzos. Tal y como conocemos, el Ap es un material que puede integrarse en tejidos vivos ya que sufre procesos de remodelación ósea y apoya la adherencia, integración y proliferación de células de la matriz ósea. Aun así, el Ap por sí solo, presenta graves limitaciones como biomaterial de carga, ya que se trata de un material frágil y poco resistente. Estas deficiencias se acentúan aún más en materiales con altos grados de porosidad, lo cual es un requisito imprescindible para que se produzca una adecuada vascularización y migración celular.

Una de las principales estrategias para solventar este problema es el uso del Ap como recubrimiento de superficies. En este procedimiento, se crea un material híbrido, denominado composite, que combina las propiedades biológicas del Ap y las propiedades mecánicas de un material de refuerzo. Los recubrimientos de implantes ortopédicos y dentales con Ap fueron introducidos por Degroot y Geesink en 1987 y, desde entonces, se han publicado numerosos trabajos sobre las propiedades osteoconductoras de estos recubrimientos (la osteoconducción se refiere a la capacidad de un biomaterial para soportar el crecimiento de células óseas sobre su superficie).^{32,33} Entre los materiales de refuerzo, el titanio es el material líder en el campo de la cirugía ortopédica y dental, ofreciendo una solución fiable y duradera para restaurar la función y la movilidad.^{34,35} Sus principales ventajas se centran en la excepcional resistencia mecánica, así como su flexibilidad y resistencia a la corrosión que permiten que los implantes se ajusten

cómodamente a la anatomía del paciente, minimizando el riesgo de fracturas y proporcionando estabilidad a largo plazo.³⁶⁻³⁹ El Ap depositado sobre la superficie del titanio induce un mayor contacto hueso-implante, mejorando la fijación y facilitando el puentado de pequeñas brechas. En este proceso, la formación ósea es bidireccional, ya que ocurre tanto desde el tejido circundante como desde la superficie del implante.^{40,41}

Además del titanio, los polímeros naturales han sido ampliamente investigados para su uso como material de refuerzo. Entre ellos destacan el colágeno, la celulosa, alginato y quitosano. Estudios de síntesis de composites nAp/Colágeno e HA/Colágeno demostraron una excelente capacidad para el tratamiento de defectos óseos, con excelentes resultados de vascularización, deposición mineral y proliferación celular.⁴²⁻⁴⁴ Sin embargo, también revelaron las pobres propiedades mecánicas de los polímeros naturales, lo cual lleva a la necesidad de introducir otros componentes en la formulación como pueden ser celulosa bacteriana, iones metálicos, G, GO, o CNT que permitan reforzar la estructura del composite (**Figura 1.4**).⁴⁵

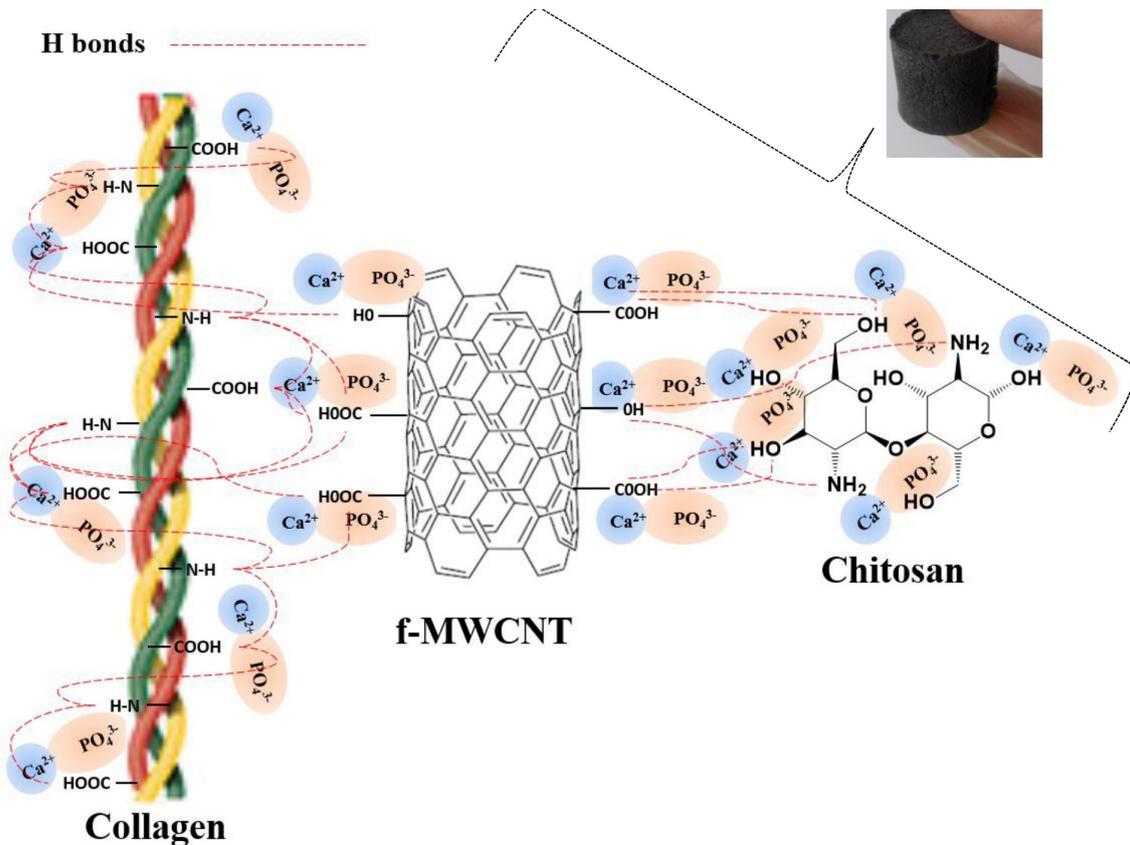


Figura 1.4. Nucleación de iones calcio y fosfato para la precipitación de HA, mediante un método biomimético sobre andamios porosos 3D de colágeno/CNT de paredes múltiples funcionalizado/quitosano/hidroxiapatito. La autoría de la imagen pertenece a Türk *et al.*⁴⁵

La escasez de polímeros naturales que puedan ser utilizados para estas aplicaciones, ha llevado a la preparación de polímeros sintéticos como son el ácido poliláctico (PLA), poli-lactico-co-glicólico, polietilén glicol o policaprolactona. Este tipo de polímeros suelen presentar propiedades mecánicas excepcionales, sin embargo, el origen sintético de los mismos merma gravemente sus propiedades biológicas, por lo que la combinación con CaPs es un paso fundamental para su viabilidad en aplicaciones de ingeniería tisular. Un claro ejemplo del potencial de estos materiales multicomponente es el uso de andamios 3D de HA/PLA como biorreactor de implantación ósea; el estudio demuestra la formación de tejido óseo específico y vascularizado gracias a la incorporación de células madre de la médula ósea en el compuesto, con posterior diferenciación, expresión de genes relacionados con la regeneración ósea, neovascularización y formación de tejido óseo.⁴⁶⁻⁴⁸

Por otro lado, gran cantidad de investigaciones se han centrado en el uso de materiales derivados del grafeno como materiales de refuerzo para la generación de composites de tamaño nano y micrométrico. El grafeno, es un material disruptivo, formado por una única lámina de átomos de carbono, siendo considerado "la madre de todas las formas gráficas del carbono".⁴⁹ Los átomos de carbono están unidos por solapamiento y enlaces híbridos sp^2 de alta estabilidad que son la clave de sus excepcionales características: masa efectiva cero, excelente conductividad térmica, rigidez extrema, tenacidad a la fractura, impermeabilidad a los gases, alta movilidad eléctrica y transparencia óptica. Además, los materiales derivados del grafeno, como los fullerenos, el GO o los CNTs, permiten ampliar en gran medida el número de composites y sus aplicaciones.^{50,51}

Sin embargo, la obtención de grafeno y sus derivados es una tarea realmente compleja que conlleva reactivos costosos, uso de solventes orgánicos y rendimientos de reacción muy bajos. Por este motivo, la forma más común de utilizar estos materiales, es el uso de grafeno multicapa (G) exfoliado a partir del grafito, lo que alivia los costes y tiempos de síntesis del material. Algunos estudios reportan como la formación de composites de G/HA y GO/HA permiten mantener intacta la estructura laminar de estos materiales, mientras se incrementa hasta un 80% la resistencia a la fractura del Ap depositado.^{52,53}

1.1.2.2. Métodos para la síntesis de apatito

Dorozhkin⁷ realizó una profunda revisión sobre las metodologías más empleadas para la síntesis de Ap. Todas estas técnicas tienen una serie de características que se deben tener en cuenta, ya que determinarán la formación de Ap con tamaños de partícula, morfologías y propiedades diferentes. De forma general, las técnicas de cristalización de Ap se pueden resumir en: precipitación química en medio acuoso,^{54,55} síntesis sol-gel.⁵⁶ coprecipitación,⁵⁷ síntesis hidrotermal,^{58,59} precipitación rápida o continua a partir de una solución,⁶⁰ síntesis mecánico-química,^{61,62} difusión de vapor⁶³⁻⁶⁵ y electrospray^{66,67} entre otras.

En función del control de la estructura y la morfología del Ap, los métodos de cristalización se pueden dividir en métodos de alta y baja temperatura.

La síntesis a alta temperatura generalmente implica la homogenización de los materiales precursores, como el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y $\text{Ca}(\text{OH})_2$, y su tratamiento (calcinación) a temperaturas cercanas a 1000 °C. La ventaja en este tipo de metodologías, es la posibilidad de establecer la estequiometría final del producto, mientras que los largos tiempos de procesamiento, las altas cantidades de energía requeridas y la dificultad para producir cristales uniformes y nanométricos son sus mayores desventajas. Al emplear este método, la relación Ca/P es un parámetro crucial; de hecho, si la relación molar inicial de Ca/P no está bien ajustada a 1.67, podrían aparecer otras fases como el β -TCP o CaO.⁶⁸

Los métodos de síntesis a menor temperatura, implican la precipitación del Ap desde una solución. Estas metodologías sí que permiten producir cristales nanométricos, aunque también suelen aparecer fases transitorias y metaestables en el producto final. Uno de los modelos más aceptados para explicar la precipitación de los diferentes CaPs es el modelo de Ostwald-Lussac, que predice una mayor tasa de nucleación para la fase menos estable. Este modelo define que un ACP será la primera fase en precipitar, seguida de la transformación a OCP y luego a HA y Ap, por lo que en este tipo de metodologías se requieren largos periodos de síntesis para obtener una fase apatítica estable y madura. El producto de estas reacciones suele ser Ap con un marcado carácter biomimético, presentando baja cristalinidad, desorden iónico en la superficie y desajuste estequiométrico.^{69,70} Además, el hecho de realizar síntesis en solución, permite introducir nuevos parámetros en la formulación para modificar las propiedades del Ap. Un ejemplo

claro es el estudio de Delgado-López *et al.* En el que se han preparado nAp funcionalizadas con citrato con longitudes medias que van de 20 a 100 nm mediante un método de descomplejación térmica (**Figura 1.5**).⁷¹ Este método de cristalización consiste en la descomplejación térmica de soluciones metaestables de calcio/citrato/fosfato/carbonato que origina una liberación gradual y homogénea de iones Ca^{2+} en la solución, lo que produce la precipitación de nAp. Además, se demostró que el tiempo de maduración del Ap y la presencia de aditivos como grupos carbonatos y citrato en la solución desempeñan un papel fundamental en las propiedades fisicoquímicas y morfológicas del Ap.

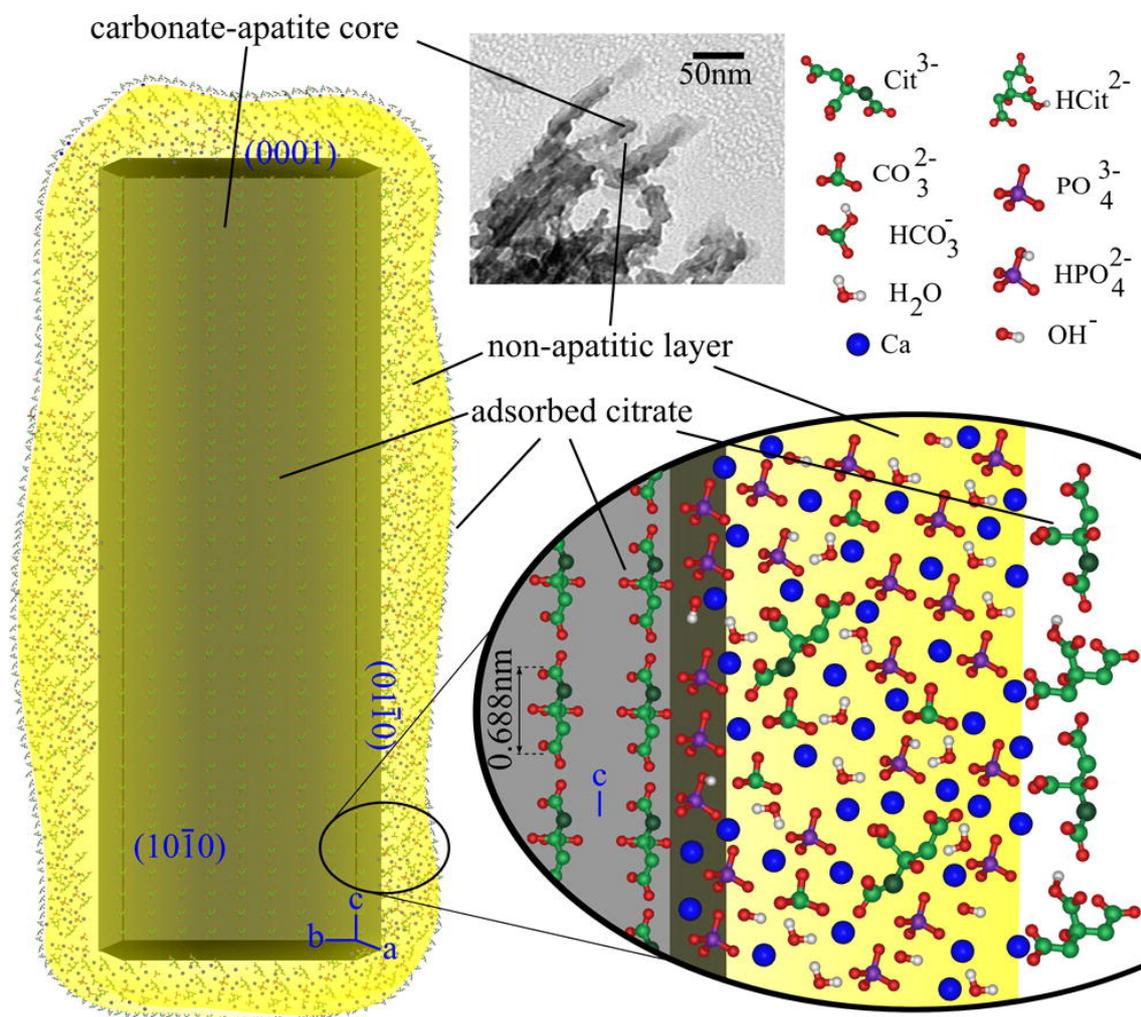


Figura 1.5. nAp biomiméticas obtenidas mediante descomplejación térmica de soluciones de calcio/citrato/fosfato/carbonato. La autoría de la imagen pertenece a Delgado *et al.*⁷¹

Las metodologías de síntesis descritas hasta el momento, dan lugar a nAp con propiedades personalizadas. Sin embargo, cuando el objetivo es la deposición de Ap para la funcionalización de materiales, el mayor problema que se presenta es la fuerza de unión entre el revestimiento de Ap y la superficie. En esta situación, las metodologías empleadas deben asegurar una unión firme y duradera entre ambas fases.

Hasta la fecha, el método más exitoso para aplicar revestimientos de CaPs, sobre implantes de titanio principalmente, ha sido la técnica de proyección por plasma (**Figura 1.6**),^{72,73} debido a su alta tasa de deposición y su capacidad para recubrir grandes superficies. En esta metodología se hace pasar un gas inerte a través de un arco eléctrico de alta energía creado entre cátodo y un ánodo. De este modo la corriente eléctrica ioniza el gas formando un plasma. En este plasma de alta temperatura, se adicionan las partículas de CaPs que se funden y son dirigidas hacia el sustrato a mineralizar.⁷⁴ La temperatura del plasma, la naturaleza del gas, el tamaño de partícula y la naturaleza química del polvo cerámico son parámetros fundamentales que tendrán un impacto en la calidad del recubrimiento. La principal desventaja de esta técnica es que el mineral depositado es muy diferente al Ap biológico, debido a cambios y morfologías inducidas por la acción del plasma.⁷⁵

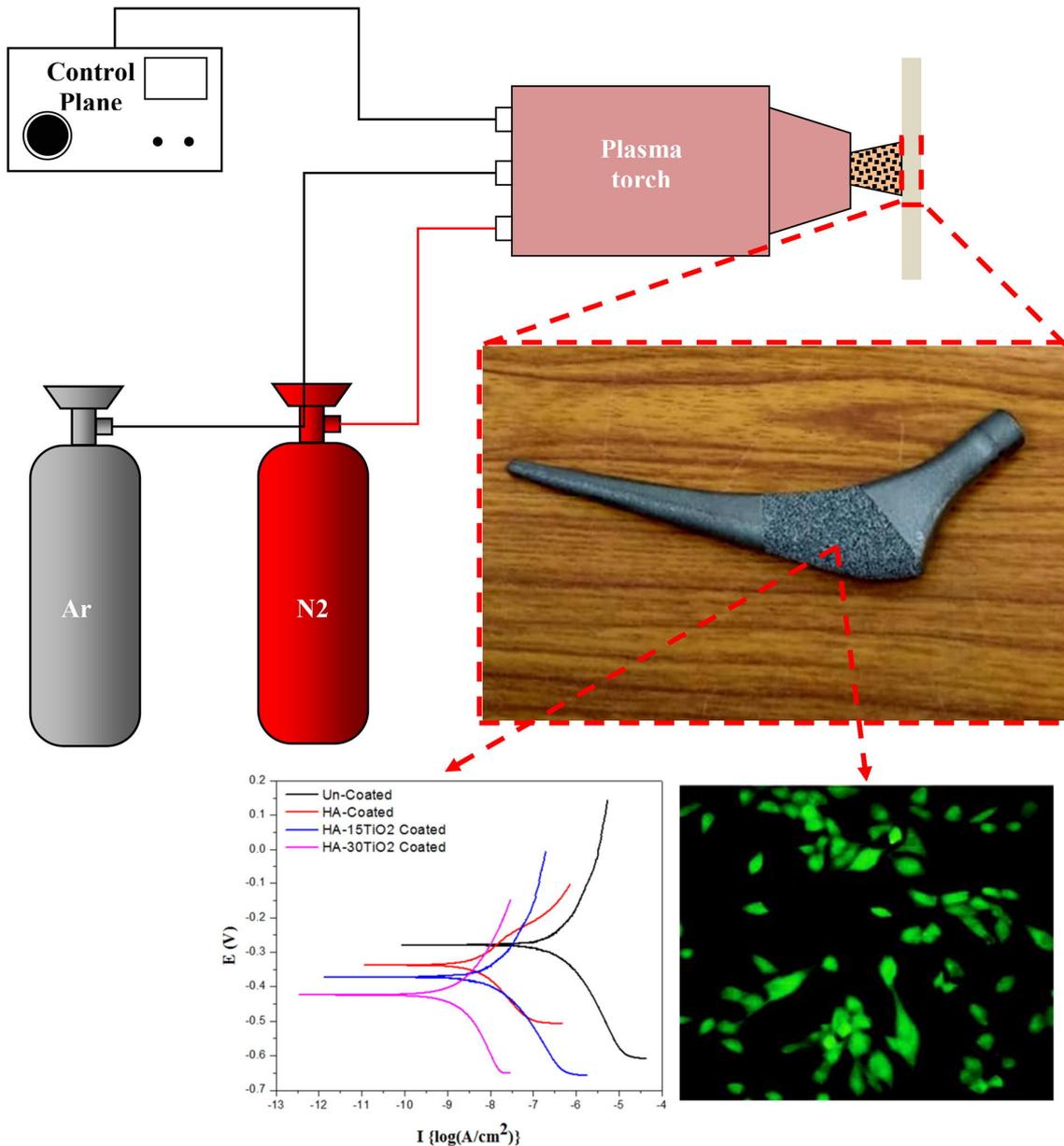


Figura 1.6. Recubrimiento de HA de una prótesis de titanio mediante deposición por proyección de plasma. La autoría de la imagen pertenece a Singh *et al.*⁷³

Existen otro tipo de enfoques más novedosos que buscan obtener un recubrimiento con propiedades biomiméticas.^{76,77} Estas técnicas se basan en la precipitación heterogénea del Ap, ya sea a partir de una solución que simula el fluido corporal, o mediante técnicas de síntesis hidrotermal. La desventaja es que se requieren superficies funcionalizadas capaces de inducir la nucleación del Ap, así como elevados tiempos de maduración. Lie *et al.* utilizaron dopamina para funcionalizar GO reducido antes de la mineralización con HA para generar composites con excelentes propiedades biológicas y mecánicas.⁷⁸ Otro estudio sobre la precipitación química *in situ* de Ap sobre

GO, ha demostrado que la formación de nanocomposites permite mejorar las propiedades mecánicas del Ap, siendo estos aplicables para el recubrimiento de implantes y prótesis, lo que a su vez mejora las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión del implante (Figura 1.7).⁷⁹

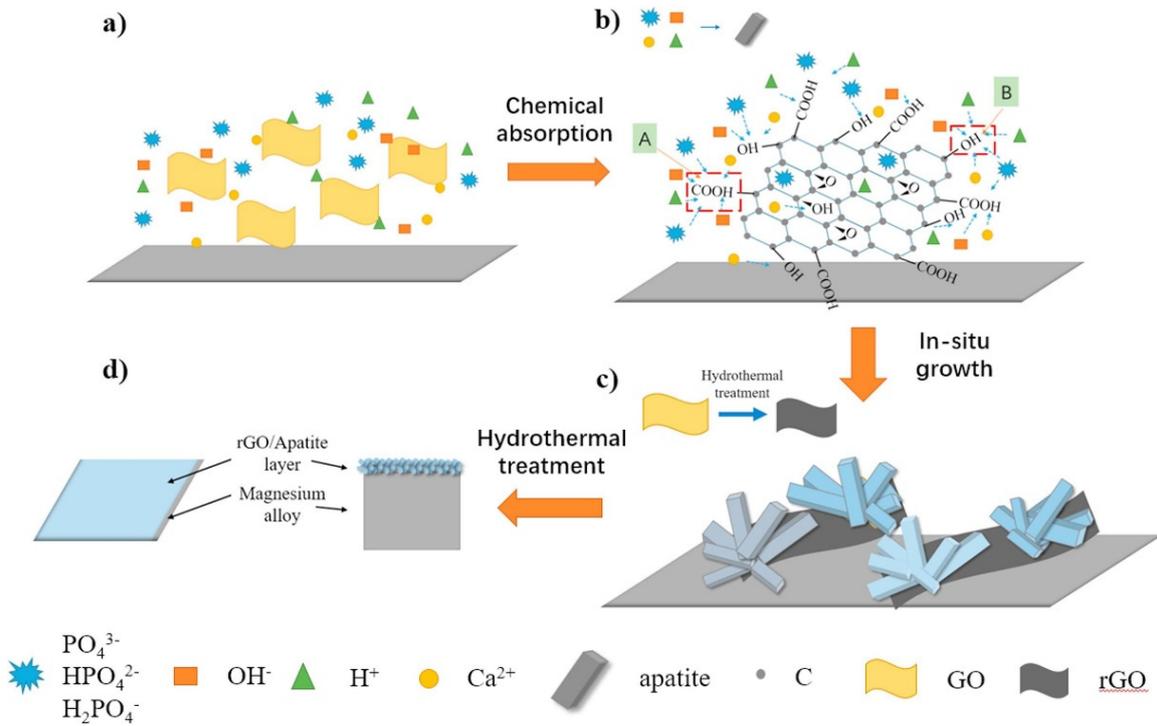


Figura 1.7. Etapas del procedimiento para la deposición *in situ* de Ap sobre superficies de GO. (a,b) Funcionalización de la superficies de GO, (c) Crecimiento *in situ* de Ap nanocristalino sobre GO, (d) Tratamiento hidrotérmico para la deposición del composite sobre implantes metálicos. La autoría de la imagen pertenece a Wu *et al.*⁷⁹

Un paso más en este tipo de metodologías es la precipitación de Ap inducida por difusión de vapor, una metodología desarrollada por Gómez-Morales *et al.* para preparar nAp con propiedades biomiméticas usando cristalizadores en gota denominados “setas de cristalización”.⁸⁰ En este caso, una solución de NH_4HCO_3 se descompone en NH_3 y CO_2 . Estos gases difunden a través de gotas de solución de composición $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ más $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ presentes en la cámara de cristalización, elevando el pH. Ello provoca la liberación de iones Ca^{2+} a partir de los complejos $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})^-$ y produce la nucleación del apatito. Diferentes estudios se han llevado a cabo con esta metodología, demostrando la precipitación de nAp con propiedades biomiméticas.

Es importante no comparar directamente las propiedades y rendimientos de las técnicas de síntesis de Ap, ya que, clínicamente, cada aplicación demanda unos requisitos específicos. En este sentido, se debe elegir la técnica más apropiada para generar el Ap con las características necesarias para cumplir el objetivo marcado.

1.1.3. Reparación de tejidos óseos

Los procesos de regeneración ósea están íntimamente relacionados con el sistema inmunitario innato, y van asociados a una respuesta inflamatoria aguda. Cuando se produce un estímulo lesivo, el sistema inmunitario innato se activa para restablecer el equilibrio interno del cuerpo.^{81,82} En este ejercicio, las células locales y circulantes, especialmente de la línea mononuclear/macrófago, actúan como guardianes celulares que detectan y responden de manera inmediata para atenuar el daño. Una vez eliminados los estímulos adversos (como puede ser el caso de una infección), los macrófagos sufren un proceso de polarización en el que se transforman a un fenotipo celular pro-cicatrizante. Mediante la liberación de citoquinas, quimiocinas y otros factores que promueven la angiogénesis y el reclutamiento de células madre mesenquimales y osteoblastos, los macrófagos regularán la respuesta inflamatoria y liderarán la regeneración del tejido. Este proceso es tan complejo, que, a pesar de las décadas de estudio, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos y relaciones que existen entre las células involucradas en el proceso inflamatorio y las células del tejido óseo.⁸³⁻⁸⁵ La **figura 1.8** es una representación esquemática de las relaciones conocidas entre estos sistemas.

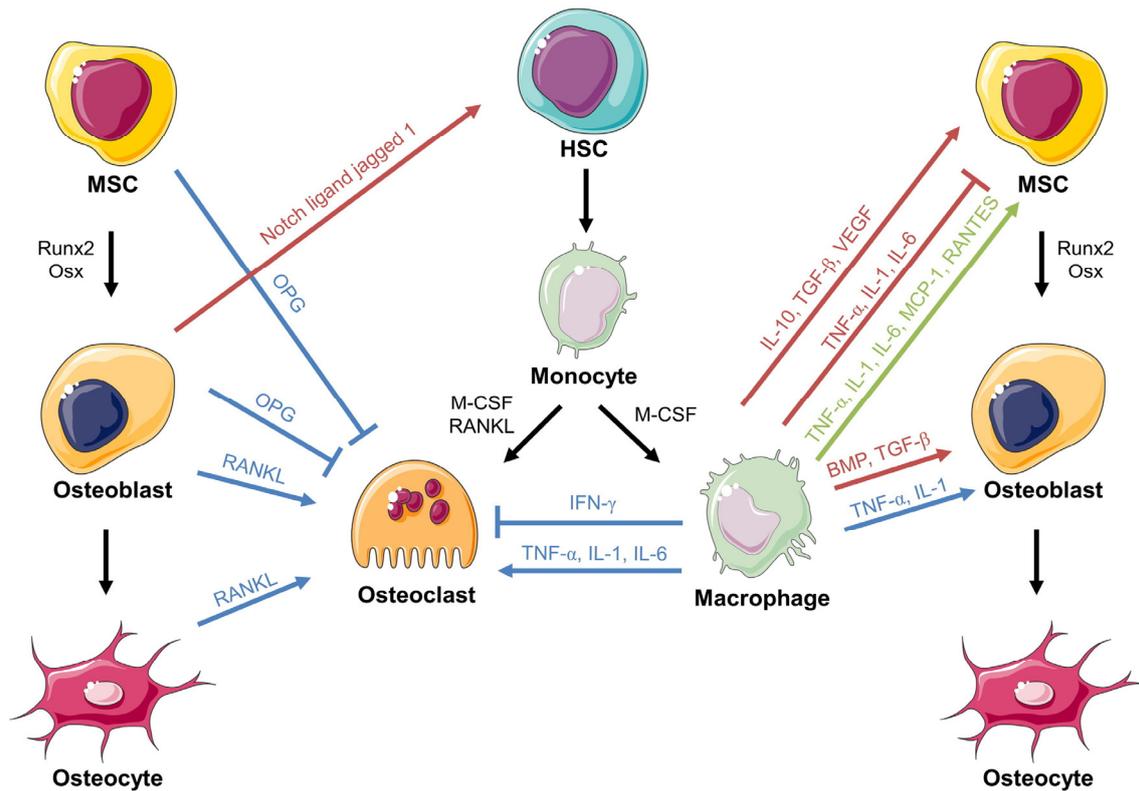


Figura 1.8. Relaciones entre las células inflamatorias y óseas. La autoría de la imagen pertenece a Loi *et al.*⁸²

1.1.3.1. Etapas de la regeneración ósea

El proceso de regeneración ósea se produce en múltiples etapas de respuesta escalonada, cuyo objetivo es un aumento gradual en la estabilidad mecánica del lugar afectado que se logra reemplazando progresivamente los tejidos frágiles y provisionales con otros más estables y duraderos, alcanzando un punto en el que se permite la vascularización y la mineralización.^{86,87}

Las primeras etapas en la regeneración de fracturas son la formación de un hematoma seguida por una inflamación aguda, debido a la interrupción de la vascularización local.⁸⁸ Tanto el hematoma inicial de la fractura como la reacción inflamatoria aguda subsiguiente, son críticos para la curación de la fractura.^{89,90} Los neutrófilos (primeras células proinflamatorias en aparecer) secretan mediadores inflamatorios y quimiotácticos, como IL-6 y CCL2, que reclutan la segunda oleada celular, monocitos y macrófagos. Los macrófagos eliminan la matriz de fibrina provisional y las células necróticas mediante fagocitosis, mientras que los osteoclastos derivados de los monocitos resorben fragmentos óseos necróticos del hueso fracturado.

Además de eliminar los desechos celulares de la matriz extracelular, los macrófagos secretan un repertorio de mediadores inflamatorios y quimiotácticos, como el factor de necrosis tumoral alfa, IL-1 β , IL-6 y CCL2, que inician el reclutamiento de fibroblastos, células madre mesenquimales y células osteoprogenitoras que liderarán la diferenciación celular y la producción de matriz extracelular. Además de estas citoquinas también se producen diferentes factores de crecimiento que estimulan la formación de endotelio vascular y la reabsorción plaquetaria del hematoma inicial. Como resultado, el hematoma inicial de la fractura y la reacción inflamatoria aguda desaparecen en torno a una semana después de la fractura y son reemplazados por tejido granulado rico en células mesenquimales proliferativas y neovasos sanguíneos incrustados en una matriz de colágeno desorganizada.^{88,91}

Debido a la poca vascularización, el tejido local es hipóxico. La baja presión de oxígeno y otras señales microambientales derivadas de los macrófagos, promueven la diferenciación de células madre mesenquimales a condrocitos. Los condrocitos producen cartílago que finalmente se extiende por toda la brecha de la fractura conectando los extremos del hueso fracturado varias semanas después de la lesión. Este tejido cartilaginoso es comúnmente conocido como callo blando y proporciona estabilidad mecánica inicial para la fractura, además de servir como soporte la posterior formación ósea. Al mismo tiempo que se desarrolla el callo blando, en las áreas circundantes que tienen mejor suministro sanguíneo y mayor estabilidad mecánica, avanza la formación ósea. Típicamente, esta formación ósea comienza en la capa interna del periostio a cierta distancia del sitio de la lesión, avanzando progresivamente hacia la fractura. En estas etapas, se observa un aumento del flujo sanguíneo en las zonas de la lesión, acompañado de la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos y la deposición de hueso sobre el callo. Esta etapa de curación de fracturas comúnmente se conoce como la formación de callo duro.^{92,93}

A medida que avanza el proceso de mineralización del cartílago, la estabilidad mecánica del sitio de la fractura aumenta, alcanzando finalmente la estabilidad suficiente para soportar cargas fisiológicas de manera independiente; típicamente, esta etapa se alcanza varias semanas o meses después de la lesión. Finalmente, tanto el tejido óseo inmaduro como la matriz de cartílago subyacente son eliminados por los osteoclastos, iniciando el proceso de remodelación que restablece la estructura ósea típica y

jerarquizada ya explicada en apartados anteriores.^{87,92} Este proceso queda esquematizado y resumido en la **figura 1.9**.⁹⁰

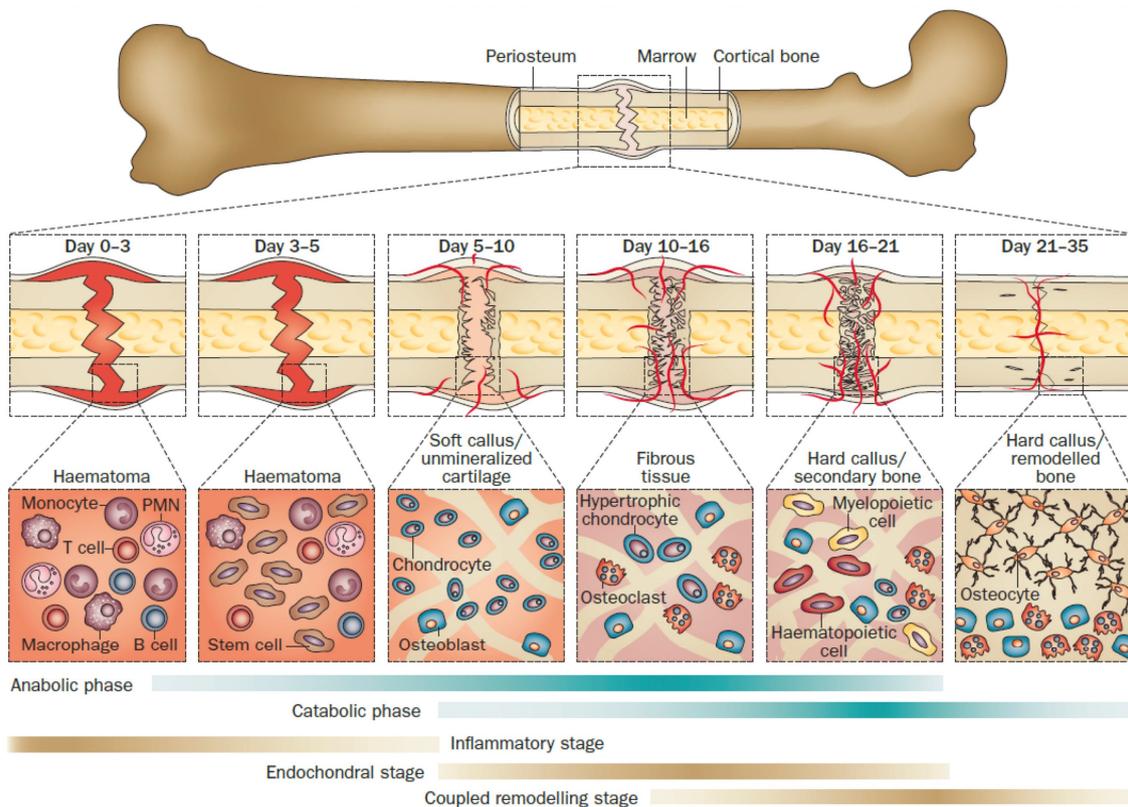


Figura 1.9. Etapas del proceso de regeneración ósea en fracturas típicas. La autoría de la imagen pertenece a Einhorn *et al.*⁹⁰

1.1.3.2. Problemas asociados a la inflamación

El proceso de regeneración ósea puede fracasar bajo condiciones adversas, lo que resulta en una dolorosa falta de unión o pseudoartrosis. Tal y como se ha descrito, la inflamación es un proceso crucial para la eliminación de patógenos y el mantenimiento de la homeostasis.⁹⁴ El problema surge cuando los estímulos proinflamatorios persisten, dando lugar a un estado de inflamación crónica. Esta respuesta inflamatoria, destaca por la secreción continua de citoquinas y otros factores que promueven la destrucción del tejido en formación y una homeostasis alterada, perjudicando al proceso de cicatrización. Aunque el procedimiento de regeneración ósea ha sido explicado en base a una fractura, estos problemas se presentan en todo tipo de enfermedades óseas que acarrear un proceso inflamatorio, como son la osteoartritis, el osteosarcomas y los defectos óseos.⁹⁴

1.1.4. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

1.1.4.1. Descripción y clasificación

Desde el descubrimiento de la aspirina (ácido acetilsalicílico) por Felix Hoffmann en 1897, los AINEs han gozado de un gran éxito en la industria farmacéutica,⁹⁵ llegando a representar actualmente el 5% de todos los medicamentos recetados.⁹⁶ Un AINE típico consiste en un anillo aromático unido a grupo funcional ácido (ácido carboxílico, enol). A partir de esta forma básica, derivan el resto de AINEs, los cuales pueden clasificarse según su estructura en, salicilatos (derivados del ácido salicílico), derivados de ácidos arílicos y heteroarílicos, derivados de ácidos acéticos de indol/indeno, antranílicos y oxicams (ácidos enólicos) (**Figura 1.10**).⁹⁷

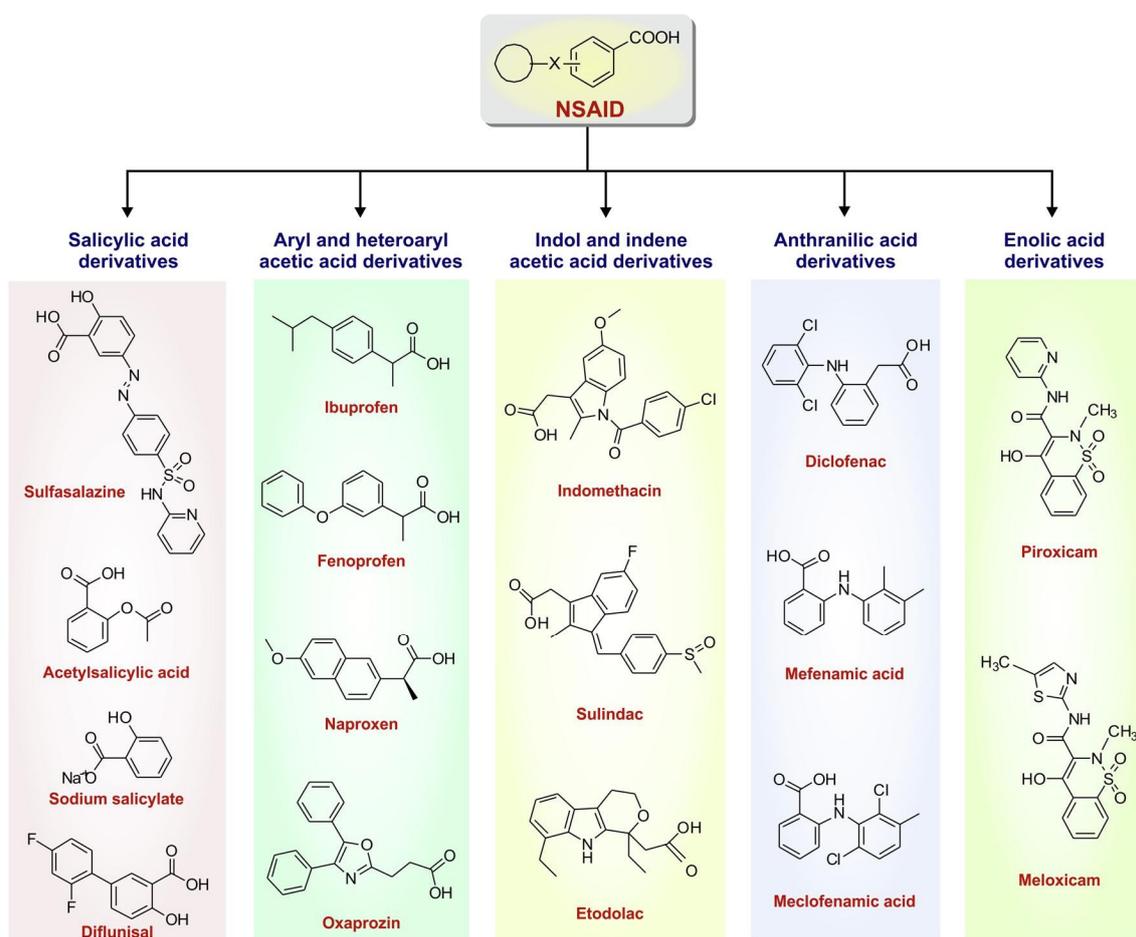


Figura 1.10. Clasificación de los AINEs en función de su estructura molecular y ejemplos de cada categoría. La autoría de la imagen pertenece a Bindu *et al.*⁹⁷

Los AINEs se utilizan principalmente para el tratamiento de dolor y afecciones inflamatorias como los traumatismos, la osteoartritis, la artritis reumatoide y las condiciones quirúrgicas postoperatorias. El mecanismo de acción general de estos

fármacos se centra en la inhibición de las enzimas reguladoras PGHS-1 y PGHS-2 involucradas en la biosíntesis de prostaglandinas, moléculas fundamentales para el desarrollo de los procesos inflamatorios.^{98,99} Por otro lado, los AINEs también son ampliamente utilizados como analgésicos y antipiréticos, sustituyendo a fármacos opioides y sus derivados que generan graves problemas de adicción.¹⁰⁰ Además, hay estudios que demuestran el potencial de los AINEs en el tratamiento de enfermedades complejas como el Alzheimer (al suprimir la neuroinflamación y la pérdida de memoria) o el cáncer.¹⁰¹⁻¹⁰³

A pesar de su vasta utilidad terapéutica, los AINEs presentan múltiples efectos secundarios derivados de una alta dosis o el uso prolongado en enfermedades crónicas. La toxicidad gastrointestinal, el riesgo cardiovascular, lesiones renales y hepatotoxicidad, así como la hipertensión y otros trastornos menores son los principales efectos secundarios de estos fármacos.^{104,105} Al igual que la mayoría de fármacos en desarrollo, los AINEs pertenecen a la clase II del sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) (**Figura 1.11**), caracterizada por una baja solubilidad y una alta permeabilidad. Sin embargo, la solubilidad es una propiedad esencial que controla la biodisponibilidad y, en última instancia, el efecto terapéutico del fármaco. Una solubilidad deficiente implica el uso de mayores dosis para mantener la concentración plasmática terapéutica, lo que se asocia con una mayor probabilidad de sufrir efectos secundarios, por lo general dosis-dependientes.^{106,107}

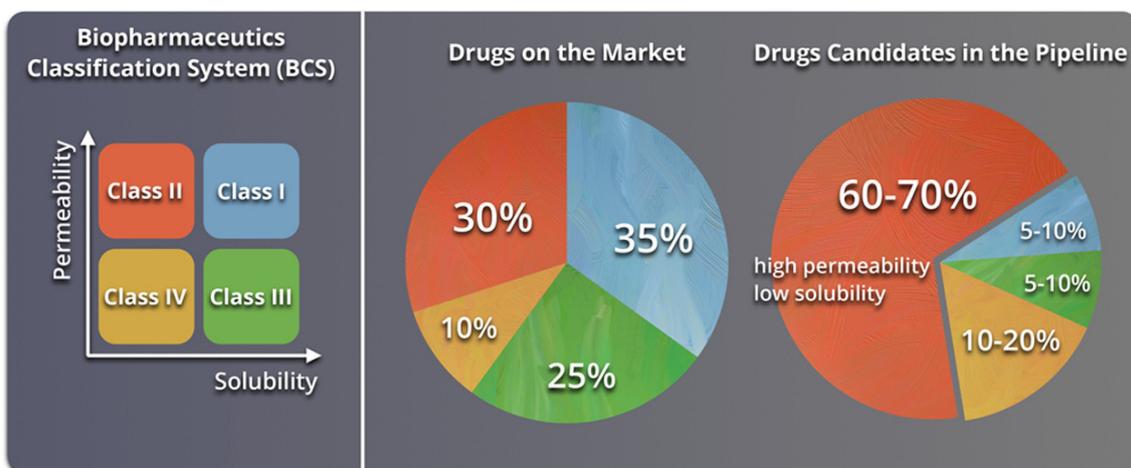


Figura 1.11. Sistema de clasificación biofarmacéutica y porcentaje de fármacos comercializados o en desarrollo que pertenece a cada clase. La autoría de la imagen pertenece a Ting *et al.*¹⁰⁷

1.1.4.2. Estrategias para la mejora de las propiedades de fármacos

La solubilidad es uno de los pilares fundamentales que permiten el uso y el desarrollo de la actividad terapéutica de los fármacos administrados por vía oral. Por ello la mejora de esta propiedad es una de las grandes áreas de investigación durante el desarrollo de nuevos medicamentos. Como se observa en la **figura 11**, más del 60% de los candidatos a fármaco presentan una solubilidad deficiente, lo cual limita su avance en las diferentes etapas antes de alcanzar el mercado. Para superar esta limitación, existen esfuerzos encaminados en el estudio y desarrollo de estrategias que permitan mejorar y modular las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, entre ellas su solubilidad. La **tabla 1.2** recoge las principales estrategias utilizadas para este fin, así como sus ventajas y desventajas.^{108,109}

Tabla 1.2. Principales estrategias para la modulación de las propiedades de fármacos.¹⁰⁹

Tipo	Ventajas	Desventajas
MMF – Sales – Cocristales	Aumenta la solubilidad y la velocidad de disolución del fármaco. Facilidad de síntesis y bajo costo de los materiales crudos. Basados en fármacos ya conocidos.	Inestabilidad de las fases obtenidas, ya sea durante su almacenamiento o en el entorno biológico. La formación de sales está limitada a moléculas con grupos ionizables.
Modificación química	Mejora la solubilidad, la lipofilicidad y la absorción mediada por transportadores.	La modificación covalente de un fármaco implica el estudio completo de la actividad de la nueva molécula. Mayor posibilidad de formación de subproductos y falta de estabilidad química. Disrupción de la cristalinidad y el polimorfismo del estado sólido.
Disminución de tamaño	Reducción de la degradación del fármaco. Factibilidad de formular un fármaco en diferentes formas de dosificación.	Problemas de agregación. Uso excesivo de excipientes y estabilizadores, lo que afecta a la biodisponibilidad del fármaco y su actividad.
Amorfización	Aumenta la solubilidad y la velocidad de disolución Reduce la aglomeración/cristalización.	El fármaco amorfo es poco estable y tiende a recristalizar en una forma cristalina de baja energía. Se requiere miscibilidad entre el fármaco seleccionado y las matrices poliméricas.
Modificación del medio – Ajustes de pH – Co-solventes	Estrategia simple y útil para el ajuste de la solubilidad de fármacos ionizables. La presencia de un co-solvente puede proporcionar solubilización adicional para soluciones de fármacos donde la manipulación del pH no es suficiente.	El efecto a largo plazo en la estabilidad del fármaco. La distorsión del pH fisiológico. La tendencia a la precipitación y la incompatibilidad al diluir. El uso de co-solventes se limita a relativamente pocos disolventes. Existe riesgo de precipitación al diluir. Puede alterar el pH y la fuerza de los amortiguadores que se encuentran en una formulación de fármaco.

Tabla 2 (cont.). Principales estrategias para la modulación de las propiedades de fármacos.¹⁰⁹

Tipo	Ventajas	Desventajas
Transporte de fármacos	Su núcleo hidrofóbico actúa como un reservorio para fármacos lipofílicos.	Desintegración de las micelas debido a su dilución después de la administración oral.
– Micelas	Facilidad de modificación química y capacidad de respuesta a estímulos.	Inestabilidad in vivo por debajo de la concentración micelar crítica.
– Nanopartícula	Aumento de la solubilidad de fármacos lipofílicos, estabilidad mejorada de los fármacos, liberación sostenida de fármacos, protección de la carga del fármaco contra la actividad enzimática, retención prolongada en el tracto gastrointestinal, mejora de la mucoadhesividad, superación de la resistencia a múltiples fármacos, potencial para dirigirse a células específicas.	Baja carga de fármaco.
– Liposomas	No inmunogénico, biocompatible, puede estimular la secreción de sales biliares, fosfolípidos y colesterol, que forman vesículas y micelas que luego facilitan la absorción de fármacos.	Desafíos en la biocompatibilidad y seguridad de los portadores poliméricos.
	Escalable.	Toxicidad como resultado de la alta acumulación tisular de nanopartículas no biodegradables.
		Dificultades para optimizar los parámetros del proceso y para escalar la producción a un producto farmacéutico.
		Baja estabilidad y corta vida útil.

1.1.5. Materiales multicomponente farmacéuticos (MMFs)

1.1.5.1. Definición y clasificación de los MMFs

De las estrategias presentadas, y siguiendo la temática principal de esta tesis doctoral, nos centraremos en el uso de la ingeniería cristalina para la obtención de MMFs, principalmente sales y cocristales, que permitan modular las propiedades de fármacos AINEs. El uso de MMFs es una estrategia con un gran potencial para modificar las propiedades físicas y farmacológicas de un API, lo que los ha llevado a ser ampliamente estudiados en la industria farmacéutica desde principios del siglo XXI. Estos materiales se definen como sólidos cristalinos estequiométricos constituidos por dos o más componentes, de los cuales al menos uno es un API.¹¹⁰⁻¹¹² Los otros componentes, que cocrystalizan en la estructura cristalina, se denominan coformadores (del inglés *coformer* = *cocrystal former*). Las moléculas coformadoras deben tener una seguridad reconocida por agencias reguladoras como la *Food and Drug Administration* (FDA) o la *European Medicines Agency* (EMA).^{113,114} Las interacciones no covalentes que ocurren entre el API y el coformador permiten definir una nueva estructura cristalina que presentará propiedades únicas y diferentes a la de sus componentes, ya sea en términos de solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad, higroscopicidad o punto de fusión, entre otras.

La principal ventaja de estos materiales radica en que los enlaces intermoleculares no modifican covalentemente la estructura química del API, por lo tanto, permiten modular sus propiedades, sin afectar a su actividad farmacológica. Además, estos sólidos son reconocidos como nuevos materiales, por lo que se pueden utilizar para extender la protección intelectual (PI) de fármacos cuya patente haya expirado.^{115,116}

Existen diferentes tipos de MMFs, los cuales se pueden clasificar en sales, cocrystal y solvatos, mientras que la combinación de estos permite desarrollar MMFs de mayor complejidad, tal y como representa la **figura 1.12**.¹¹⁷ El tipo de material, su estructura cristalina y las sus nuevas propiedades, pondrán de manifiesto la mejora o no, de un fármaco concreto.

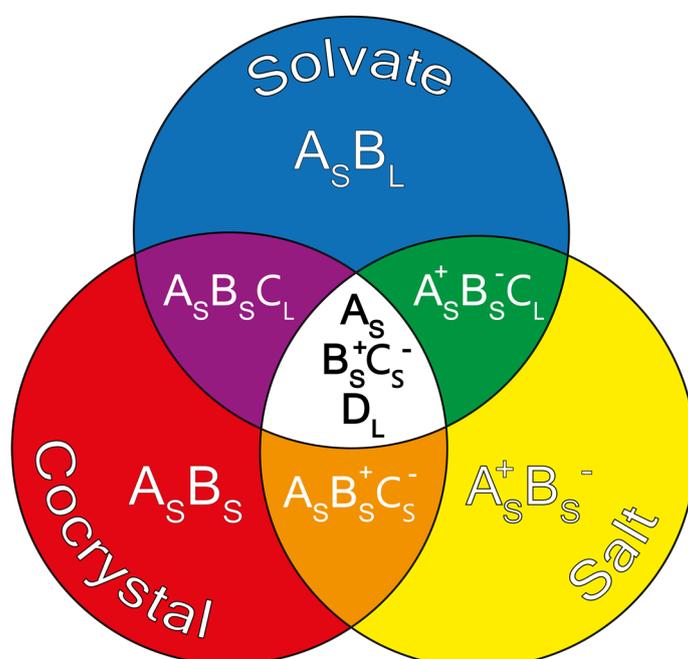


Figura 1.12. Sistema de clasificación de los MMFs (S=sólido, L=Líquido).¹¹⁷

1.1.5.2. Propiedades afectadas por la formación de MMFs

La formación de un MMF resulta en una nueva estructura cristalina completamente diferente e independiente de cualquiera de los materiales de partida, lo que a su vez resulta en un nuevo conjunto de propiedades físico-químicas y farmacéuticas. Predecir dichas propiedades a partir del estudio de la estructura cristalina, es hoy día un reto científico. Sin embargo, esta limitación no influye en la capacidad de los MMFs para modular e incluso mejorar diferentes propiedades de un fármaco.

Hasta la fecha, la utilidad más prolífica de los MMFs ha sido mejorar la solubilidad del API que los compone. Como ya sabemos la baja solubilidad acuosa de los fármacos es un grave inconveniente que, a menudo, impide que se cumpla el propósito farmacéutico. Intrínsecamente, un MMF tendrá una solubilidad diferente a la de sus componentes ya que la estructura cristalina es diferente. Esta diferencia de solubilidad puede ser tanto positiva como negativa. Una solubilidad mejorada, aumentará la biodisponibilidad del medicamento, pero una mejora excesiva también puede ser problemática, ya que puede llevar a soluciones sobresaturadas rápidamente, lo que daría lugar a fenómenos de precipitación. Este tipo de situación es muy común en aquellos materiales cuya solubilidad sigue un comportamiento de tipo *spring-parachute* (**Figura 1.13**),¹¹⁸ caracterizado por una elevada solubilidad inicial, dominada por fenómenos cinéticos, para una posterior estabilización termodinámica, en el valor de solubilidad de equilibrio del API.

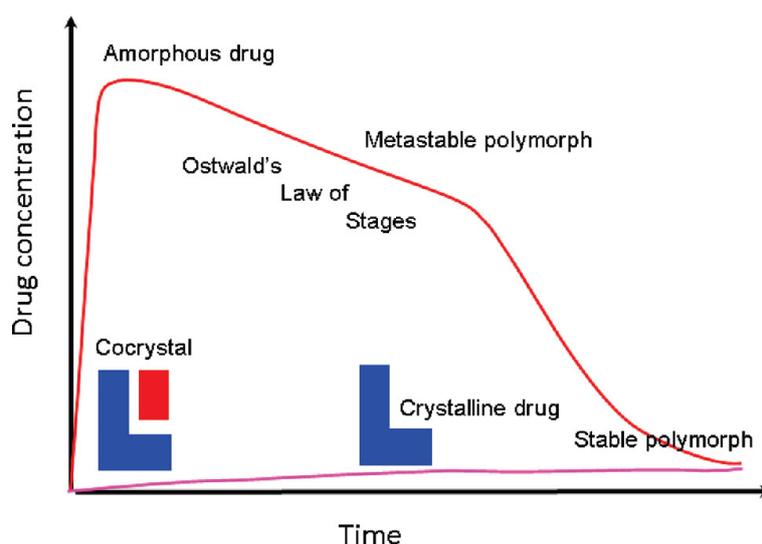


Figura 1.13. Curva de solubilidad en un comportamiento *spring-parachute*. La autoría de la imagen pertenece a Babu *et al.*¹¹⁸

Íntimamente relacionada con la solubilidad, la velocidad de disolución es un parámetro de suma importancia que determina el tiempo necesario para alcanzar la concentración mínima efectiva de un fármaco. Por lo que su estudio determina las rutas de administración, la adsorción y el metabolismo de los fármacos en el organismo.

Existen gran cantidad de ejemplos de sales y cocrisales que alteran la solubilidad y la velocidad de disolución de un API.^{109,118-120} Cocrisales de carbamazepina/ácido cinámico mostraron una mayor velocidad de disolución, solubilidad y estabilidad en agua en comparación con la carbamazepina.¹²¹ Por su parte, Arenas-García *et al.* obtuvieron varios cocrisales de acetazolamida. En este estudio los cocrisales con mayor velocidad de disolución fueron aquellos que mostraron la menor estabilidad, un resultado interesante que indica que la disociación del cocrystal afecta positivamente a la velocidad de liberación de sus componentes.¹²²

Del mismo modo, los cocrisales también tienen el potencial de reducir la velocidad de disolución y la solubilidad de los API, permitiendo una disolución lenta y controlada. Chen *et al.* utilizaron la cocrystalización para reducir la velocidad de disolución de la ribavirina, un fármaco antiviral altamente soluble en agua. Estos autores demostraron que la tasa de liberación de ribavirina puede ser modificada en diferentes grados, mediante la formación de cocrisales con diferentes coformadores, lo que puede ayudar a reducir el efecto *spring-parachute*.¹²³

Por otro lado, propiedades físicas como la estabilidad, también pueden ser una limitación en el desarrollo de nuevos medicamentos. Un fármaco debe ser estable frente a agentes externos como la temperatura, la humedad, la luz y los cambios de p, de lo contrario, podrían producirse alteraciones en su estructura, que den lugar a características desconocidas e inapropiadas. La cocrystalización es una estrategia que permite la estabilización de fármacos reactivos, ya que las interacciones con el coformador son por lo general termodinámicamente favorables, llevando a la estructura de menor energía, y mayor estabilidad.¹²⁴ Un claro ejemplo de mejora de estabilidad, es el caso del clorhidrato de metformina (MTF), un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes de tipo II. La MTF por sí sola es una molécula muy básica y reactiva, sin embargo, la formación de una sal con iones Cl⁻, da lugar a una forma sólida estable y de alto valor farmacéutico. En el capítulo 4.3 de esta tesis doctoral se utilizará la reactividad de esta molécula para la formación de sales moleculares que permitan mejorar la solubilidad de diferentes AINEs, a la vez que se estabiliza la MTF.¹²⁵⁻¹²⁷

La capacidad de compresión es otra propiedad que, aunque no crítica, es muy deseada por la industria farmacéutica, ya que el comprimido es la forma de comercialización más popular por su bajo costo de fabricación, alta capacidad de producción, facilidad de consumo, almacenamiento y manipulación. Sin embargo, hay fármacos cuya morfología y propiedades mecánicas no permiten la producción de comprimidos. La cocrystalización permite modificar el hábito cristalino del material y mejorar propiedades de compresión, compactación, resistencia a la tracción e incluso la densidad.¹²⁸

La creciente investigación y el desarrollo de profundos conocimientos sobre las enfermedades, ha demostrado una gran interconexión entre las mismas. Este hecho, provoca que, para abordar el problema de forma eficaz, sea necesario el tratamiento con múltiples fármacos que tengan actividades combinadas, como suele ocurrir en trastornos complejos como como el VIH, la osteoartritis, el Alzheimer, la diabetes o el cáncer. Una característica intrínseca de los MMFs, es la capacidad de combinar múltiples APIs en una única fase, haciendo que el coformador sea un segundo API.¹²⁹ Los cocrystalales y sales multifármacos ofrecen todas las ventajas ya descritas, pero además permiten la administración conjunta de fármacos para producir efectos combinados y sinérgicos que potencian la actividad de los APIs.¹³⁰⁻¹³³

Una última, pero no menos interesante ventaja de los MMFs es la enorme capacidad de generar propiedad intelectual (PI). La PI de nuevas ideas, invenciones, procesos o productos, permite la exclusividad en la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos. La PI está protegida por la ley, por ejemplo, mediante patentes, derechos de autor y marcas registradas, que permiten obtener el reconocimiento y beneficio financiero.¹³⁴ La búsqueda de nuevas formas sólidas de medicamentos ya comercializados, proporciona la oportunidad de otorgar nueva PI sobre dichos medicamentos y extender su ciclo de vida de patentes. La FDA ha emitido recientemente una guía revisada sobre la clasificación de los cocrystalales farmacéuticos, estableciendo que, desde una perspectiva regulatoria, los nuevos cocrystalales se consideran análogos a un nuevo polimorfo del API, lo que promueve su patentabilidad como nuevas formas sólidas.^{115,135}

1.1.5.3. Interacciones no covalentes en MMFs

El estudio de las interacciones que se dan en los MMFs es fundamental para poder establecer relaciones entre la estructura cristalina y las nuevas propiedades de estos materiales.¹³⁶ De hecho, solo a través de una comprensión completa de los contactos existentes será posible predecir de manera fiable la estructura cristalina más estable. Sin embargo, incluso en la situación de una predicción fiable, parámetros de nucleación y crecimiento cristalino pueden significar que la estructura más estable no sea accesible experimentalmente.^{137,138}

Un enfoque que permite simplificar las interacciones intermoleculares en estructuras cristalinas es el estudio de sintones supramoleculares. Esta aproximación, busca patrones de interacción que ocurren de forma recurrente, por lo tanto, son reproducibles y permiten identificar motivos estructurales que actúan como ladrillos de construcción para diseñar MMFs.¹³⁹ La **figura 1.14** muestra un diagrama de los sintones supramoleculares más comunes en la formación de sales y cocrisales farmacéuticos.

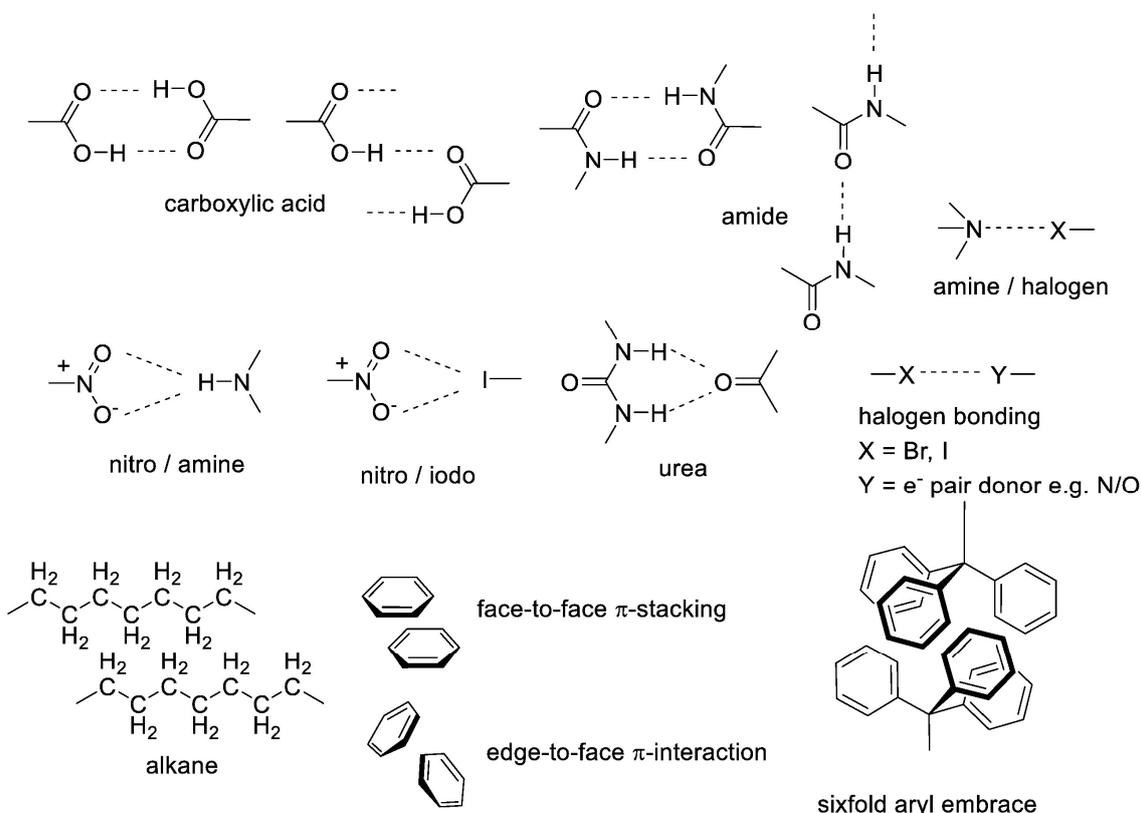


Figura 1.14. Sintones supramoleculares más comunes en la formación de sales y cocrisales. La autoría de la imagen pertenece a Berry *et al.*¹¹²

Además de conocer los principales grupos funcionales implicados en la formación de MMFs, es necesario entender las propiedades de las interacciones que se establecen entre estos, ya que determinarán las propiedades estructurales del material. Las principales interacciones observadas en MMFs incluyen el enlace de hidrógeno, interacciones de apilamiento C–H \cdots π y $\pi\cdots\pi$, las interacciones de Van der Waals, las interacciones dipolo-dipolo y el enlace halógeno.

El enlace de hidrógeno, debido a su fuerza, direccionalidad y frecuencia en moléculas orgánicas, es de lejos la interacción más importante en el diseño de sales y cocristales farmacéuticos. La diferencia que se da entre estos materiales, radica en el carácter iónico del enlace, ya que en las sales se produce la transferencia de H $^+$. La transferencia de un H $^+$ está determinada por la electronegatividad de los grupos involucrados en el enlace.^{140,141} Por ello, el pK $_a$ de los componentes suele utilizarse como herramienta para la predicción de la formación de sales y cocristales. Empíricamente, una diferencia entre el pK $_a$ de la base y el ácido (Δ pK $_a$) > 3 conduce a la formación de sales (diferencia de electronegatividad alta, transferencia de H $^+$), mientras que para moléculas con un Δ pK $_a$ < 0 resulta en la formación de cocristales. En el intervalo entre 0 y 3, la formación de una sal o un cocrystal es impredecible, y está determinada por los parámetros y las condiciones de síntesis.¹⁴² Los grupos funcionales que se implican en la formación del enlace de hidrógeno, determinarán las características del mismo, en términos de morfología, direccionalidad, selectividad y naturaleza. Para clasificar y describir los diferentes tipos de enlaces de hidrógeno Etter *et al.*^{137,143} desarrollan el término de *graph set*. Para asignar un *graph set* se debe identificar el número de tipos de enlaces de hidrógeno presentes en la estructura. Los diferentes tipos de enlaces de hidrógeno se definen por la naturaleza de los grupos aceptores y dadores que lo forman. El conjunto de moléculas que están unidas por un tipo de enlace de hidrógeno se denomina motivo. Estos motivos se caracterizan por uno de cuatro designadores que indican si el motivo es infinito o finito, y cíclico o no. Para los motivos generados a partir de enlaces de hidrógeno intermoleculares, estos designadores son: C (cadena), R (anillo) y D (dímero u otro conjunto finito). El designador S es utilizado para enlaces de hidrógeno intramoleculares. Además del designador, el número de donantes (d) y aceptores (a) utilizados en cada motivo se asigna como subíndice y superíndice, respectivamente. El tamaño o grado del motivo se corresponde con el número de átomos que forman la unión y se indica entre

paréntesis. Un ejemplo de interacciones de hidrógeno y sus correspondientes *graph sets* se muestran en la **figura 1.15**.

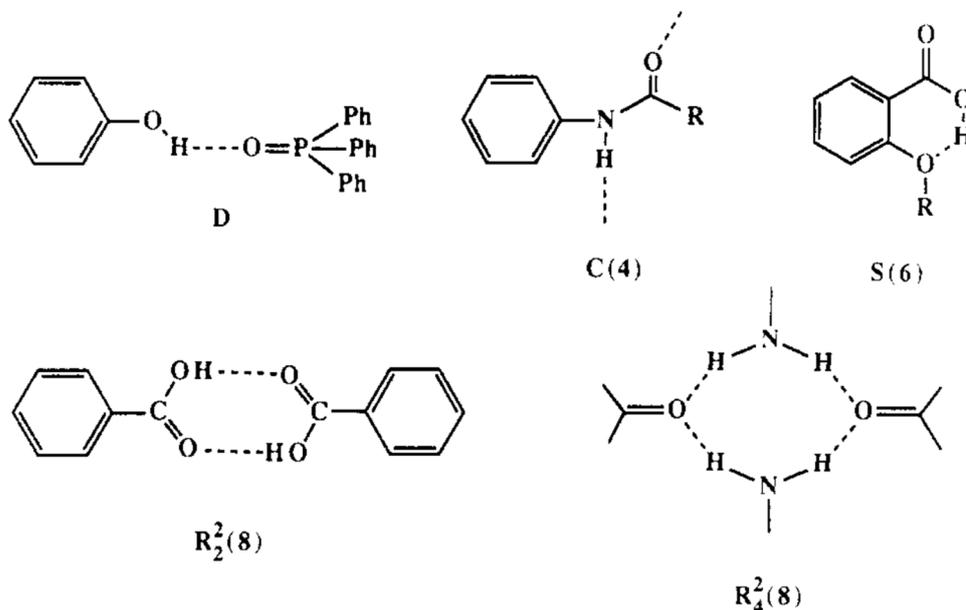


Figura 1.15. *Graph set* para diferentes motivos de enlaces de hidrógenos. La autoría de la imagen pertenece a Etter *et al.*¹³⁷

Las interacciones dipolares son en general débiles y, aunque direccionales, no determinan la formación de un MMF como sí lo hace el enlace de hidrógeno (es un tipo de dipolo de mayor fuerza). Por ejemplo, las interacciones dipolares entre grupos carbonilo (C=O) ocurren en solventes como la acetona. Esta naturaleza débil de las interacciones dipolares de los C=O se hace evidente cuando se compara el punto de ebullición de la acetona (56 °C) y el agua (100 °C), esta última formada mediante enlaces por puentes de hidrógenos.¹⁴⁴ Sin embargo, las interacciones dipolares presentan suma importancia en el estudio de materiales sólidos mediante técnicas de resonancia magnética nuclear ya que proporcionan información sobre distancias intermoleculares y orientación.¹⁴⁵

Las interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ son fuerzas débiles que ocurren entre anillos aromáticos enfrentados, lo que permite maximizar el contacto entre regiones electrónicamente ricas y electrónicamente deficientes. Estas interacciones $\pi \cdots \pi$ suelen estar guiadas por la morfología molecular y los impedimentos estéricos, siendo muy importantes para estabilizar sistemas en los que hay anillos aromáticos. como son el caso de la cafeína, la teofilina y los ácidos benzoicos, conformadores ampliamente utilizados en esta área (Figura 1.16).^{146,147}

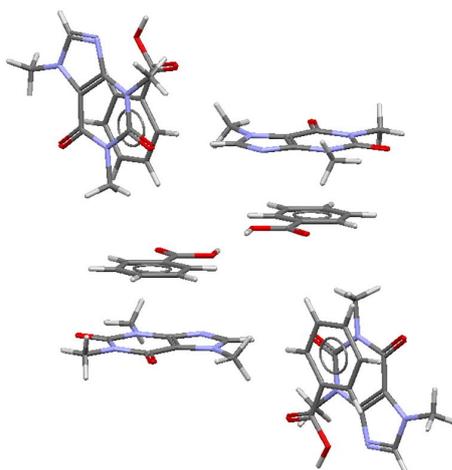


Figura 1.16. Interacciones tipo $\pi \cdots \pi$ en cocristales de cafeína/ácido benzoico. La autoría de la imagen pertenece a Bučar *et al.*¹⁴⁶

Un enlace similar a los enlaces de hidrógenos, es el enlace halógeno. Estos se forman por una interacción entre el electrón deficiente de un átomo halógeno y un "aceptor de enlace de halógeno" con facilidad para ceder electrones como puede ser un par solitario de piridina.¹⁴⁸ Debido a su naturaleza relativamente "blanda", los enlaces halógenos no tienden a competir con los enlaces de hidrógeno, aunque a menudo ocurren simultáneamente en estructuras cristalinas. Los enlaces halógenos se han utilizado en el diseño de cocristales de 3-Yodo-2-propinil-N-butilcarbamato, un material utilizado globalmente como conservante, fungicida y alguicida. Sin embargo, es un material difícil de purificar y manipular debido a su naturaleza pegajosa. La formación de sales utilizando biperidinas resulta en cocristales con propiedades que lo dotan de mayor manejabilidad (**Figura 1.17**).¹⁴⁹

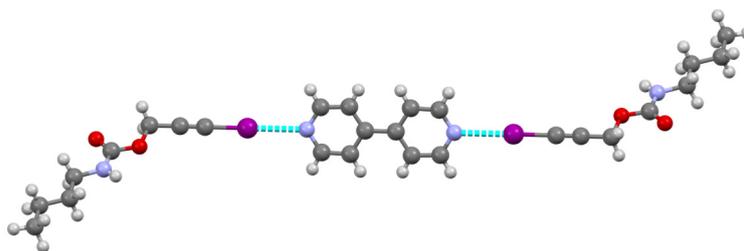


Figura 1.17. Enlace halógeno en cocristales de 3-Yodo-2-propinil-N-butilcarbamato/biperidina. La autoría de la imagen pertenece a Baldrighi *et al.*¹⁴⁹

Además de las interacciones direccionales entre grupos funcionales, la estructura cristalina está altamente influenciada por interacciones débiles de Van der Waals, ya que se dan entre todas las moléculas adyacentes, lo que resulta en la búsqueda de la posición más estable. Las interacciones de Van der Waals y la forma molecular son las contribuciones más complejas de entender, controlar y predecir durante la formación de un MMF. En este contexto, las moléculas con morfologías “incómodas”, no suelen ser complementarias y por lo tanto, son muy propensas a incorporar otros componentes presentes en el medio de cristalización para llenar el espacio vacío y estabilizar la estructura.¹⁵⁰ Este factor es una causa fundamental en la formación de solvatos e hidratos, ya que las moléculas de solvente suelen tener el tamaño y los grupos funcionales necesarios para estabilizar este tipo de estructuras.¹⁵¹

1.1.5.4. Estrategias de síntesis de MMFs

En la síntesis de nuevos MMFs, parámetros como la solubilidad de los reactivos en el disolvente, sus grupos funcionales, la relación estequiométrica entre el coformador y el API, la temperatura, la agitación (si la hubiera), el pH o incluso el tipo de material en el que se realiza la síntesis, pueden ser diferenciales a la hora de una operación exitosa. Todos estos factores, sumados a los tipos de enlaces y sintones supramoleculares que pueden darse en una estructura cristalina, hacen que la preparación de un MMF sea un proceso complejo, multietapa y empírico, en el que se deben tener en cuenta todos los resultados, ya sean positivos o negativos. Las principales técnicas empleadas para la obtención de MMFs, se clasifican en síntesis en solución y técnicas de síntesis en estado sólido.¹⁵²

1.1.5.4.1. Síntesis en estado sólido

Dentro de las metodologías de estado sólido, una de las más comunes y básicas es la síntesis por contacto. En este tipo de procedimientos, se busca la cocrystalización espontánea mediante el contacto íntimo entre fases, sin aplicar fuerzas mecánicas externas.^{153,154} A pesar de su simplicidad, en este enfoque también existen parámetros a tener en cuenta como son el tamaño de partícula, la homogeneización de los componentes de la mezcla, la temperatura, la humedad o la presión atmosférica. Rodríguez-Hornedo *et al.* estudiaron el efecto de la premolienda de los materiales de partida en la velocidad de cocrystalización del sistema carbamazepina/nicotinamida, demostrando que la velocidad

de cocrystalización en el caso de los reactivos premolidos fue notablemente más rápida (12 días) que la de los reactivos sin moler (80 días), debido al mejor contacto entre fases por su menor tamaño de partícula.¹⁵⁵ Por otro lado, se han obtenido mayores velocidades de cocrystalización para un mismo sistema a temperaturas y humedades relativas altas. La temperatura mejora el contacto gracias a la vibración térmica de las moléculas, mientras que el mecanismo de cocrystalización en presencia de humedad se presupone de tres etapas: (1) absorción de humedad, (2) disolución local de reactivos y (3) nucleación y crecimiento de cocrystalales.¹⁵⁶

Una forma de mejorar el contacto entre los componentes de una mezcla en estado sólido, es mediante el método Kofler, en el que los componentes se funden por separado, de modo que en la interfaz de ambos materiales se crea una zona de mezcla. Berry *et al.* utilizaron esta metodología para identificar la formación de cocrystalales de nicotinamida con diferentes AINEs como el ibuprofeno, ácido salicílico, flurbiprofeno y fenbufeno.¹¹² Siguiendo los principios del método Kofler, la extrusión es una técnica que pone en contacto los componentes mediante la fundición de los mismos. En este caso se utiliza un “tornillo” para generar una mezcla homogénea de los fundidos, mejorando el contacto y la eficiencia del proceso. Este tipo de metodologías tienen la ventaja de no usar solventes orgánicos, altamente contaminantes y cuya extracción supone grandes costes en la industria farmacéutica. Sin embargo, la baja eficiencia, los altos tiempos de reacción, las altas energías necesarias para mantener los sólidos fundidos y la imposibilidad de aplicación en moléculas termolábiles, también son un grave inconveniente.¹⁵⁷ Estudios de síntesis de cocrystalales de indometacina/sacarina mediante extrusión por fundición, demostraron que el perfil de temperatura, la velocidad de alimentación y la velocidad del tornillo son tres parámetros críticos, para el control de la cristalinidad y el rendimiento de la reacción.¹⁵⁸ **La figura 1.18** muestra un diagrama de un equipo típico de extrusión por fundición.

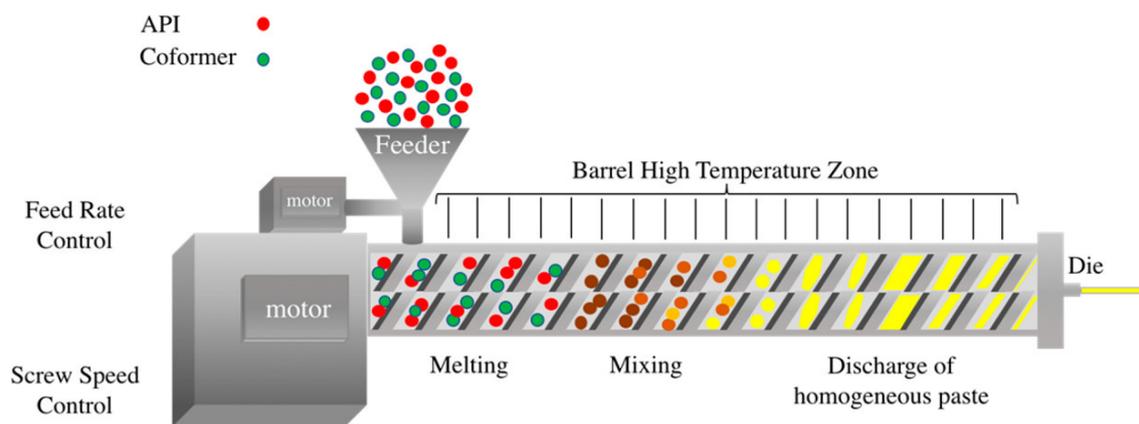


Figura 1.18. Diagrama de un proceso de síntesis de co cristales mediante extrusión por fundición. La autoría de la imagen pertenece a Karimi-Jafari *et al.*¹⁵²

La molienda en estado sólido es otra estrategia, que representan una de las principales técnicas para la síntesis de MMFs gracias a que presenta cortos tiempos de operación (minutos) y no requiere el uso de solventes orgánicos, por lo que se consideran metodologías de química “verde” (no contaminantes). También, es un proceso escalable, reproducible y asequible, ya que no requiere el uso de equipamiento altamente especializado. De forma general, se practican dos formatos, la molienda en seco (*Neat-grinding*, NG) y molienda asistida por líquido (*Liquid-assisted-grinding*, LAG).¹⁵⁹

Las operaciones de NG combinan el API y el coformador mediante operaciones de alta energía usando medios manuales o automatizados como el molino de bolas. En estas operaciones la molienda produce aumentos de temperatura, sin embargo, en esta técnica no se espera que los materiales sólidos de partida se fundan por lo que, controlando la temperatura, esta metodología puede aplicarse a moléculas termolábiles. Adicionalmente, el rendimiento de las operaciones de NG, en relación con los métodos basados en solución, suele ser más altos ya que no hay pérdida de material asociada a la solubilidad del material en el solvente. Sin embargo, el NG también presenta algunos inconvenientes relacionados con una conversión incompleta del material, lo que lleva al uso de procesos purificación adicionales para obtener un MMF puro. En ocasiones aumentar el tiempo de molienda permite resolver estos problemas, pero también puede resultar en la formación de materiales amorfos, cuya estructura cristalina se ha perdido debido a la alta energía de la molienda.¹⁶⁰

Una versión “mejorada” del NG es el LAG. Esta molienda implica el uso de una pequeña cantidad de líquido durante la molienda (normalmente un volumen en el orden de microlitros). El líquido, por lo general agua o un disolvente orgánico, tiene un papel “catalítico” que mejora el contacto entre moléculas, lo que hace la reacción mucho más eficiente, con mayores rendimientos y menor consumo de tiempo. Además, el uso de diferentes solventes permite acceder a nuevos MMFs, sobre todo en aquellos casos en los que el NG no da resultado. A pesar de su papel, el solvente es un aditivo, no un catalizador, ya que no puede recuperarse después de la reacción. Uno de los problemas de este enfoque, es la formación de solvatos, ya que el solvente puede incorporarse en la estructura cristalina, dando lugar a MMFs no deseados.¹⁶¹ Existen una gran cantidad de sales, cocristales y solvatos obtenidos mediante LAG que han puesto de manifiesto el enorme potencial de esta técnica para el screening y la síntesis de MMFs.¹⁶²

En estado sólido, existen otras técnicas de cocrystalización menos convencionales como la cosublimación. La sublimación también es una técnica libre de solventes orgánicos, generalmente utilizada para la separación de fases, el control de la morfología cristalina y el estudio de polimorfismo. Sin embargo, el 60% de las moléculas orgánicas son sublimables, por lo que su uso puede ser una estrategia muy interesante para el estudio y la síntesis de nuevas formas sólidas que son accesibles únicamente desde la fase gas (Figura 1.19).^{163,164} Por ejemplo, mediante técnicas de cosublimación se han logrado el crecimiento selectivo de sales y cocristales de ácido succínico/hexametilentetramina y ácido oxálico/4,4'-bipiridina, controlando parámetros críticos como la presión de vacío, el tiempo y la temperatura de sublimación o la separación física de los componentes.¹⁶⁵

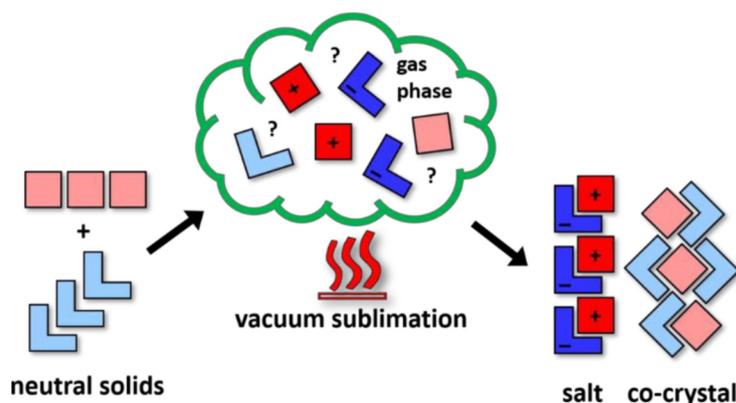


Figura 1.19. Proceso de cosublimación para la síntesis selectiva de sales y cocristales. La autoría de la imagen pertenece a Lombard *et al.*¹⁶³

1.1.5.4.2. Síntesis en solución

A diferencia de las técnicas de cocrystalización en estado sólido, la obtención de MMFs en solución suelen tener una base similar a las técnicas de cristalización convencionales. Estas metodologías giran entorno a la solubilidad de los componentes en un solvente determinado, por lo que es fundamental estudiar el diagrama de solubilidad de un compuesto en solución. Tal y como se observa en la **figura 1.20**, para un parámetro dado como la temperatura o volumen de antisolvente (Eje X), en una concentración (Eje Y) por debajo de la curva de solubilidad, la solución no estará saturada, por lo tanto, no se producirá nucleación o precipitación. Cuando aumentamos la concentración del soluto podemos superar el límite de solubilidad llegando a una zona de sobresaturación en la que la solución no admite más muestra, llegando a un equilibrio entre precipitación y disolución. Sin embargo, existe una curva de super-solubilidad del soluto la cual es cinética, metaestable y superior a la solubilidad termodinámica en equilibrio. En esta zona pueden producirse fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino. Conforme se produce la nucleación y el crecimiento de los cristales, la concentración de soluto se reduce hasta llegar a un equilibrio en la curva de solubilidad.^{166,167}

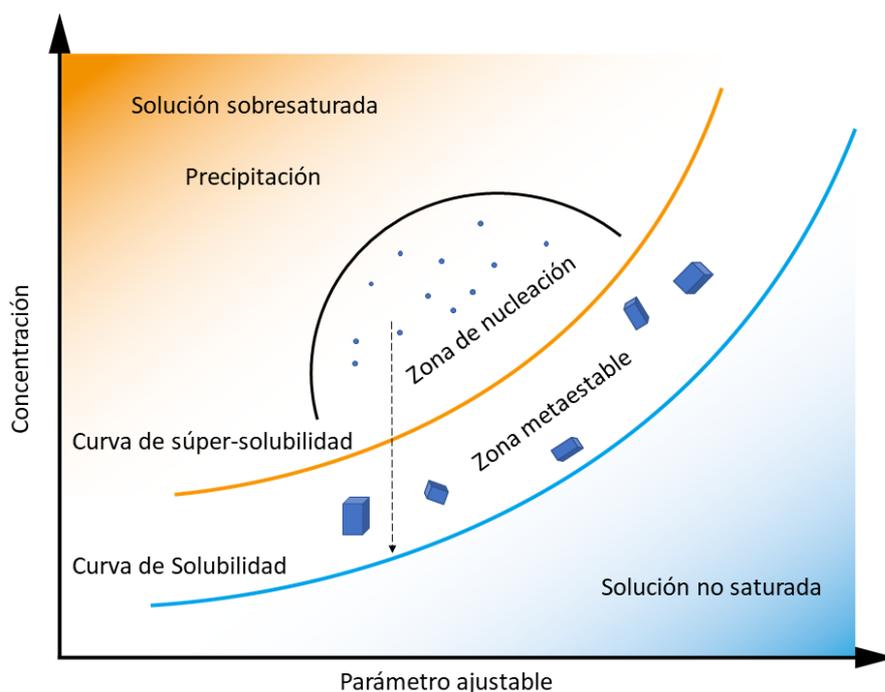


Figura 1.20. Diagrama de solubilidad tipo.

De este modo, la cocrystalización de un MMF en solución, se centran en conseguir la sobresaturación simultanea de los componentes a partir de una solución. Existen diversas metodologías, que nos permiten movernos en el diagrama de solubilidad visto anteriormente. Sin embargo, cuando tenemos más de un componente en la solución, este diagrama se complica, dando lugar a un diagrama de fases ternario (**Figura 1.21**).¹¹² En estos procedimientos los parámetros experimentales son fundamentales y han de estar controlados ya que cambios sutiles pueden derivar en la cristalización del API, del coformador, un polimorfo, un solvato o del MMF deseado.

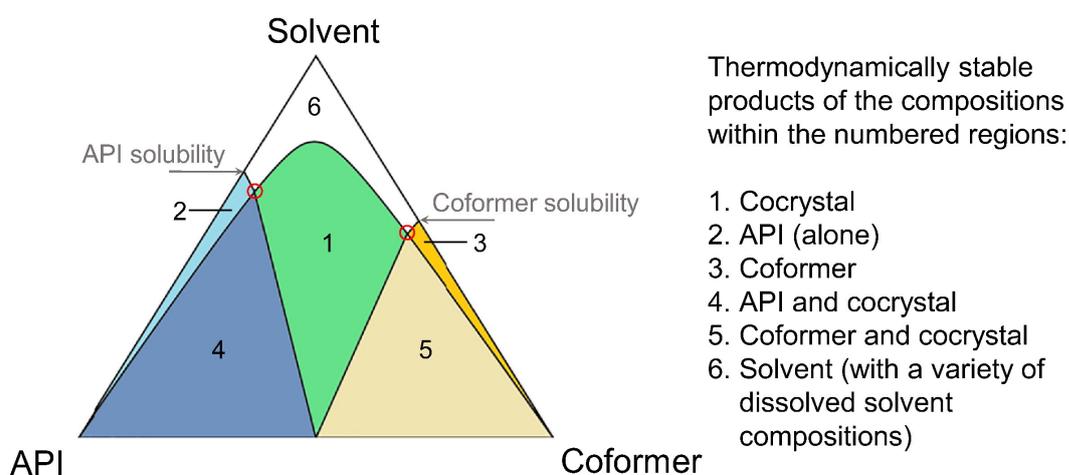


Figura 1.21. Diagrama de fases ternario de un cocrystal tipo. La autoría de la imagen pertenece a Berry *et al.*¹¹²

La evaporación es un método muy común para generar cristales de buena calidad para estudios de difracción de rayos X de monocristal (en inglés *single crystal X-ray diffraction*, en adelante SCXRD) que permiten determinar la estructura cristalina del material. La reducción del volumen de solvente mediante evaporación, lleva a la solución a un estado de sobresaturación, provocando la nucleación y el crecimiento de los cristales del nuevo MMF. En esta metodología, hay que tener en cuenta la volatilidad del solvente, la solubilidad de los componentes, la velocidad de evaporación y la temperatura. Para evitar impurezas, es recomendable separar los cristales obtenidos antes de la completa evaporación del solvente, ya que eso provocaría la precipitación de cualquier material restante disuelto incluyendo excesos del API o coformador. Además, la solución tiende a proteger y mantener los cristales en buen estado. Por lo general, se busca una evaporación lenta que garantice la formación pocos cristales, pero de buena calidad. Por este motivo, durante la búsqueda de nuevos MMFs, la cocrystalización por evaporación suele

emplearse para obtener cristales para estudios de SCXRD, pero no para la síntesis a granel de grandes cantidades del material.^{168,169}

La temperatura es otro parámetro fundamental que afecta a la solubilidad de una molécula. El enfriamiento, de forma general, reduce la solubilidad, lo que permite llevar la solución a estados de sobresaturación, consiguiendo la nucleación y crecimiento cristalino. Del mismo modo que en la evaporación, la velocidad de enfriamiento, las concentraciones iniciales de soluto, así como las temperaturas iniciales y finales, determinaran la cantidad, el tamaño y la calidad de los cristales obtenidos, así como la cocrystalización del MMF. En este tipo de metodologías se ha de tener cuidado con los rangos de temperatura ya que es peligroso exceder la temperatura de ebullición de los solventes y se pueden dañar ciertas moléculas termolábiles.¹⁷⁰⁻¹⁷²

La síntesis hidrotermal es una metodología en solución en la que se alcanzan temperaturas realmente elevadas, en comparación a las demás técnicas en solución. En esta metodología, el API y el coformador se suspenden en agua, ya que debido a las bajas solubilidades acuosas de la mayoría de APIs, no llegan a disolverse a temperatura ambiente. La suspensión se cierra en un reactor hidrotermal y se calienta a por encima del punto de ebullición del agua. La presión interior, permite superar el punto de ebullición, siguiendo los mismos principios de una autoclave. Esta alta temperatura y presión permite que las moléculas se disuelvan e interaccionen, de modo que, cuando la temperatura disminuya de forma gradual, se produce la formación de cristales, y posiblemente del MMF. Esta metodología además de estar limitada a moléculas con buena estabilidad térmica, también suele dar lugar a hidratos. A pesar de ello, los cristales obtenidos suelen tener buen tamaño y calidad, siendo estables en condiciones normales.^{173,174}

Un método de síntesis en suspensión, para la obtención de grandes cantidades de MFFs en polvo, es el *slurry*. En este procedimiento la cantidad de solvente utilizada es mucho mayor que en los LAG, pero sin llegar a ser soluciones, ya que consiste en la formación suspensiones de los componentes del MMF, que son agitadas durante largos periodos de tiempo. Además de mejorar el contacto entre reactivos, el solvente permite su disolución parcial, permitiendo la reacción y posterior precipitación (por la elevada saturación). Cuando este proceso se mantiene, se consigue la transformación completa de la suspensión. En estos procedimientos se obtiene un material en polvo, o cristales de muy reducido tamaño. Además de ser un metodología simple, los rendimientos y la

pureza del producto suele ser elevada.¹⁷⁵ Esta metodología, permite acceder a fases cristalinas termodinámicamente estables y, junto con el LAG, es una de las formas más comunes para la obtención de grandes cantidades un MMF en polvo. Diversos estudios comparan las ventajas y desventajas, así como los rendimientos y la capacidad para acceder a nuevos MMFs del *slurry* y del LAG.¹⁷⁶

La sonicación es un proceso menos empleado que también permite la obtención de MMFs. La sonicación en una solución produce fenómenos de cavitación en zonas locales y puntuales. Esta cavitación provoca aumentos de temperatura localizados que, en soluciones saturadas y sobresaturadas, puede provocar la nucleación y precipitación del cocrystal.^{177,178} Sin embargo, debido a la sonicación, los cristales obtenidos en este tipo de técnicas suelen tener un tamaño muy reducido. Este tamaño micro y nanométrico es interesante ya que, tal y como se ha comentado en la **tabla 1.1** la reducción del tamaño de partícula también permite modular la solubilidad y velocidad de disolución de un API.¹⁷⁹

Al igual que lo descrito durante la síntesis de materiales multicomponente de Ap, las diferentes técnicas de cocrystalización, dan como resultado un producto con diferentes características. Por ello, es importante definir el objetivo y las necesidades de la investigación, lo que nos permitirá seleccionar el tipo de técnica correcta para la obtención de un material con unas propiedades específicas.

1.1.6. Referencias

- (1) Loveridge, N. Bone: More than a Stick. *Journal of animal science*. Oxford Academic January 1, 1999, pp 190–196. https://doi.org/10.2527/1999.77suppl_2190x.
- (2) Reddi, A. H. Bone and Cartilage Differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994, 4 (5), 737–744. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(94\)90141-O](https://doi.org/10.1016/0959-437X(94)90141-O).
- (3) Weiner, S.; Wagner, H. D. The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, 28 (1), 271–298. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MATSCI.28.1.271/CITE/REFWORKS>.
- (4) Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials. Molecular Diversity Preservation International* April 20, 2009, pp 399–498. <https://doi.org/10.3390/ma2020399>.
- (5) Dorozhkin, S.; Oktar, F.; Gunduz, O. Calcium Orthophosphates. In *8th World Biomaterials Congress 2008*; Springer, 2008; Vol. 4, p 2218. <https://doi.org/10.4161/biom.18790>.
- (6) Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J. M. Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues. *Progress in Solid State Chemistry*. Pergamon January 1, 2004, pp 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001>.
- (7) Dorozhkin, S. V. Nanosized and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. Elsevier March 1, 2010, pp 715–734. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.031>.
- (8) Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y. Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports*. Elsevier November 28, 2007, pp 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- (9) Sanchez, C.; Arribart, H.; Guille, M. M. G. Biomimetism and Bioinspiration as Tools for the Design of Innovative Materials and Systems. *Nature Materials*. Nature Publishing Group 2005, pp 277–288. <https://doi.org/10.1038/nmat1339>.
- (10) Padilla, S.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. High Specific Surface Area in Nanometric Carbonated Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 2008, 20 (19), 5942–5944. <https://doi.org/10.1021/cm801626k>.
- (11) Yotsova, R.; Peev, S. Biological Properties and Medical Applications of Carbonate Apatite: A Systematic Review. *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute February 18, 2024, p 291. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020291>.
- (12) Doat, A.; Pellé, F.; Gardant, N.; Lebugle, A. Synthesis of Luminescent Bioapatite Nanoparticles for Utilization as a Biological Probe. *J. Solid State Chem.* 2004, 177 (4–5), 1179–1187. <https://doi.org/10.1016/J.JSSC.2003.10.023>.

- (13) Doat, A.; Fanjul, M.; Pellé, F.; Hollande, E.; Lebugle, A. Europium-Doped Bioapatite: A New Photostable Biological Probe, Internalizable by Human Cells. *Biomaterials* 2003, 24 (19), 3365–3371. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00169-8).
- (14) Mondéjar, S. P.; Kovtun, A.; Epple, M. Lanthanide-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles with High Internal Crystallinity and with a Shell of DNA as Fluorescent Probes in Cell Experiments. *J. Mater. Chem.* 2007, 17 (39), 4153–4159. <https://doi.org/10.1039/b708258d>.
- (15) Ternane, R.; Trabelsi-Ayedi, M.; Kbir-Arighuib, N.; Piriou, B. Luminescent Properties of Eu³⁺ in Calcium Hydroxyapatite. *J. Lumin.* 1999, 81 (3), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(98\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(98)00172-0).
- (16) Kim, E. J.; Choi, S. W.; Hong, S. H. Synthesis and Photoluminescence Properties of Eu³⁺-Doped Calcium Phosphates. *J. Am. Ceram. Soc.* 2007, 90 (9), 2795–2798. <https://doi.org/10.1111/J.1551-2916.2007.01791.X>.
- (17) Wang, C.; Jeong, K. J.; Kim, J.; Kang, S. W.; Kang, J.; Han, I. H.; Lee, I. W.; Oh, S. J.; Lee, J. Emission-Tunable Probes Using Terbium(III)-Doped Self-Activated Luminescent Hydroxyapatite for in Vitro Bioimaging. *J. Colloid Interface Sci.* 2021, 581, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.083>.
- (18) Altinoğlu, E. I.; Russin, T. J.; Kaiser, J. M.; Barth, B. M.; Eklund, P. C.; Kester, M.; Adair, J. H. Near-Infrared Emitting Fluorophore-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for in Vivo Imaging of Human Breast Cancer. *ACS Nano* 2008, 2 (10), 2075–2084. <https://doi.org/10.1021/nm800448r>.
- (19) Iafisco, M.; Palazzo, B.; Marchetti, M.; Margiotta, N.; Ostuni, R.; Natile, G.; Morpurgo, M.; Gandin, V.; Marzano, C.; Roveri, N. Smart Delivery of Antitumoral Platinum Complexes from Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* 2009, 19 (44), 8385–8392. <https://doi.org/10.1039/B914379C>.
- (20) Iafisco, M.; Sabatino, P.; Lesci, I. G.; Prat, M.; Rimondini, L.; Roveri, N. Conformational Modifications of Serum Albumins Adsorbed on Different Kinds of Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010, 81 (1), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.022>.
- (21) Iafisco, M.; Foggia, M. Di; Bonora, S.; Prat, M.; Roveri, N. Adsorption and Spectroscopic Characterization of Lactoferrin on Hydroxyapatite Nanocrystals. *Dalt. Trans.* 2011, 40 (4), 820–827. <https://doi.org/10.1039/c0dt00714e>.
- (22) Mozar, F. S.; Chowdhury, E. H. Surface-Modification of Carbonate Apatite Nanoparticles Enhances Delivery and Cytotoxicity of Gemcitabine and Anastrozole in Breast Cancer Cells. *Pharm.* 2017, Vol. 9, Page 21 2017, 9 (2), 21. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS9020021>.
- (23) Lara-Ochoa, S.; Ortega-Lara, W.; Guerrero-Beltrán, C. E. Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug

- Delivery: Physicochemistry and Applications. *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute October 9, 2021, p 1642. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101642>.
- (24) Kester, M.; Heakal, Y.; Fox, T.; Sharma, A.; Robertson, G. P.; Morgan, T. T.; Altinoğlu, E. I.; Tabaković, A.; Parette, M. R.; Rouse, S. M.; Ruiz-Velasco, V.; Adair, J. H. Calcium Phosphate Nanocomposite Particles for in Vitro Imaging and Encapsulated Chemotherapeutic Drug Delivery to Cancer Cells. *Nano Lett.* 2008, 8 (12), 4116–4121. <https://doi.org/10.1021/nl802098g>.
- (25) Zhang, M.; Kataoka, K. Nano-Structured Composites Based on Calcium Phosphate for Cellular Delivery of Therapeutic and Diagnostic Agents. *Nano Today*. Elsevier December 1, 2009, pp 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.10.009>.
- (26) Bisht, S.; Bhakta, G.; Mitra, S.; Maitra, A. PDNA Loaded Calcium Phosphate Nanoparticles: Highly Efficient Non-Viral Vector for Gene Delivery. *Int. J. Pharm.* 2005, 288 (1), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.035>.
- (27) Khalifehzadeh, R.; Arami, H. DNA-Templated Strontium-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for Gene Delivery in Bone Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5 (7), 3201–3211. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01587>.
- (28) Vázquez-Hernández, F.; Mendoza-Barrera, C.; Altuzar, V.; Meléndez-Lira, M.; Santana-Aranda, M. A.; De La, M. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles and Their Application in Protein Adsorption. *Mater. Sci. Eng. B* 2010, 174 (1–3), 290–295. <https://doi.org/10.1016/J.MSEB.2010.03.011>.
- (29) Choimet, M.; Tourrette, A.; Marsan, O.; Rasso, G.; Drouet, C. Bio-Inspired Apatite Particles Limit Skin Penetration of Drugs for Dermatology Applications. *Acta Biomater.* 2020, 111, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.05.010>.
- (30) Rodríguez-Ruiz, I.; Delgado-López, J. M.; Durán-Olivencia, M. A.; Iafisco, M.; Tampieri, A.; Colangelo, D.; Prat, M.; Gómez-Morales, J. PH-Responsive Delivery of Doxorubicin from Citrate-Apatite Nanocrystals with Tailored Carbonate Content. *Langmuir* 2013, 29 (26), 8213–8221. <https://doi.org/10.1021/la4008334>.
- (31) Palazzo, B.; Iafisco, M.; Laforgia, M.; Margiotta, N.; Natile, G.; Bianchi, C. L.; Walsh, D.; Mann, S.; Roveri, N. Biomimetic Hydroxyapatite-Drug Nanocrystals as Potential Bone Substitutes with Antitumor Drug Delivery Properties. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17 (13), 2180–2188. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600361>.
- (32) De Grootl, K.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A. Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 1998, 212 (2), 137–147. <https://doi.org/10.1243/0954411981533917>.
- (33) Geesink, R. G. T.; Groot, K. De; T. Klein, C. P. A. Chemical Implant Fixation Using Hydroxyl???Apatite Coatings. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1987, NA; (225), 147???170.

<https://doi.org/10.1097/00003086-198712000-00014>.

- (34) Hamidi, M. F. F. A.; Harun, W. S. W.; Samykano, M.; Ghani, S. A. C.; Ghazalli, Z.; Ahmad, F.; Sulong, A. B. A Review of Biocompatible Metal Injection Moulding Process Parameters for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier September 1, 2017, pp 1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.016>.
- (35) Niinomi, M.; Liu, Y.; Nakai, M.; Liu, H.; Li, H. Biomedical Titanium Alloys with Young's Moduli Close to That of Cortical Bone. *Regenerative Biomaterials*. Oxford Academic September 1, 2016, pp 173–185. <https://doi.org/10.1093/RB/RBW016>.
- (36) Webster, T. J.; Ergun, C.; Doremus, R. H.; Lanford, W. A. Increased Osteoblast Adhesion on Titanium-Coated Hydroxylapatite That Forms CaTiO₃. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2003, 67 (3), 975–980. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10160>.
- (37) Rajapakse, R. M. G.; Wijesinghe, W. P. S. L.; Mantilaka, M. M. M. G. P. G.; Chathuranga Senarathna, K. G.; Herath, H. M. T. U.; Premachandra, T. N.; Ranasinghe, C. S. K.; Rajapakse, R. P. V. J.; Edirisinghe, M.; Mahalingam, S.; Bandara, I. M. C. C. D.; Singh, S. Preparation of Bone-Implants by Coating Hydroxyapatite Nanoparticles on Self-Formed Titanium Dioxide Thin-Layers on Titanium Metal Surfaces. *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 63, 172–184. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.02.053>.
- (38) Chen, Q.; Yin, D.; Zhu, S.; Hu, X. Adsorption of Cadmium(II) on Humic Acid Coated Titanium Dioxide. *J. Colloid Interface Sci.* 2012, 367 (1), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.10.005>.
- (39) Visentin, F.; El Habra, N.; Fabrizio, M.; Brianese, N.; Gerbasi, R.; Nodari, L.; Zin, V.; Galenda, A. TiO₂-HA Bi-Layer Coatings for Improving the Bioactivity and Service-Life of Ti Dental Implants. *Surf. Coatings Technol.* 2019, 378, 125049. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2019.125049>.
- (40) Soballe, K.; Hansen, E. S.; Brockstedt-Rasmussen, H.; Bunger, C. Hydroxyapatite Coating Converts Fibrous Tissue to Bone around Loaded Implants. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* 1993, 75 (2), 270–278. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.75b2.8444949>.
- (41) Søballe, K.; Hansen, E. S.; Brockstedt-Rasmussen, H.; Hjørdal, V. E.; Juhl, G. I.; Pedersen, C. M.; Hvid, I.; Bünger, C. Fixation of Titanium and Hydroxyapatitecoated Implants in Arthritic Osteopenic Bone. *J. Arthroplasty* 1991, 6 (4), 307–316. [https://doi.org/10.1016/S0883-5403\(06\)80181-6](https://doi.org/10.1016/S0883-5403(06)80181-6).
- (42) Kołodziejska, B.; Kaflak, A.; Kolmas, J. Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration-A Review. *Materials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute April 9, 2020, p 1748. <https://doi.org/10.3390/ma13071748>.
- (43) Nitti, P.; Kunjalukkal Padmanabhan, S.; Cortazzi, S.; Stanca, E.; Siculella, L.; Licciulli, A.;

- Demitri, C. Enhancing Bioactivity of Hydroxyapatite Scaffolds Using Fibrous Type I Collagen. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9, 631177. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.631177>.
- (44) Santhakumar, S.; Oyane, A.; Nakamura, M.; Yoshino, Y.; Alruwaili, M. K.; Miyaji, H. Bone Tissue Regeneration by Collagen Scaffolds with Different Calcium Phosphate Coatings: Amorphous Calcium Phosphate and Low-Crystalline Apatite. *Materials (Basel)*. 2021, 14 (19), 5860. <https://doi.org/10.3390/ma14195860>.
- (45) Türk, S.; Altınsoy, I.; Çelebi Efe, G.; Ipek, M.; Özacar, M.; Bindal, C. 3D Porous Collagen/Functionalized Multiwalled Carbon Nanotube/Chitosan/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 92, 757–768. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.020>.
- (46) Zhang, H.; Mao, X.; Zhao, D.; Jiang, W.; Du, Z.; Li, Q.; Jiang, C.; Han, D. Three Dimensional Printed Polylactic Acid-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Prefabricating Vascularized Tissue Engineered Bone: An in Vivo Bioreactor Model. *Sci. Reports* 2017 71 2017, 7 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14923-7>.
- (47) Alksne, M.; Kalvaityte, M.; Simoliunas, E.; Rinkunaite, I.; Gendviliene, I.; Locs, J.; Rutkunas, V.; Bukelskiene, V. In Vitro Comparison of 3D Printed Polylactic Acid/Hydroxyapatite and Polylactic Acid/Bioglass Composite Scaffolds: Insights into Materials for Bone Regeneration. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020, 104, 103641. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103641>.
- (48) Hassanajili, S.; Karami-Pour, A.; Oryan, A.; Talaei-Khozani, T. Preparation and Characterization of PLA/PCL/HA Composite Scaffolds Using Indirect 3D Printing for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 104, 109960. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109960>.
- (49) Geim, A. K.; Novoselov, K. S. The Rise of Graphene. *Nat. Mater.* 2007 63 2007, 6 (3), 183–191. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>.
- (50) Rao, C. N. R.; Biswas, K.; Subrahmanyam, K. S.; Govindaraj, A. Graphene, the New Nanocarbon. *J. Mater. Chem.* 2009, 19 (17), 2457–2469. <https://doi.org/10.1039/b815239j>.
- (51) Yu, W.; Sisi, L.; Haiyan, Y.; Jie, L. Progress in the Functional Modification of Graphene/Graphene Oxide: A Review. *RSC Adv.* 2020, 10 (26), 15328–15345. <https://doi.org/10.1039/D0RA01068E>.
- (52) Zhang, L.; Liu, W.; Yue, C.; Zhang, T.; Li, P.; Xing, Z.; Chen, Y. A Tough Graphene Nanosheet/Hydroxyapatite Composite with Improved in Vitro Biocompatibility. *Carbon N. Y.* 2013, 61, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.04.074>.
- (53) Janković, A.; Eraković, S.; Mitrić, M.; Matić, I. Z.; Juranić, Z. D.; Tsui, G. C. P.; Tang, C. Y.; Mišković-Stanković, V.; Rhee, K. Y.; Park, S. J. Bioactive Hydroxyapatite/Graphene Composite Coating and Its Corrosion Stability in Simulated Body Fluid. *J. Alloys Compd.* 2015, 624, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.11.078>.
- (54) Wang, J.; Shaw, L. L. Morphology-Enhanced Low-Temperature Sintering of Nanocrystalline

- Hydroxyapatite. *Adv. Mater.* 2007, 19 (17), 2364–2369. <https://doi.org/10.1002/adma.200602333>.
- (55) Ganesan, K.; Epple, M. Calcium Phosphate Nanoparticles as Nuclei for the Preparation of Colloidal Calcium Phytate. *New J. Chem.* 2008, 32 (8), 1326–1330. <https://doi.org/10.1039/b803903h>.
- (56) Azadani, R. N.; Sabbagh, M.; Salehi, H.; Cheshmi, A.; Raza, A.; Kumari, B.; Erabi, G. Sol-Gel: Uncomplicated, Routine and Affordable Synthesis Procedure for Utilization of Composites in Drug Delivery: Review. *J. Compos. Compd.* 2021, 3 (6), 57–70. <https://doi.org/10.52547/JCC.3.1.6>.
- (57) Leena, M.; Rana, D.; Webster, T. J.; Ramalingam, M. Accelerated Synthesis of Biomimetic Nano Hydroxyapatite Using Simulated Body Fluid. *Mater. Chem. Phys.* 2016, 180, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.05.060>.
- (58) Guo, X.; Gough, J. E.; Xiao, P.; Liu, J.; Shen, Z. Fabrication of Nanostructured Hydroxyapatite and Analysis of Human Osteoblastic Cellular Response. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2007, 82 (4), 1022–1032. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31200>.
- (59) Nigar, F.; Johnston, A. L.; Smith, J.; Oakley, W.; Islam, M. T.; Felfel, R.; Grant, D.; Lester, E.; Ahmed, I. Production of Nano Hydroxyapatite and Mg-Whitlockite from Biowaste-Derived Products via Continuous Flow Hydrothermal Synthesis: A Step towards Circular Economy. *Materials (Basel)*. 2023, 16 (6), 2138. <https://doi.org/10.3390/MA16062138/S1>.
- (60) Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in Synthesis of Calcium Phosphate Crystals with Controlled Size and Shape. *Acta Biomaterialia*. Elsevier October 1, 2014, pp 4071–4102. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017>.
- (61) Chaikina, M. V.; Bulina, N. V.; Ishchenko, A. V.; Prosanov, I. Y. Mechanochemical Synthesis of Hydroxyapatite and Its Modifications: Composition, Structure, and Properties. *Russ. Phys. J.* 2014, 56 (10), 1176–1182. <https://doi.org/10.1007/s11182-014-0159-0>.
- (62) Chaikina, M. V.; Bulina, N. V.; Vinokurova, O. B.; Gerasimov, K. B.; Prosanov, I. Y.; Kompankov, N. B.; Lapina, O. B.; Papulovskiy, E. S.; Ishchenko, A. V.; Makarova, S. V. Possibilities of Mechanochemical Synthesis of Apatites with Different Ca/P Ratios. *Ceramics* 2022, 5 (3), 404–422. <https://doi.org/10.3390/CERAMICS5030031/S1>.
- (63) Iafisco, M.; Delgado-López, J. M.; Gómez-Morales, J.; Hernández-Hernández, M. A.; Rodríguez-Ruiz, I.; Roveri, N. Formation of Calcium Phosphates by Vapour Diffusion in Highly Concentrated Ionic Micro-Droplets. In *Crystal Research and Technology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2011; Vol. 46, pp 841–846. <https://doi.org/10.1002/crat.201000635>.
- (64) Iafisco, M.; Morales, J. G.; Hernández-Hernández, M. A.; García-Ruiz, J. M.; Roveri, N. Biomimetic Carbonate-Hydroxyapatite Nanocrystals Prepared by Vapor Diffusion. *Adv. Eng. Mater.* 2010, 12 (7), B218–B223. <https://doi.org/10.1002/adem.201080003>.
- (65) Nassif, N.; Martineau, F.; Syzgantseva, O.; Gobeaux, F.; Willinger, M.; Coradin, T.; Cassaignon, S.; Azaïs, T.; Giraud-Guille, M. M. In Vivo Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic

- Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 2010, 22 (12), 3653–3663. <https://doi.org/10.1021/cm903596q>.
- (66) San Thian, E.; Ahmad, Z.; Huang, J.; Edirisinghe, M. J.; Jayasinghe, S. N.; Ireland, D. C.; Brooks, R. A.; Rushton, N.; Bonfield, W.; Best, S. M. The Role of Electrosprayed Apatite Nanocrystals in Guiding Osteoblast Behaviour. *Biomaterials* 2008, 29 (12), 1833–1843. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.007>.
- (67) Müller, V.; Pagnier, T.; Tadier, S.; Gremillard, L.; Jobbagy, M.; Djurado, E. Design of Advanced One-Step Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications Using the Electrostatic Spray Deposition. *Appl. Surf. Sci.* 2021, 541, 148462. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148462>.
- (68) Aleksandar, D.; Nenad, I.; Mariana, S.; Danica, J.; Dragan, U.; Zlatko, R. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/Fullerenol Nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013, 13, 1–5. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.8671>.
- (69) Sakhno, Y.; Bertinetti, L.; Iafisco, M.; Tampieri, A.; Roveri, N.; Martra, G. Surface Hydration and Cationic Sites of Nanohydroxyapatites with Amorphous or Crystalline Surfaces: A Comparative Study. *J. Phys. Chem. C* 2010, 114 (39), 16640–16648. https://doi.org/10.1021/JP105971S/SUPPL_FILE/JP105971S_SI_001.PDF.
- (70) Bertinetti, L.; Tampieri, A.; Landi, E.; Ducati, C.; Midgley, P. A.; Coluccia, S.; Martra, G. Surface Structure, Hydration, and Cationic Sites of Nanohydroxyapatite: UHR-TEM, IR, and Microgravimetric Studies. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111 (10), 4027–4035. https://doi.org/10.1021/JP066040S/SUPPL_FILE/JP066040SSI20061211_033859.PDF.
- (71) Delgado-López, J. M.; Iafisco, M.; Rodríguez, I.; Tampieri, A.; Prat, M.; Gómez-Morales, J. Crystallization of Bioinspired Citrate-Functionalized Nanoapatite with Tailored Carbonate Content. *Acta Biomater.* 2012, 8 (9), 3491–3499. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.046>.
- (72) Singh, H.; Kumar, R.; Prakash, C.; Singh, S. HA-Based Coating by Plasma Spray Techniques on Titanium Alloy for Orthopedic Applications. In *Materials Today: Proceedings*; Elsevier, 2021; Vol. 50, pp 612–628. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.165>.
- (73) Singh, S.; Prakash, C.; Singh, H. Deposition of HA-TiO₂ by Plasma Spray on β -Phase Ti-35Nb-7Ta-5Zr Alloy for Hip Stem: Characterization, Mechanical Properties, Corrosion, and in-Vitro Bioactivity. *Surf. Coatings Technol.* 2020, 398, 126072. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126072>.
- (74) Morales, J. G.; Clemente, R. R.; Armas, B.; Combescure, C.; Berjoan, R.; Cubo, J.; Martínez, E.; Carmona, J. G.; Garelik, S.; Murtra, J.; Muraviev, D. N. Controlled Nucleation and Growth of Thin Hydroxyapatite Layers on Titanium Implants by Using Induction Heating Technique. *Langmuir* 2004, 20 (13), 5174–5178. <https://doi.org/10.1021/la0363682>.
- (75) Macdonald, D. E.; Betts, F.; Stranick, M.; Doty, S.; Boskey, A. L. Physicochemical Study of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite-Coated Implants in Humans. 2000. <https://doi.org/10.1002/1097->

- (76) Boskey, A. L.; Doty, S. B.; Kudryashov, V.; Mayer-Kuckuk, P.; Roy, R.; Binderman, I. Modulation of Extracellular Matrix Protein Phosphorylation Alters Mineralization in Differentiating Chick Limb-Bud Mesenchymal Cell Micromass Cultures. *Bone* 2008, 42 (6), 1061–1071. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.01.016>.
- (77) Jang, J. H.; Castano, O.; Kim, H. W. Electrospun Materials as Potential Platforms for Bone Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier October 5, 2009, pp 1065–1083. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.008>.
- (78) Kawasaki, K. The SCPP Gene Repertoire in Bony Vertebrates and Graded Differences in Mineralized Tissues. *Dev. Genes Evol.* 2009, 219 (3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/S00427-009-0276-X/FIGURES/5>.
- (79) Wu, Y.; Wang, Y.; Tian, S.; Jing, Y.; Zhuang, J.; Guo, L.; Jia, D.; Zhou, Y. Hydrothermal Fabrication of RGO/Apatite Layers on AZ31 Magnesium Alloy for Enhanced Bonding Strength and Corrosion Resistance. *Appl. Surf. Sci.* 2019, 470, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.086>.
- (80) Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; De With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nat. Mater.* 2010 912 2010, 9 (12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>.
- (81) Marsell, R.; Einhorn, T. A. The Biology of Fracture Healing. *Injury* 2011, 42 (6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2011.03.031>.
- (82) Loi, F.; Córdova, L. A.; Pajarinen, J.; Lin, T. hua; Yao, Z.; Goodman, S. B. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone*. Elsevier May 1, 2016, pp 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>.
- (83) Kumagai, K.; VasANJI, A.; Drazba, J. A.; Butler, R. S.; Muschler, G. F. Circulating Cells with Osteogenic Potential Are Physiologically Mobilized into the Fracture Healing Site in the Parabiotic Mice Model. *J. Orthop. Res.* 2008, 26 (2), 165–175. <https://doi.org/10.1002/jor.20477>.
- (84) Osta, B.; Benedetti, G.; Miossec, P. Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation February 13, 2014, p 80339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
- (85) Fong, E. L. S.; Chan, C. K.; Goodman, S. B. Stem Cell Homing in Musculoskeletal Injury. *Biomaterials* 2011, 32 (2), 395–409. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.101>.
- (86) Seeman, E. Bone Modeling and Remodeling. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. Begel House Inc. 2009, pp 219–233. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i3.40>.

- (87) Gupta, H. S.; Seto, J.; Wagermaier, W.; Zaslansky, P.; Boesecke, P.; Fratzl, P. Cooperative Deformation of Mineral and Collagen in Bone at the Nanoscale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103 (47), 17741–17746. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604237103>.
- (88) Fillingham, Y.; Jacobs, J. Bone Grafts and Their Substitutes. *Bone Jt. J.* 2016, 98B (1), 6–9. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.98b.36350>.
- (89) Kimmel, D. B. A Paradigm for Skeletal Strength Homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 1993, 8 (2 S), S515–S522. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650081317>.
- (90) Einhorn, T. A.; Gerstenfeld, L. C. Fracture Healing: Mechanisms and Interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group September 30, 2015, pp 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
- (91) Holstein, J. H.; Karabin-Kehl, B.; Scheuer, C.; Garcia, P.; Histing, T.; Meier, C.; Benninger, E.; Menger, M. D.; Pohlemann, T. Endostatin Inhibits Callus Remodeling during Fracture Healing in Mice. *J. Orthop. Res.* 2013, 31 (10), 1579–1584. <https://doi.org/10.1002/jor.22401>.
- (92) Bhumiratana, S.; Bernhard, J. C.; Alfi, D. M.; Yeager, K.; Eton, R. E.; Bova, J.; Shah, F.; Gimble, J. M.; Lopez, M. J.; Eisig, S. B.; Vunjak-Novakovic, G. Tissue-Engineered Autologous Grafts for Facial Bone Reconstruction. *Sci. Transl. Med.* 2016, 8 (343). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAD5904/SUPPL_FILE/8-343RA83_SM.PDF.
- (93) Fratzl, P.; Weinkamer, R. Nature's Hierarchical Materials. *Progress in Materials Science*. Pergamon November 1, 2007, pp 1263–1334. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2007.06.001>.
- (94) Serhan, C. N.; Savill, J. Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End. *Nat. Immunol.* 2005 612 2005, 6 (12), 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>.
- (95) Montinari, M. R.; Minelli, S.; De Caterina, R. The First 3500 years of Aspirin History from Its Roots – A Concise Summary. *Vascul. Pharmacol.* 2019, 113, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2018.10.008>.
- (96) Tsutsumi, S.; Gotoh, T.; Tomisato, W.; Mima, S.; Hoshino, T.; Hwang, H. J.; Takenaka, H.; Tsuchiya, T.; Mori, M.; Mizushima, T. Endoplasmic Reticulum Stress Response Is Involved in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004, 11 (9), 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401436>.
- (97) Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Organ Damage: A Current Perspective. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier October 1, 2020, p 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.
- (98) Budoff, P. W. Use of Mefenamic Acid in the Treatment of Primary Dysmenorrhea. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 1979, 241 (25), 2713–2716. <https://doi.org/10.1001/jama.1979.03290510021018>.
- (99) Pandey, J.; Ali, A.; Gupta, A. K. Synthesis and Evaluation of Some New 2-(5-(4-

- Benzamidobenzylidene)-2,4-Dioxothiazolidin-3-Yl)Acetic Acid Analogs as Aldose Reductase Inhibitors. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2017, 10 (1), 62–66. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i1.12073>.
- (100) Dhalla, I. A.; Mamdani, M. M.; Sivilotti, M. L. A.; Kopp, A.; Qureshi, O.; Juurlink, D. N. Prescribing of Opioid Analgesics and Related Mortality before and after the Introduction of Long-Acting Oxycodone. *CMAJ* 2009, 181 (12), 891–896. <https://doi.org/10.1503/cmaj.090784>.
- (101) Daniels, M. J. D.; Rivers-Auty, J.; Schilling, T.; Spencer, N. G.; Watremez, W.; Fasolino, V.; Booth, S. J.; White, C. S.; Baldwin, A. G.; Freeman, S.; Wong, R.; Latta, C.; Yu, S.; Jackson, J.; Fischer, N.; Koziel, V.; Pillot, T.; Bagnall, J.; Allan, S. M.; Paszek, P.; Galea, J.; Harte, M. K.; Eder, C.; Lawrence, C. B.; Brough, D. Fenamate NSAIDs Inhibit the NLRP3 Inflammasome and Protect against Alzheimer’s Disease in Rodent Models. *Nat. Commun.* 2016, 7 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms12504>.
- (102) Wichmann, M. A.; Cruickshanks, K. J.; Carlsson, C. M.; Chappell, R.; Fischer, M. E.; Klein, B. E. K.; Klein, R.; Schubert, C. R. NSAID Use and Incident Cognitive Impairment in a Population-Based Cohort. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2016, 30 (2), 105–112. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000098>.
- (103) Piazza, G. A.; Keeton, A. B.; Tinsley, H. N.; Whitt, J. D.; Gary, B.; Mathew, B.; Singh, R.; Grizzle, W. E.; Reynolds, R. C. NSAIDs: Old Drugs Reveal New Anticancer Targets. *Pharmaceuticals. Molecular Diversity Preservation International* May 25, 2010, pp 1652–1667. <https://doi.org/10.3390/ph3051652>.
- (104) James, D. S. The Multisystem Adverse Effects of NSAID Therapy. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 1999, 99 (11), 1–7. <https://doi.org/10.7556/JAOA.1999.02>.
- (105) Dreischulte, T.; Morales, D. R.; Bell, S.; Guthrie, B. Combined Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Diuretics and/or Renin-Angiotensin System Inhibitors in the Community Increases the Risk of Acute Kidney Injury. *Kidney Int.* 2015, 88 (2), 396–403. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.101>.
- (106) Bhalani, D. V.; Nutan, B.; Kumar, A.; Singh Chandel, A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute* August 23, 2022, p 2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>.
- (107) Ting, J. M.; Porter, W. W.; Mecca, J. M.; Bates, F. S.; Reineke, T. M. Advances in Polymer Design for Enhancing Oral Drug Solubility and Delivery. *Bioconjugate Chemistry. American Chemical Society* April 18, 2018, pp 939–952. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00646>.
- (108) Hua, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. *Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.* April 28, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00524>.

- (109) Alqahtani, M. S.; Kazi, M.; Alsenaidy, M. A.; Ahmad, M. Z. *Advances in Oral Drug Delivery. Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.* February 19, 2021, p 618411. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.618411>.
- (110) Berge, S. M.; Bighley, L. D.; Monkhouse, D. C. *Pharmaceutical Salts. J. Pharm. Sci.* 1977, 66 (1), 1–19. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660104>.
- (111) Almarsson, Ö.; Peterson, M. L.; Zaworotko, M. *The A to Z of Pharmaceutical Cocrystals: A Decade of Fast-Moving New Science and Patents.* <http://dx.doi.org/10.4155/ppa.12.29> 2012, 1 (3), 313–327. <https://doi.org/10.4155/PPA.12.29>.
- (112) Berry, D. J.; Steed, J. W. *Pharmaceutical Cocrystals, Salts and Multicomponent Systems; Intermolecular Interactions and Property Based Design. Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier August 1, 2017, pp 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.03.003>.
- (113) Norton, L. R. *Food and Drug Administration. British Medical Journal.* 2007, pp 55–56. <https://doi.org/10.1136/bmj.39049.545880.BE>.
- (114) Medicines Agency, E. *Reflection Paper on the Use of Cocrystals of Active Substances in Medicinal Products; 2015.* www.ema.europa.eu/contact (accessed 2024-04-28).
- (115) Trask, A. V. *An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. Molecular Pharmaceutics. American Chemical Society* May 2007, pp 301–309. <https://doi.org/10.1021/mp070001z>.
- (116) Kumar, A.; Kumar, S.; Nanda, A. *A Review about Regulatory Status and Recent Patents of Pharmaceutical Co-Crystals. Adv. Pharm. Bull.* 2018, 8 (3), 355–363. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.042>.
- (117) Grothe, E.; Meekes, H.; Vlieg, E.; Ter Horst, J. H.; De Gelder, R. *Solvates, Salts, and Cocrystals: A Proposal for a Feasible Classification System. Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (6), 3237–3243. https://doi.org/10.1021/ACS.CGD.6B00200/ASSET/IMAGES/LARGE/CG-2016-002009_0008.JPEG.
- (118) Babu, N. J.; Nangia, A. *Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. Cryst. Growth Des.* 2011, 11 (7), 2662–2679. https://doi.org/10.1021/CG200492W/ASSET/IMAGES/LARGE/CG-2011-00492W_0028.JPEG.
- (119) Bavishi, D. D.; Borkhataria, C. H. *Spring and Parachute: How Cocrystals Enhance Solubility. Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 2016, 62 (3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.PCRYSGROW.2016.07.001>.
- (120) Elder, D. P.; Holm, R.; De Diego, H. L. *Use of Pharmaceutical Salts and Cocrystals to Address the Issue of Poor Solubility. International Journal of Pharmaceutics. Elsevier* August 30, 2013, pp 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.028>.

- (121) Shayanfar, A.; Asadpour-Zeynali, K.; Jouyban, A. Solubility and Dissolution Rate of a Carbamazepine–Cinnamic Acid Cocrystal. *J. Mol. Liq.* 2013, 187, 171–176. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2013.06.015>.
- (122) Arenas-García, J. I.; Herrera-Ruiz, D.; Morales-Rojas, H.; Höpfl, H. Interrelation of the Dissolution Behavior and Solid-State Features of Acetazolamide Cocrystals. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017, 96, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.025>.
- (123) Chen, J. M.; Li, S.; Lu, T. B. Pharmaceutical Cocrystals of Ribavirin with Reduced Release Rates. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14 (12), 6399–6408. <https://doi.org/10.1021/cg501247x>.
- (124) Perumalla, S. R.; Sun, C. C. Enabling Tablet Product Development of 5-Fluorocytosine through Integrated Crystal and Particle Engineering. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103 (4), 1126–1132. <https://doi.org/10.1002/jps.23876>.
- (125) Klepser, T. B.; Kelly, M. W. Metformin Hydrochloride: An Antihyperglycemic Agent. *American Journal of Health-System Pharmacy.* Oxford Academic April 15, 1997, pp 893–903. <https://doi.org/10.1093/ajhp/54.8.893>.
- (126) Sun, X.; Du, S.; Sun, Y.; Li, H.; Yu, C. P.; Guo, J.; Wang, Y.; Yu, S.; Cheng, Y.; Xue, F. Solubility Measurement and Data Correlation of Metformin Hydrochloride in Four Aqueous Binary Solvents and Three Pure Solvents from 283.15 to 323.15 K. *J. Chem. Eng. Data* 2021, 66 (8), 3282–3292. https://doi.org/10.1021/ACS.JCED.1C00338/SUPPL_FILE/JE1C00338_SI_001.PDF.
- (127) Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59 (7), 603–616. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.05.010>.
- (128) Hiendrawan, S.; Veriansyah, B.; Widjojokusumo, E.; Soewandhi, S. N.; Wikarsa, S.; Tjandrawinata, R. R. Physicochemical and Mechanical Properties of Paracetamol Cocrystal with 5-Nitroisophthalic Acid. *Int. J. Pharm.* 2016, 497 (1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.12.001>.
- (129) Aitipamula, S.; Banerjee, R.; Bansal, A. K.; Biradha, K.; Cheney, M. L.; Choudhury, A. R.; Desiraju, G. R.; Dikundwar, A. G.; Dubey, R.; Duggirala, N.; Ghogale, P. P.; Ghosh, S.; Goswami, P. K.; Goud, N. R.; Jetti, R. R. K. R.; Karpinski, P.; Kaushik, P.; Kumar, D.; Kumar, V.; Moulton, B.; Mukherjee, A.; Mukherjee, G.; Myerson, A. S.; Puri, V.; Ramanan, A.; Rajamannar, T.; Reddy, C. M.; Rodriguez-Hornedo, N.; Rogers, R. D.; Row, T. N. G.; Sanphui, P.; Shan, N.; Shete, G.; Singh, A.; Sun, C. C.; Swift, J. A.; Thaimattam, R.; Thakur, T. S.; Kumar Thaper, R.; Thomas, S. P.; Tothadi, S.; Vangala, V. R.; Variankaval, N.; Vishweshwar, P.; Weyna, D. R.; Zaworotko, M. J. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What’s in a Name? *Cryst. Growth Des.* 2012, 12 (5), 2147–2152. https://doi.org/10.1021/CG3002948/ASSET/IMAGES/LARGE/CG-2012-002948_0007.JPEG.
- (130) Sanphui, P.; Goud, N. R.; Khandavilli, U. B. R.; Nangia, A. Fast Dissolving Curcumin Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11 (9), 4135–4145. <https://doi.org/10.1021/cg200704s>.

- (131) Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H. Trimorphs of a Pharmaceutical Cocrystal Involving Two Active Pharmaceutical Ingredients: Potential Relevance to Combination Drugs. *CrystEngComm* 2009, 11 (9), 1823–1827. <https://doi.org/10.1039/B904616J>.
- (132) Chadha, R.; Saini, A.; Arora, P.; Jain, D. S.; Dasgupta, A.; Guru Row, T. N. Multicomponent Solids of Lamotrigine with Some Selected Coformers and Their Characterization by Thermoanalytical, Spectroscopic and X-Ray Diffraction Methods. *CrystEngComm* 2011, 13 (20), 6271–6284. <https://doi.org/10.1039/c1ce05458a>.
- (133) Thipparaboina, R.; Kumar, D.; Chavan, R. B.; Shastri, N. R. Multidrug Co-Crystals: Towards the Development of Effective Therapeutic Hybrids. *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends March 1, 2016, pp 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.001>.
- (134) Gadade, D. D.; Pekamwar, S. S. Pharmaceutical Cocrystals: Regulatory and Strategic Aspects, Design and Development. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences December 22, 2016, pp 479–494. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.062>.
- (135) Newman, A.; Wenslow, R. Solid Form Changes during Drug Development: Good, Bad, and Ugly Case Studies. *AAPS Open* 2016 21 2016, 2 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S41120-016-0003-4>.
- (136) Schultheiss, N.; Newman, A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Crystal Growth and Design*. American Chemical Society June 3, 2009, pp 2950–2967. <https://doi.org/10.1021/cg900129f>.
- (137) Etter, M. C. Encoding and Decoding Hydrogen-Bond Patterns of Organic Compounds. *Acc. Chem. Res.* 1990, 23 (4), 120–126. <https://doi.org/10.1021/ar00172a005>.
- (138) Brock, C. P.; Dunitz, J. D. Towards a Grammar of Crystal Packing. *Chem. Mater.* 1994, 6 (8), 1118–1127. https://doi.org/10.1021/CM00044A010/SUPPL_FILE/CM00044A010_SI_001.PDF.
- (139) Desiraju, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering—A New Organic Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 1995, 34 (21), 2311–2327. <https://doi.org/10.1002/ANIE.199523111>.
- (140) Aakeröy, C. B.; Fasulo, M. E.; Desper, J. Cocrystal or Salt: Does It Really Matter? *Mol. Pharm.* 2007, 4 (3), 317–322. <https://doi.org/10.1021/mp060126o>.
- (141) Delori, A.; Galek, P. T. A.; Pidcock, E.; Patni, M.; Jones, W. Knowledge-Based Hydrogen Bond Prediction and the Synthesis of Salts and Cocrystals of the Anti-Malarial Drug Pyrimethamine with Various Drug and GRAS Molecules. *CrystEngComm* 2013, 15 (15), 2916–2928. <https://doi.org/10.1039/c3ce26765b>.
- (142) Bhattacharya, S.; Peraka, K. S.; Zaworotko, M. J. The Role of Hydrogen Bonding in Co-Crystals. *Monogr. Supramol. Chem.* 2018, 2018-January (24), 33–79. <https://doi.org/10.1039/9781788012874-00033>.

- (143) Etter, M. C.; MacDonald, J. C.; Bernstein, J. Graph-set Analysis of Hydrogen-bond Patterns in Organic Crystals. *Acta Crystallogr. Sect. B* 1990, 46 (2), 256–262. <https://doi.org/10.1107/S0108768189012929>.
- (144) Forgacs, P.; Provost, J.; Touche, A.; Guenard, D.; Thal, C.; Guilhem, J. Structures de l'odyendane et l'odyendene Deux Nouveaux Quassinoides d'odyendea Gabonensis (Pierre) Engl. Simaroubacees. *Tetrahedron Lett.* 1985, 26 (29), 3457–3460. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)98663-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)98663-5).
- (145) Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Edgington, P. R.; Kessler, M.; Macrae, C. F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R. New Software for Searching the Cambridge Structural Database and Visualizing Crystal Structures. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 2002, 58 (3 PART 1), 389–397. <https://doi.org/10.1107/S0108768102003324>.
- (146) Bučar, D. K.; Day, G. M.; Halasz, I.; Zhang, G. G. Z.; Sander, J. R. G.; Reid, D. G.; MacGillivray, L. R.; Duer, M. J.; Jones, W. The Curious Case of (Caffeine):(Benzoic Acid): How Heteronuclear Seeding Allowed the Formation of an Elusive Cocrystal. *Chem. Sci.* 2013, 4 (12), 4417–4425. <https://doi.org/10.1039/C3SC51419F>.
- (147) Williams, J. H. The Molecular Electric Quadrupole Moment and Solid-State Architecture. *Acc. Chem. Res.* 1993, 26 (11), 593–598. https://doi.org/10.1021/AR00035A005/ASSET/AR00035A005.FP.PNG_V03.
- (148) Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. The Halogen Bond. *Chem. Rev.* 2016, 116 (4), 2478–2601. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00484/ASSET/IMAGES/CR-2015-00484K_M002.GIF.
- (149) Baldrighi, M.; Cavallo, G.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. Halogen Bonding and Pharmaceutical Cocrystals: The Case of a Widely Used Preservative. *Mol. Pharm.* 2013, 10 (5), 1760–1772. <https://doi.org/10.1021/mp300574j>.
- (150) Shiraki, K.; Takata, N.; Takano, R.; Hayashi, Y.; Terada, K. Dissolution Improvement and the Mechanism of the Improvement from Cocrystallization of Poorly Water-Soluble Compounds. *Pharm. Res.* 2008, 25 (11), 2581–2592. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9676-2>.
- (151) Steed, K. M.; Steed, J. W. Packing Problems: High Z' Crystal Structures and Their Relationship to Cocrystals, Inclusion Compounds, and Polymorphism. *Chem. Rev.* 2015, 115 (8), 2895–2933. <https://doi.org/10.1021/cr500564z>.
- (152) Karimi-Jafari, M.; Padrela, L.; Walker, G. M.; Croker, D. M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. *Crystal Growth and Design.* American Chemical Society October 3, 2018, pp 6370–6387. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>.

- (153) Ibrahim, A. Y.; Forbes, R. T.; Blagden, N. Spontaneous Crystal Growth of Co-Crystals: The Contribution of Particle Size Reduction and Convection Mixing of the Co-Formers. *CrystEngComm* 2011, 13 (4), 1141–1152. <https://doi.org/10.1039/C004371K>.
- (154) Nartowski, K. P.; Khimyak, Y. Z.; Berry, D. J. Tuning the Spontaneous Formation Kinetics of Caffeine: Malonic Acid Co-Crystals. *CrystEngComm* 2016, 18 (15), 2617–2620. <https://doi.org/10.1039/c6ce00353b>.
- (155) Maheshwari, C.; Jayasankar, A.; Khan, N. A.; Amidon, G. E.; Rodríguez-Hornedo, N. Factors That Influence the Spontaneous Formation of Pharmaceutical Cocrystals by Simply Mixing Solid Reactants. *CrystEngComm* 2009, 11 (3), 493–500. <https://doi.org/10.1039/b812264d>.
- (156) Jayasankar, A.; Good, D. J.; Rodríguez-Hornedo, N. Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals. *Mol. Pharm.* 2007, 4 (3), 360–372. <https://doi.org/10.1021/mp0700099>.
- (157) Moradiya, H. G.; Islam, M. T.; Halsey, S.; Maniruzzaman, M.; Chowdhry, B. Z.; Snowden, M. J.; Douroumis, D. Continuous Cocrystallisation of Carbamazepine and Trans-Cinnamic Acid via Melt Extrusion Processing. *CrystEngComm* 2014, 16 (17), 3573–3583. <https://doi.org/10.1039/c3ce42457j>.
- (158) Moradiya, H. G.; Islam, M. T.; Scoutaris, N.; Halsey, S. A.; Chowdhry, B. Z.; Douroumis, D. Continuous Manufacturing of High Quality Pharmaceutical Cocrystals Integrated with Process Analytical Tools for In-Line Process Control. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (6), 3425–3434. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00402>.
- (159) Hu, Y.; Gniado, K.; Erxleben, A.; McArdle, P. Mechanochemical Reaction of Sulfathiazole with Carboxylic Acids: Formation of a Cocrystal, a Salt, and Coamorphous Solids. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14 (2), 803–813. <https://doi.org/10.1021/cg401673z>.
- (160) Friščič, T.; Jones, W. Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst. Growth Des.* 2009, 9 (3), 1621–1637. <https://doi.org/10.1021/CG800764N>.
- (161) Padrela, L.; De Azevedo, E. G.; Velaga, S. P. Powder X-Ray Diffraction Method for the Quantification of Cocrystals in the Crystallization Mixture. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012, 38 (8), 923–929. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.633263>.
- (162) Hasa, D.; Schneider Rauber, G.; Voinovich, D.; Jones, W. Cocrystal Formation through Mechanochemistry: From Neat and Liquid-Assisted Grinding to Polymer-Assisted Grinding. *Angew. Chemie* 2015, 127 (25), 7479–7483. <https://doi.org/10.1002/ange.201501638>.
- (163) Lombard, J.; Smith, V. J.; Le Roex, T.; Haynes, D. A. Crystallisation of Organic Salts by Sublimation: Salt Formation from the Gas Phase. *CrystEngComm* 2020, 22 (45), 7826–7831. <https://doi.org/10.1039/d0ce01470b>.
- (164) Volkwyn, A. L.; Haynes, D. A. Crystallization of Organic Salts and Co-Crystals by Sublimation: The Effect of Experimental Conditions. *Cryst. Growth Des.* 2023, 23 (11), 8212–8220.

<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.3c00931>.

- (165) Lombard, J.; Haynes, D. A.; Le Roex, T. Assessment of Co-Sublimation for the Formation of Multicomponent Crystals. *Cryst. Growth Des.* 2020, 20 (12), 7840–7849. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01148>.
- (166) Shekunov, B. Y.; York, P. Crystallization Processes in Pharmaceutical Technology and Drug Delivery Design. *J. Cryst. Growth* 2000, 211 (1), 122–136. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00819-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00819-2).
- (167) Rohani, S. Applications of the Crystallization Process in the Pharmaceutical Industry. *Frontiers of Chemical Engineering in China*. Springer March 11, 2010, pp 2–9. <https://doi.org/10.1007/s11705-009-0297-z>.
- (168) Sarraguça, M. C.; Paisana, M.; Pinto, J.; Lopes, J. A. Real-Time Monitoring of Cocrystallization Processes by Solvent Evaporation: A near Infrared Study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016, 90, 76–84. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2015.12.025>.
- (169) Weyna, D. R.; Shattock, T.; Vishweshwar, P.; Zaworotko, M. J. Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution. *Cryst. Growth Des.* 2009, 9 (2), 1106–1123. <https://doi.org/10.1021/CG800936D>.
- (170) Malamataris, M.; Ross, S. A.; Douroumis, D.; Velaga, S. P. Experimental Cocrystal Screening and Solution Based Scale-up Cocrystallization Methods. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier August 1, 2017, pp 162–177. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.006>.
- (171) Xuan, B.; Chen, Y. C. S.; Wong, K. C.; Chen, R.; Lo, P. S.; Lakerveld, R.; Tong, H. H. Y.; Chow, S. F. Impact of Cocrystal Solution-State Stability on Cocrystal Dissociation and Polymorphic Drug Recrystallization during Dissolution. *Int. J. Pharm.* 2021, 610, 121239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121239>.
- (172) Pawar, N.; Saha, A.; Nandan, N.; Parambil, J. V. Solution Cocrystallization: A Scalable Approach for Cocrystal Production. *Cryst.* 2021, Vol. 11, Page 303 2021, 11 (3), 303. <https://doi.org/10.3390/CRYST11030303>.
- (173) Du, M.; Zhang, Z. H.; Zhao, X. J.; Cai, H. Synthons Competition/Prediction in Cocrystallization of Flexible Dicarboxylic Acids with Bent Dipyridines. *Cryst. Growth Des.* 2006, 6 (1), 114–121. https://doi.org/10.1021/CG050229W/SUPPL_FILE/CG050229WSI20050717_110113.CIF.
- (174) Eshtiagh-Hosseini, H.; Aghabozorg, H.; Mirzaei, M.; Beyramabadi, S. A.; Eshghi, H.; Morsali, A.; Shokrollahi, A.; Aghaei, R. Hydrothermal Synthesis, Experimental and Theoretical Characterization of a Novel Cocrystal Compound in the 2:1 Stoichiometric Ratio Containing 6-Methyluracil and Dipicolinic Acid. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011, 78 (5), 1392–1396. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.01.016>.

- (175) Takata, N.; Shiraki, K.; Takano, R.; Hayashi, Y.; Terada, K. Cocrystal Screening of Stanolone and Mestanolone Using Slurry Crystallization. *Cryst. Growth Des.* 2008, 8 (8), 3032–3037. <https://doi.org/10.1021/cg800156k>.
- (176) Haskins, M. M.; Zaworotko, M. J. Screening and Preparation of Cocrystals: A Comparative Study of Mechanochemistry vs Slurry Methods. *Cryst. Growth Des.* 2021, 21 (7), 4141–4150. https://doi.org/10.1021/ACS.CGD.1C00418/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CG1C00418_0009.GIF.
- (177) Aher, S.; Dhumal, R.; Mahadik, K.; Paradkar, A.; York, P. Ultrasound Assisted Cocrystallization from Solution (USSC) Containing a Non-Congruently Soluble Cocrystal Component Pair: Caffeine/Maleic Acid. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010, 41 (5), 597–602. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.012>.
- (178) FriiĆ, T.; Childs, S. L.; Rizvi, S. A. A.; Jones, W. The Role of Solvent in Mechanochemical and Sonochemical Cocrystal Formation: A Solubility-Based Approach for Predicting Cocrystallisation Outcome. *CrystEngComm* 2009, 11 (3), 418–426. <https://doi.org/10.1039/B815174A>.
- (179) Omori, M.; Uekusa, T.; Oki, J.; Inoue, D.; Sugano, K. Solution-Mediated Phase Transformation at Particle Surface during Cocrystal Dissolution. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020, 56, 101566. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101566>.

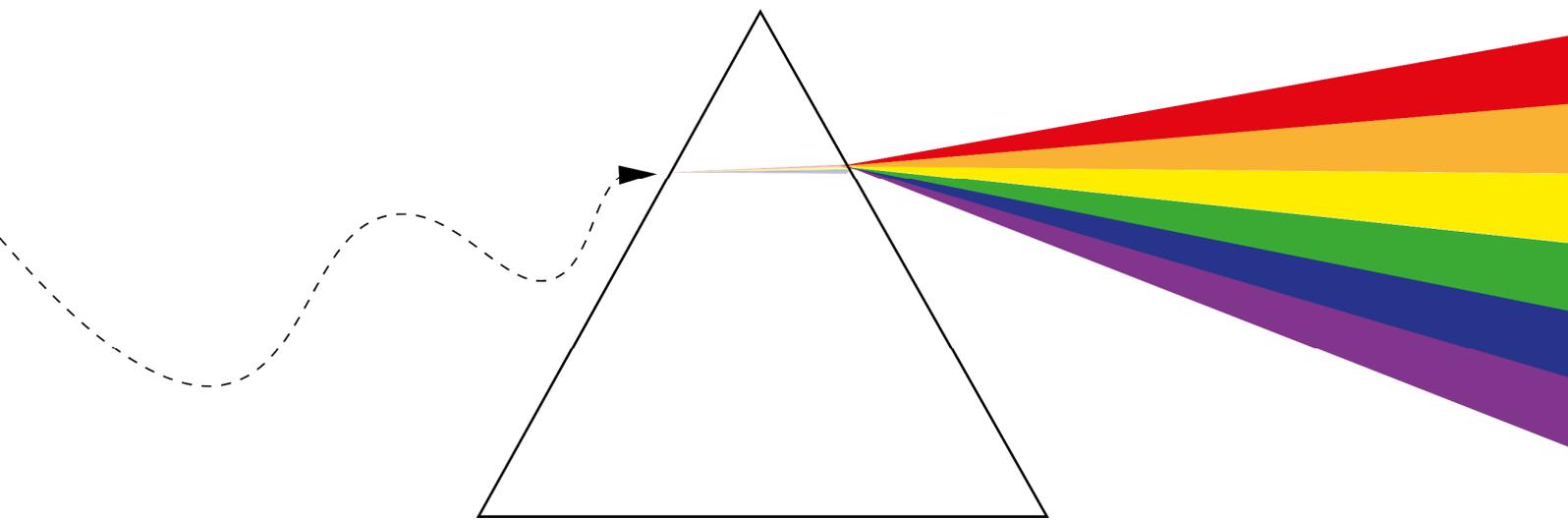
1.2. Objetivos

Considerando los antecedentes y argumentos expuestos, esta Tesis doctoral plantea el desarrollo de materiales híbridos bioinspirados con propiedades personalizadas, para su aplicación en biomedicina e ingeniería tisular. En concreto, se centra en el desarrollo de materiales multicomponente de apatito y de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, y persigue los siguientes objetivos:

- Preparación de nanopartículas biomiméticas de apatito dopadas con Tb^{3+} con propiedades luminiscentes.
- Preparación de nanopartículas de apatito dopadas con metales de transición (Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) con propiedades osteoinductoras, a partir de $CaCO_3$ biogénico de conchas marinas.
- Preparación de nanocomposites grafeno/apatito y óxido de grafeno/apatito con propiedades mecánicas, biológicas y luminiscentes adaptadas.
- Diseño y preparación de nuevas formas sólidas multicomponente de fármacos antiinflamatorios no esteroideos con polifenoles isoméricos como coformadores.
- Diseño y preparación de nuevas formas sólidas multicomponente de tipo fármaco-fármaco combinando AINEs con ciprofloxacino (antibacteriano) o metformina (antidiabético) como coformadores.
- Diseño de una estrategia basada en cocrystalización, para aumentar la carga adsorbida de fármacos antiinflamatorios en nanotransportadores de apatito, para su uso en liberación controlada de fármacos.

CAPÍTULO 2

METODOS EXPERIMENTALES



2.1. Difracción de rayos X

2.1.1. Difracción de rayos X de polvo

Los análisis de difracción de rayos X de polvo (del inglés *powder X-ray diffraction*, PXRD) se realizaron a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker D8 Advance Vario (Bruker-AXS, Karlsruhe, Alemania) operando a 40kV y 40mA, equipado con un detector LYNXEYE y radiación $\text{CuK}\alpha_1$ (1.5406 Å). El rango angular y el tiempo de muestreo depende de las muestras analizadas. Para muestras inorgánicas de Ap, los difractogramas se tomaron en un rango angular de 5–70° (2θ) con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo total de medida de 4 horas. Para muestras orgánicas, el rango angular fue de 5–50° (2θ) con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo total de medida de 30 minutos. Los análisis cuantitativos se realizaron utilizando el método de Rietveld implementado en el software TOPAS 7¹⁸⁰ (Bruker AXS, Bruker GmbH, Karlsruhe, Alemania).

2.1.2. Difracción de rayos X de monocristal

Para la difracción de rayos X de monocristal (del inglés *single-crystal X ray diffraction*, SCXRD), los cristales se colocaron en soportes Micromounts™ de MiTeGen siempre trabajando en condiciones inertes y usando perfluoropolietileno como aceite protector durante la manipulación. Los datos se recogieron con un difractómetro Bruker D8 Venture y se procesaron con el software APEX4.¹⁸¹ Las estructuras cristalinas se resolvieron mediante el método “*intrinsic phasing*”, que reveló la posición de todos los átomos, menos los hidrógenos. Estos átomos se refinaron en F^2 con un procedimiento de mínimos cuadrados de matriz completa utilizando parámetros de desplazamiento anisotrópicos.¹⁸² Todos los átomos de hidrógeno se localizaron en mapas de diferencias de Fourier y se incluyeron como contribuciones fijas sobre los átomos a los que estaban conectados, usando parámetros de desplazamiento térmico isotrópicos (1.2 ó 1.5 veces los del átomo respectivo). En todo este proceso se utilizó el software Olex2¹⁸³ como interfaz gráfica.¹⁸³ Los cálculos geométricos y las imágenes expuestas se realizaron con Mercury¹⁸⁴ y Olex2.

2.2. Espectroscopía

2.2.1. Espectroscopía de Infrarrojos

Los espectros de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) se registraron en la región 4000-400 cm^{-1} usando un Hyperion 3000 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada de cristal de diamante (Bruker, Massachusetts, EE. UU).

2.2.2. Espectroscopía RAMAN

Los espectros de Raman se registraron con un espectrómetro LabRAMHR (Jobin–Yvon, Horiba, Japón) equipado con un láser de diodo que emite a una longitud de onda de 532 nm, y un detector de carga acoplada enfriado por Peltier (1064 x 256 píxeles).

2.2.3. Espectroscopía de luminiscencia

Las propiedades luminiscentes se registraron utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Varian (Varian Australia, Mulgrave). Se utilizó un accesorio de superficie frontal para obtener los espectros de luminiscencia, el tiempo de vida de luminiscencia (τ) y las intensidades relativas de luminiscencia (R.L.I.) en polvo, mientras que un portamuestras Peltier conectado a un módulo de control de temperatura (Agilent Technologies, Madrid, España) se utilizó para obtener los espectros de luminiscencia y la R.L.I. de las suspensiones líquidas. Los parámetros instrumentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 545$ nm, tiempo de retardo (t_d) = 120 μs y tiempo de compuerta (t_g) = 5 ms. Para las muestras de polvo, el voltaje del fotomultiplicador fue de 470 V y el ancho de la rendija de excitación/emisión fue de 5/5 nm, mientras que, para las partículas en suspensión acuosa, el voltaje del fotomultiplicador fue de 800 V y el ancho de la rendija de excitación/emisión fue de 10/10 nm. Los espectros de excitación y emisión se registraron dentro del rango de 250-500 nm y 500-750 nm, respectivamente. Las medidas del τ se registraron usando $\lambda_{\text{exc/em}} = 375/475$ nm, $t_d = 100$ μs , $t_g = 0,010$ ms (t_g), voltaje del fotomultiplicador de 600 V, ancho de la rendija de excitación/emisión de 10/10 nm y 100 ciclos.

2.3. Microscopía

2.3.1. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un microscopio TEM Libra 120 Plus (Carl Zeiss, Jena, Alemania) operando a 80 kV y provisto de Microanálisis por espectroscopía de pérdida de energía de electrones. Las muestras se dispersaron en etanol absoluto ($\geq 99,8\%$ v/v) y se depositaron en microrejillas de cobre recubiertas con película de carbono FORMVAR

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y de difracción de electrones en área seleccionada (SAED) se realizaron con un instrumento TITAN G2 60-300 FEI (FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.) operando a 300 kV. El instrumento está equipado con un detector Super X EDX para realizar microanálisis elemental y microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) y de imagen de campo oscuro de alto ángulo (HAADF).

2.3.2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó utilizando un microscopio SEM JEOL modelo JSM 6490-LV (JEOL Inc.) con filamento de tungsteno, operando a 10 kV. Antes del análisis, las muestras se depositaron en un desecador de vacío JEOL EMDSC-U10A (JEOL Inc, MA, EE. UU.). El análisis elemental se realizó con el mismo equipo mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX).

2.3.3. Microscopía de fuerza atómica

Los estudios de rugosidad superficial, fuerza de adherencia, módulo elástico y gradiente de campo eléctrico (ΔV) se realizaron mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) en un equipo de AFM BIO 3D MFP de Asylum Research (Asylum Research, Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Se utilizó una sonda de silicio con una punta esférica de 30 nm, 224 líneas y puntos de escaneo, una velocidad de escaneo de 0,80 Hz y un tamaño de escaneo de 2,00 μm . Se aplicó una carga compresiva de 10 nN para inducir la deformación elástica de las partículas. Los datos se utilizaron, siguiendo el modelo de Hertz, para obtener una medida cuantitativa del módulo elástico de la superficie. En cada muestra, la deformación se evaluó en un área de 10x10 puntos, (100 puntos por muestra).

2.4. Espectrometría

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se realizó en un espectrómetro Perkin Elmer NexION 300D ICP (Perkin Elmer). Mientras que la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se realizó en un espectrómetro Perkin Elmer OPTIMA 8300 (Perkin Elmer).

2.5. Dispersión dinámica de luz y movilidad electroforética

La distribución del tamaño de partícula (PSD) y la movilidad electroforética (potencial ζ) se analizaron con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) en suspensiones acuosas ($\sim 0,5$ mg/mL, 25°C) usando celdas de poliestireno desechables. Para las mediciones de potencial- ζ frente al pH, se empleó un MPT-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) para ajustar el pH de las suspensiones. Como agentes de titulación se utilizaron soluciones diluidas de HCl y NaOH (0,25 M y 0,1 M, respectivamente).

2.6. Análisis térmico

El comportamiento térmico de las muestras de Ap se estudió mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) simultáneo en un dispositivo STA 449F3 Jupiter (Netzsch GmbH, Selb, Alemania), operando bajo flujo de aire en un rango de temperatura de 20°C hasta 1100°C con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

El análisis térmico de las muestras orgánicas se realizó mediante DSC-TGA simultáneo en un Mettler Toledo TGA/DSC1 (Mettler Toledo, Columbus, OH, EE. UU.). Las muestras (3–5 mg) se colocaron en recipientes de aluminio sellados y se calentaron en una corriente de nitrógeno (100 mL min^{-1}) de 25 a 400°C a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. El calorímetro se calibró con indio de pureza 99.99 % (p.m.: 156.4°C ; DH: 28.14 J/g).

2.7. Estudios de solubilidad

Los estudios de solubilidad se llevaron a cabo siguiendo el método “*shake flask method*”.¹⁸⁵ Para ello se prepararon soluciones saturadas añadiendo un exceso de sólido a un volumen determinado de solvente en diferentes condiciones (agua mili Q, buffer PBS pH 6.8 o buffer KCl pH 1.2). Las suspensiones se agitaron durante 24 horas a 25 °C en un baño de agua hasta alcanzar el equilibrio termodinámico. Para el estudio del perfil de disolución, durante este tiempo, se tomaron alícuotas de la suspensión, se filtraron a través de 0.22 µm y se analizaron directamente mediante espectrofotometría UV-Vis. Se realizaron diluciones para obtener valores de absorbancia medibles. Las mediciones de solubilidad se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

En los casos en los que los espectros de absorción UV-Vis solapan (MMFs de ciprofloxacino y metformina), se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los experimentos de HPLC se realizaron con un sistema Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un desgasificador de solvente, bomba, auto-muestreador y detector de matriz de diodos y un método de elución isocrática. La adquisición y el análisis de datos se realizaron utilizando el software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La **tabla 2.1** muestra los parámetros relevantes en los estudios de HPLC de las sales de CIP y MTF.

Tabla 2.1. Parámetros de los experimentos de HPLC

Parámetro	CIPs	MTF
Columna	C18 (4.6 mm × 150 mm, 4 µm tamaño de partícula) Phenomenex	100 C18 (4.6 mm × 150 mm, 3 µm tamaño de partícula) Scharlau
Fase móvil	20% fase A : 80% fase B. A= 20% acetonitrilo (0.1% Ácido fórmico v/v) B= 80% agua (0.1% Ácido fórmico v/v).	10% fase A : 90% fase B. A= 10% acetonitrilo (0.1% Ácido fórmico v/v) B= 90% agua (0.1% Ácido fórmico v/v).
Flujo	0.5 mL/min	1 mL/min
Volumen de inyección	10 µL	10 µL
Temperatura de la columna	25 °C	25 °C
Temperatura de la muestra	25 °C	25 °C
λ_{\max}	277 nm	233 nm
Tiempo de retención	4.5 min	1 min 54 sg
Ecuación de calibrado	$y(x) = 0.0096 \cdot x + 2.6239$	$y(x) = 31.8835 \cdot x + 59.4972$
R ²	0.9994	0.9939
Rango de calibración	2– 232 mg/L (ppm)	5– 100 mg/L (ppm)

2.8. Estudios teóricos de etenzamida y sus cocristales

Los cálculos energéticos teóricos recogidos en el Capítulo 4.1 se realizaron utilizando el software Gaussian-16¹⁸⁶ en el nivel de teoría PBE0¹⁸⁷-D3¹⁸⁸/def2-TZVP¹⁸⁹ utilizando el enfoque supramolecular para el apilamiento $\pi \cdots \pi$ de los dímeros, o la teoría cuántica de "átomos-en-moléculas"¹⁹⁰ en el mismo nivel mediante el programa AIMAll¹⁹¹ para las redes de enlaces de hidrógeno.¹⁹¹ Para el apilamiento π, π , se aplicó la corrección BSSE y para los enlaces de hidrógeno se utilizaron los valores de densidad de energía cinética en los puntos críticos de enlace, que aparecen al aplicar la metodología propuesta por Espinosa *et al.*¹⁹² Las isosuperficies NCIplot^{193,194} se generaron utilizando el programa AIMAll utilizando la función de onda PBE0-D3/def2-TZVP. Los potenciales electrostáticos moleculares (MEP) se calcularon utilizando la isosuperficie de 0.001 a.u. como la mejor aproximación de las interacciones de Van der Waals.

2.9. Actividad antimicrobiana

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron frente a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 9144) y *Escherichia coli* (*E.coli*, CECT 101) utilizando el método de difusión en agar de Kirby–Bauer.¹⁹⁵ Las cepas se cultivaron en agar TSA, se suspendieron en una solución de NaCl al 0.9%, cuya concentración de bacterias se ajustó por comparación con un estándar de McFarland de 0.5 (1.5×10^8 bacterias/mL), y luego se sembraron en placas de agar Mueller–Hinton. Se impregnaron papeles de filtro estériles con un diámetro de 5 mm con 2.5 μ L de una solución de DMSO de cada compuesto con una concentración final de 1 mg/mL, lo que resultó en una cantidad final de 2.5 μ g para cada sólido. Se impregnó un papel de filtro estéril con 2.5 μ L de DMSO como control. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C, y los halos de inhibición se midieron en milímetros.

2.10. Ensayos biológicos *in vitro*

2.10.1. Células seleccionadas

Para los estudios recogidos en el Capítulo 3.1, se utilizó 1) la línea celular HeLa, de cáncer de cuello uterino humano, obtenida de ATCC, 2) las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y de melanoma A375, obtenidas del Biobanco (Sistema Sanitario Público Andaluz, Granada, España) y 3) fibroblastos humanos, aislados del tejido cutáneo

de una cirugía de abdominoplastia mediante una digestión enzimática utilizando colagenasa I (Sigma Aldrich).

Para los estudios del Capítulo 3.2 se utilizaron 1) células m17.ASC, un clon inmortalizado de células madre mesenquimales de ratón, 2) células MS1, una línea celular endotelial pancreática murina (ATCC - CRL-2279TM). Las células m17.ASC también fueron utilizadas en el Capítulo 3.3.

2.10.2. Cultivos celulares

Las líneas celulares HeLa, MCF7, A375, fibroblastos y MS1 se cultivaron y mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma, St. Louis, MO, USA),

La línea celular m17.ASC se cultivó y mantuvo en medio Claycomb (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de FBS, 100 µg/mL de estreptomicina y penicilina (Sigma-Aldrich) y 2 mM de L-glutamina.

Todas las células se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5 % de CO₂), los medios se cambiaron cada dos días y las células se dividieron cuando alcanzaron el 80-90 % de confluencia en una proporción de 1:10.

2.10.3. Citotoxicidad

La citotoxicidad de las nAp dopadas con Tb³⁺ se evaluó frente a las líneas celulares HeLa, MCF7, A375 y fibroblastos. Se sembraron en placas de 96 pocillos a una confluencia de 4x10³ células/pocillo en DMEM. Las placas se incubaron a 37 °C en un 5% de CO₂. 24 h después de la siembra, las células se trataron con 100, 10, 1 y 0,1 µg/mL de nAp con Tb³⁺ = 0,001, 0,010, 0,015 y 0,020 M. 72 h después del tratamiento, se eliminó el medio y se añadieron 100 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Después de 3 h de incubación a 37 °C y 5% de CO₂, se eliminó el MTT y se añadieron 100 µL de DMSO. Se midió la densidad óptica en un lector de placas múltiples (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer) a 570 nm. La viabilidad de las células no tratadas y su valor de absorbancia correspondiente se tomaron como el 100 % de viabilidad celular, mientras que los valores obtenidos de las células

expuestas a los diferentes tratamientos se refirieron a este valor. Se realizaron tres experimentos utilizando 3 repeticiones para cada muestra.

Para evaluar la citotoxicidad de las nAp dopadas con Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} en el Capítulo 3.2, se sembraron 5000 y 6000 células de m17.ASC y MS1, respectivamente, en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas en sus medios de crecimiento respectivos. Se añadieron diferentes concentraciones que van desde 0.1 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de muestra en 100 μL de medio fresco. Después de 72 horas de incubación, se evaluó la viabilidad celular añadiendo 20 μL de solución de MTT (5 mg/mL en tampón PBS) a cada pocillo. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se eliminaron los sobrenadantes y se añadieron 125 μL de HCl 0.2 N en 2-propanol para disolver los cristales de formazán. Se transfirieron 100 μL de cada pocillo a una placa de 96 pocillos limpia y se midió la densidad óptica en un lector de placas múltiples (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer) a 570 nm. La viabilidad de las células no tratadas y su valor de absorbancia se tomaron como el 100 % de viabilidad celular, mientras que los valores obtenidos de las células expuestas a los diferentes tratamientos se refirieron a este valor. Se realizaron tres experimentos utilizando 3 repeticiones para cada muestra. Este mismo procedimiento se realizó para evaluar la citotoxicidad de los nanocomposites de G y GO frente a células m17.ASC en el Capítulo 3.3.

2.10.4. Citometría de flujo y microscopía confocal

Para los estudios de citometría de flujo las líneas celulares HeLa, MCF7, A375 y fibroblastos se trataron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nAp dopadas con $\text{Tb}^{3+} = 0,01 \text{ M}$ y 0,02 durante 12 h y 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min y se lavaron con PBS. Las células se procesaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Para la microscopía confocal, la línea celular A375 se sembró en una placa de ocho pocillos (Ibidi, Alemania) a una densidad de 8000 células/pocillo y se realizó el mismo. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 AOBS.

2.10.5. Ensayos de diferenciación osteogénica

2.10.5.1. Protocolo de diferenciación

Las células m17.ASC se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1.5×10^5 células por pocillo. Después de 24 horas, las células se trataron con un medio osteogénico (DMEM suplementados 10 % de FBS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato y 10 nM de dexametasona) durante 10-14 días. Los efectos osteoinductores de las nanopartículas se evaluaron mediante el cocultivo de las células junto con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de muestra en medio de crecimiento DMEM. El medio se reemplazó cuidadosamente cada 3 días y las muestras solo se añadieron en el momento inicial, para evitar problemas de acumulación.

2.10.5.2. PCR cuantitativa en tiempo real

El estudio de los niveles de ARNm se realizó mediante análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR). Inicialmente, se extrajo el ARN total utilizando Trizol (Invitrogen Life Technologies). La concentración y calidad del ARN se evaluaron posteriormente utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.).

Después de la purificación del ARN y el tratamiento con DNAsa I (Thermo Scientific), 1 μg de ARN se transcribió inversamente en ADN complementario (ADNc) utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena RevertAidTM H Minus (Thermo Fisher Scientific) con *primers* de oligo(dT). Los ensayos de genes se realizaron por triplicado para cada tratamiento en un volumen de reacción de 12 μL , que consistió en 1 μL de los productos de cADN, 6 μL de Sso-Fast EVA Green SMX (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y 500 nM de ambos *primers* hacia adelante y hacia atrás, como se detalla en la **tabla 2.2**.

La q-RT-PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador en tiempo real automatizado CFX96 (Bio-Rad) con las siguientes condiciones de ciclo: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguida de 45 ciclos a 98 °C durante 5 segundos, y un paso de apareamiento/extensión durante 5 segundos a 60 °C, con recopilación de datos. Posteriormente, se realizó un análisis de curva de fusión al final de estos ciclos, que iba desde 65 hasta 95 °C, con una lectura de placa cada 0.5 °C. Esta etapa fue crucial para verificar la especificidad del producto de amplificación al confirmar

una temperatura de fusión de pico único. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Bio-Rad CFX Manager, y las expresiones génicas se calcularon utilizando el método DDCT, con β -actina como control interno para la normalización.

Tabla 2.1. Secuencia de los *primers* utilizados para la q-RT-PCR.

Gen objetivo	Secuencia	Secuencia inversa
BMP2	GGGACCCGCTGTCTTCTAGT	TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC
COL1A1	CCCCAACCCCTGGAAACAGAC	GGTCACGTTTCAGTTGGTCAAAGG
COL1A2	CCTCCGTCTACTGTCCACTGA	ATTGGAGCCCTGGATGAGCA
BGLAP	GGCCCTGAGTCTGACAAAGC	GCTCGTCACAAGCAGGGTTAA
SPP1	AGCAAGAAACTCTTCCAAGCAA	GTGAGATTCGTCAGATTCATCCG
RANKL	TGTACTIONTCGAGCGCAGATG	AGGCTTGTTTCATCCTCCTG
B-ACTIN	GATGACCCAGATCATGTTTGA	GGAGAGCATAGCCCTCGTAG

2.10.5.3. Tinción de fosfatasa alcalina

Para evaluar la diferenciación osteogénica a los 14 días de tratamiento, se llevó a cabo la tinción de fosfatasa alcalina (ALP) como se describe en Dupont *et al.*¹⁹⁶ Después de la aplicación del protocolo de diferenciación, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con 4 % de PFA durante 15 minutos y se tiñeron con un kit de detección de ALP (Millipore, Merk Millipore, Milán, Italia). Las células tratadas con el medio osteogénico se tomaron como referencia para los experimentos de diferenciación. Se utilizó la microscopía óptica a 200 aumentos para analizar y fotografiar las muestras. La cuantificación de ALP se realizó midiendo la intensidad violeta de la tinción en ImageJ. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.10.5.4. Tinción Rojo Alizarina

La tinción con rojo alizarina se utilizó para evaluar la deposición de calcio de las células m17.ASC tras 14 días de tratamiento con las nanopartículas. Las células se lavaron con PBS pH 7.2, se fijaron con PFA (2 % en peso en PBS) y se tiñeron con solución de rojo alizarina (40 mM, pH 4,1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el precipitado inespecífico, las células teñidas se lavaron tres veces con agua bidestilada. A continuación, se utilizó microscopía óptica a 200 aumentos para analizar y fotografiar

las muestras. Los depósitos cálcicos se cuantificaron disolviendo la tinción con ácido acético al 10% (Sigma-Aldrich) durante 30 min. A continuación, se transfirieron 150 μ L de cada muestra a una placa de 96 pocillos y se midió la densidad óptica en un lector de pocillos múltiples (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, Perkin Elmer) a 405 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.10.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente usando GraphPad Prism (versión 9.4, San Diego, CA, EE. UU.).¹⁹⁷ El análisis se realizó utilizando un *one-way* ANOVA (Bonferroni) para grupos de 3 experimentos. Los resultados del análisis se expresaron como media \pm desviación estándar y se consideraron las siguientes diferencias estadísticamente significativas: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****).

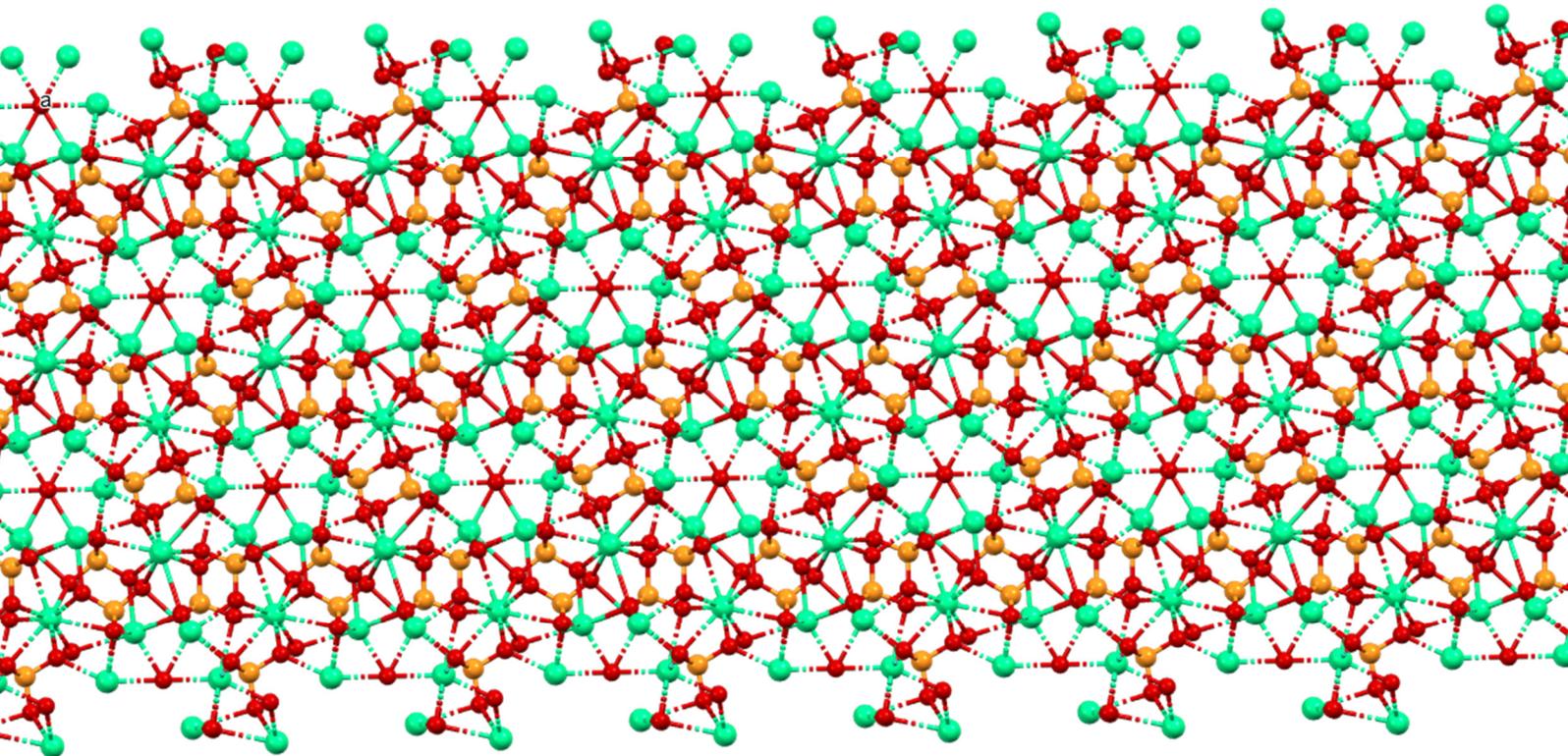
2.11. Referencias

- (180) Coelho, A. A. TOPAS and TOPAS-Academic: An Optimization Program Integrating Computer Algebra and Crystallographic Objects Written in C++. *J. Appl. Crystallogr.* 2018, 51 (1), 210–218. <https://doi.org/10.1107/S1600576718000183>.
- (181) Bruker APEX4. In APEX4 V202.1, Bruker-AXS, Madison, WI, USA, 2022.
- (182) Sheldrick, G. M. SHELXT - Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 2015, 71 (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- (183) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* 2009, 42 (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (184) MacRae, C. F.; Sovago, I.; Cottrell, S. J.; Galek, P. T. A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G. P.; Stevens, J. S.; Towler, M.; Wood, P. A. Mercury 4.0: From Visualization to Analysis, Design and Prediction. *J. Appl. Crystallogr.* 2020, 53 (1), 226–235. <https://doi.org/10.1107/S1600576719014092>.
- (185) Glomme, A.; März, J.; Dressman, J. B. Comparison of a Miniaturized Shake-Flask Solubility Method with Automated Potentiometric Acid/Base Titrations and Calculated Solubilities. *J. Pharm. Sci.* 2005, 94 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/JPS.20212>.
- (186) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. H. Gaussian16 (Revision A.03), 2016. Gaussian16 (Revision A.03), 2016. 2022.
- (187) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* 1996, 77 (18), 3865. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>.
- (188) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A Consistent and Accurate Ab Initio Parametrization of Density Functional Dispersion Correction (DFT-D) for the 94 Elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* 2010, 132 (15). <https://doi.org/10.1063/1.3382344/926936>.
- (189) Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7 (18), 3297–3305. <https://doi.org/10.1039/B508541A>.
- (190) Bader, R. F. W. *A Quantum Theory of Molecular Structure and Its Applications*.
- (191) T. A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA.
- (192) Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen Bond Strengths Revealed by Topological Analyses

- of Experimentally Observed Electron Densities. *Chem. Phys. Lett.* 1998, 285 (3–4), 170–173.
[https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00036-0).
- (193) Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (18), 6498–6506.
https://doi.org/10.1021/JA100936W/SUPPL_FILE/JA100936W_SI_002.PDF.
- (194) Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J. P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. *J. Chem. Theory Comput.* 2011, 7 (3), 625–632.
https://doi.org/10.1021/CT100641A/SUPPL_FILE/CT100641A_SI_001.PDF.
- (195) Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, 45 (4_{ts}), 493–496.
https://doi.org/10.1093/AJCP/45.4_TS.493.
- (196) Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; Elvassore, N.; Piccolo, S. Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction. *Nat.* 2011 4747350 2011, 474 (7350), 179–183.
<https://doi.org/10.1038/nature10137>.
- (197) GraphPad Prism (Versión 9.4, San Diego, CA, EE. UU.).

CAPÍTULO 3

MATERIALES MULTICOMPONENTE DE APATITO



3.1. Síntesis de nanopartículas de apatito biomiméticas dopadas con Tb^{3+} mediante descomplejación térmica

3.1.1. Introducción

Las nanopartículas luminiscentes son materiales tremendamente útiles en nanomedicina o ingeniería de tejidos.¹⁹⁸ En estas áreas los CaPs dopados con elementos lantánidos se han revelado como alternativa a los fluoróforos orgánicos, gracias a su capacidad para emitir fluorescencia en diferentes colores según el ion lantánido dopante, su larga vida media de su luminiscencia y su resistencia al fotoblanqueo.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Entre los CaPs, el Ap ha estado en el foco de la industria farmacéutica para su uso en biomedicina, especialmente en aplicaciones de regeneración ósea, transporte de fármacos para tratamientos de células tumorales o en bioimagen. Todo ello debido a sus excelentes propiedades de biocompatibilidad, bioactividad, biodegradabilidad, alta estabilidad en condiciones fisiológicas y su gran área superficial, lo que se traduce en una gran capacidad para cargar y liberar moléculas orgánicas.^{202,203}

Siguiendo el flujo de trabajos previamente reportados por nuestro grupo de investigación, se ha utilizado el método de descomplejación térmica para la producción de nAp) dopadas con Tb^{3+} .^{71,74,204-206} Este método, no solo permite la síntesis de nAp con propiedades luminiscentes, si no que permite la producción de nAp biomimético recubierto con iones citrato (Cit).²⁰⁷ El dopaje con iones lantánidos como el Tb^{3+} nos permite proporcionar luminiscencia a las ya excelentes y conocidas propiedades biológicas del apatito, aumentando en gran medida las aplicaciones de estas nanopartículas.

Así pues, los objetivos de este capítulo consisten en investigar la preparación de nanopartículas Tb^{3+} :cit-Ap luminiscentes y biomiméticas, analizar sus propiedades físico-químicas en estado sólido y en suspensión acuosa, estudiar su comportamiento en cultivos celulares *in vitro* (citocompatibilidad e internalización celular) y estudiar su potencial como nanosondas de imagen de fluorescencia citoplasmática.

3.1.2. Síntesis de nanopartículas de apatito dopadas con Tb^{3+}

La precipitación de nanopartículas de apatito dopadas con Tb^{3+} se realizó mediante el método de descomplejación térmica de disoluciones Tb^{3+}/Ca^{2+} /citrato/fosfato/carbonato a 80 °C, con $[Tb^{3+}] = 0; 0.001; 0.005; 0.010; 0.015$ y 0.020 M) y $[Ca^{2+}] = 0.100; 0.099; 0.095; 0.090; 0.085$ y 0.080 M, manteniendo la relación $[Tb^{3+}] + [Ca^{2+}] = 0.100$ M. La duración de los experimentos fue de 4 h, 24 h, 96 h y 7

días para evaluar la maduración del apatito. Los precipitados se recuperaron mediante varios ciclos de centrifugación y lavado con agua desionizada milliQ (6 ciclos a 9.000 rpm durante 9 minutos cada uno) y se liofilizaron durante 12 horas (-50 °C y 3 mbar).^{208,209}

3.1.3. Resultados y discusión

3.1.3.1. Propiedades estructurales, composicionales, espectroscópicas, morfológicas y coloidales

Los difractogramas de PXRD de las muestras sin dopar $[\text{Tb}^{3+}] = 0$, y de las muestras dopadas con $[\text{Tb}^{3+}]$ de 0.001 hasta 0.010 M se representan en la **figura 3.1.1**. Estos datos muestran una evolución similar con el tiempo para todas las muestras hasta una concentración de 0.005 M Tb^{3+} . A las 4 horas, se observan las reflexiones fundamentales de la fase apatito (PDF 01-1008), $2\theta = 25.87^\circ$ (002), 31.77° (211), 32.19° (112), 32.90° (300), 33.9° (202) y 39.81° (310), junto a pequeñas reflexiones entre 40° - 55° .^{71,208} La amplitud de los picos es característica de muestras nanocristalinas. En el caso de $[\text{Tb}^{3+}] = 0.010$ M se observan resultados diferentes, ya que, tras 24 horas, los difractogramas muestran picos más estrechos característicos de un material cristalino y de mayor tamaño de partícula, mientras que a los 7 días se aprecian, además, las reflexiones de la fase $\text{TbPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (rabdofano, grupo espacial P3121, PDF 20 1244). Resultados similares se han obtenido para concentraciones de $[\text{Tb}^{3+}] > 0.010$ M, con la diferencia de que se observa un aumento de la línea base a todos los tiempos de maduración, que indica la presencia de una fase amorfa. Estos datos sugieren que en los precipitados obtenidos en estas condiciones no se puede descartar la presencia de una cierta proporción de $\text{TbPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ y ACP amorfos.²¹⁰ El ACP, probablemente dopado con Tb^{3+} , puede haber actuado como precursor de la fase apatítica.

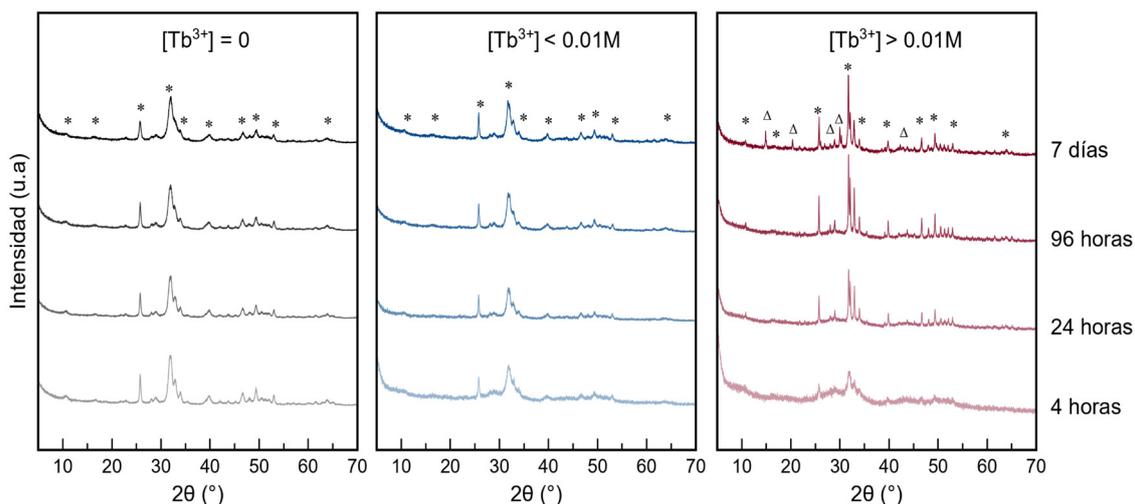


Figura 3.1.1. Difractogramas de PXRd de las nAp dopadas con Tb^{3+} a diferentes tiempos de maduración. *(Apatito, PDF 01-1008); Δ ($TbPO_4 \cdot nH_2O$, PDF 20-1244).

La composición química de los precipitados obtenidos a mayor tiempo de maduración se ha analizado mediante la técnica ICP. Los resultados se muestran en la **tabla 3.1.1** la cual revela que un aumento progresivo de la concentración de Tb^{3+} en solución se traduce en un aumento del contenido de Tb^{3+} en el precipitado y una disminución de los niveles de Ca y P en las nanopartículas independientemente del tiempo de maduración. La relación molar $(Ca+Tb)/P$ en muestras con $[Tb^{3+}] < 0.01 M$, y 96h de maduración oscila entre 1.60 y 1.5, datos que son inferiores a los obtenidos en el hidroxiapatito estequiométrico ($Ca/P = 1.67$). Dicha deficiencia en Ca^{2+} es una característica distintiva de los apatitos biomiméticos. En el caso de muestras preparadas con valores más altos de Tb^{3+} , las proporciones $(Ca+Tb)/P$ disminuyen aún más debido a la presencia de fases de $TbPO_4$.

Los resultados sugieren que el contenido máximo de Tb^{3+} que puede dopar el apatito es de $\sim 12\%$ en peso, datos que coinciden con los reportados por otros autores para nAp dopadas con Tb^{3+} preparadas mediante la técnica sol-gel y reacciones hidrotermales a $200^\circ C$ (8 y 12% en peso respectivamente)^{17,211}. Valores superiores al 12% en peso de Tb^{3+} se explican por la presencia de $TbPO_4 \cdot nH_2O$ amorfo y $TbPO_4 \cdot H_2O$ (fase rabdofano), además de los nAp altamente dopadas, como ocurre en las muestras con $[Tb^{3+}] = 0.015 M$ y $0.020 M$.

Tabla 3.1.1. Composición química de las nanopartículas determinada mediante ICP y TGA, para muestras con tiempos de maduración de 96h y 7 días.

Tb ³⁺ M Tiempo	Ca (wt. %)	P (wt. %)	Tb (wt. %)	(Ca+Tb)/P (mol)	H ₂ O _{ads} (wt%)	H ₂ O _{str} (wt%)	cit (wt%)	CO ₃ ²⁻ (wt%)
0.001M, 96h	31.8 ± 0.7	15.6 ± 0.4	1.59 ± 0.04	1.60 ± 0.01	3.2±0.3	1.8±0.2	1.9±0.2	3.2±0.3
0.001M, 7 d	31.1 ± 0.2	15.2 ± 0.2	1.50 ± 0.01	1.60 ± 0.01	3.4±0.3	2.0±0.2	1.7±0.2	3.5±0.3
0.005M, 96h	26.8 ± 0.7	14.2 ± 0.4	7.33 ± 0.13	1.55 ± 0.01	3.5±0.3	2.0±0.2	1.3±0.1	3.7±0.4
0.005M, 7 d	25.9 ± 0.4	14.0 ± 0.2	7.51 ± 0.11	1.53 ± 0.01	3.9±0.4	2.1±0.2	1.3±0.1	3.7±0.4
0.010M, 96h	21.5 ± 0.4	12.7 ± 0.2	12.80 ± 0.18	1.51 ± 0.01	6.0±0.6	2.7±0.3	1.8±0.2	4.4±0.4
0.010M, 7 d	22.2 ± 0.2	13.7 ± 0.1	14.20 ± 0.16	1.45 ± 0.01	4.5±0.4	2.7±0.3	1.5±0.1	3.6±0.4
0.015M, 7 d	17.0 ± 0.6	11.8 ± 0.4	18.72 ± 0.73	1.43 ± 0.01	7.6±0.8*	3.2±0.3*	2.2±0.2*	2.6±0.3*
0.020M, 7d	14.5 ± 0.4	11.2 ± 0.4	21.93 ± 0.82	1.39 ± 0.01	10.9±1.1*	4.4±0.4*	2.6±0.3*	2.3±0.2*

*Estos valores se ven afectados por la presencia de partículas tanto de TbPO₄·nH₂O amorfo como de TbPO₄·H₂O (rabdozano); H₂O_{ads} es agua adsorbida; H₂O_{str} es agua estructural fuertemente ligada.

El análisis térmico mediante las técnicas DSC y TGA demuestra que las nanopartículas obtenidas presentan un comportamiento térmico similar al reportado para otros Ap carbonatados con carácter biomimético. La **figura 3.1.2** muestra el análisis para la muestra con 0.07 M de Tb³⁺ a modo de referencia, en la que se observan cuatro pérdidas de peso principales que corresponden a (1) pérdida de agua adsorbida (desde la temperatura ambiente hasta ≈ 220°C), (2) pérdida de agua estructural fuertemente ligada (desde ≈ 220°C hasta ≈ 380°C), (3) pérdida de peso debida a la descomposición de las moléculas de citrato adsorbidas (desde ≈ 380°C hasta ≈ 600°C), y (4) pérdida de peso debida a la descomposición de los carbonatos en CO₂ y CaO (desde ~600 °C hasta ~1100 °C). En las muestras preparadas con [Tb³⁺] = 0.015 M y 0.020 M, especialmente a 96 h, las curvas presentan pérdidas de peso adicionales debido a la presencia de la fase amorfa de TbPO₄·nH₂O. Para estas muestras, los contenidos de agua, Cit y carbonato no pueden evaluarse con precisión, por lo que, con objeto de compararlas, hemos proporcionado datos solo para muestras preparadas a 7 días. La **tabla 3.1.1** muestra el contenido de agua, Cit y carbonato de las muestras a los 7 días de maduración. A pesar de que el contenido de Cit y carbonato muestra poca variabilidad, el contenido de agua (tanto adsorbida como

estructural) aumenta con la concentración de Tb^{3+} , particularmente en las muestras de $[Tb^{3+}] > 0.010 M$, debido a la presencia de las ya mencionadas fases de $TbPO_4$ hidratadas.

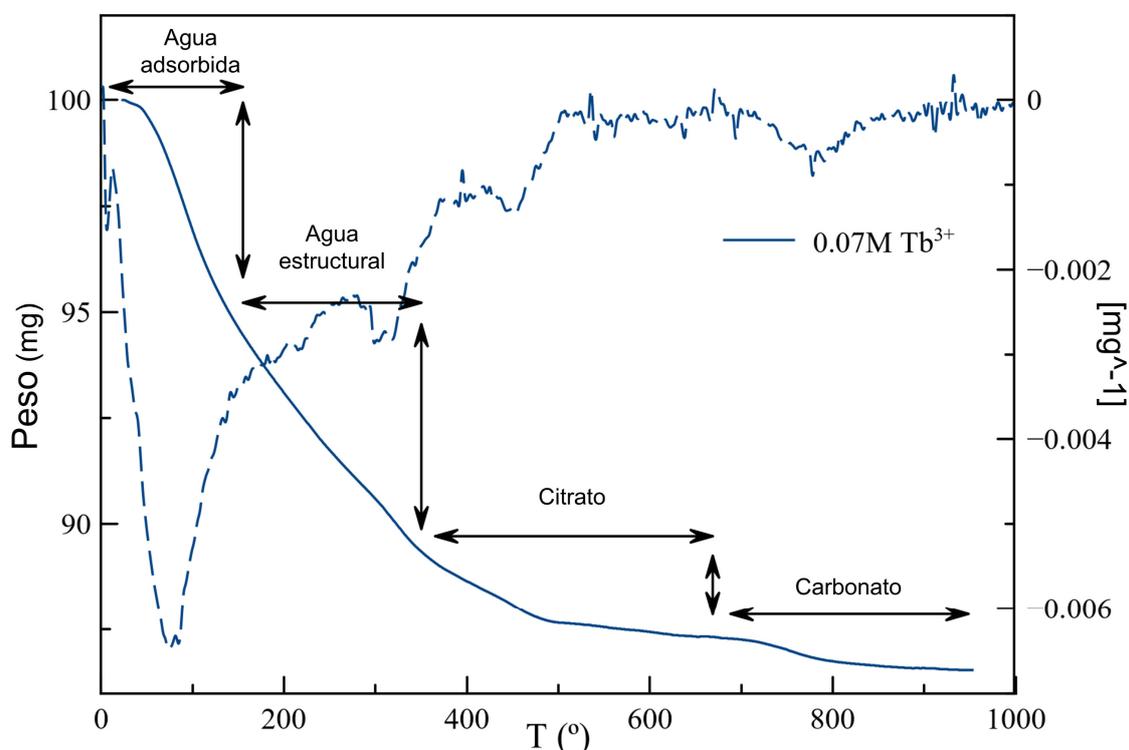


Figura 3.1.2. Pérdidas de peso en la curva de DSC y TGA de la muestra dopada con 0.07 M de Tb^{3+} .

Las imágenes de TEM, SEM y EDX (**Figura 3.1.3**) muestran la morfología de las nanopartículas y un mapeo de su composición elemental. En estas imágenes se observan morfologías cristalinas aciculares con longitudes que oscilan entre 40 y 80 nm para aquellas muestras preparadas a $[Tb^{3+}] \leq 0.005 M$ y tiempos de maduración menores de 7 días (**Figura 3.1.3a-c**). El mapa EDX para estas nAp muestra una composición homogénea de P, Ca y Tb^{3+} (**Figura 3.1.3e-h**). Cuando las concentraciones de Tb^{3+} aumentan, el tamaño de partícula también lo hace, observándose cristales prismáticos de Ap de aproximadamente 300 nm de longitud a las 96h (**Figura 3.1.3d**). A tiempos mayores de maduración prevalecen fenómenos de agregación y aglomeración, de forma que los cristales obtenidos se disponen en aglomerados esféricos, tal y como se observan en las **figuras 3.1.3m-r**. A tiempos cortos (4h) y concentraciones altas de Tb^{3+} ($[Tb^{3+}] > 0.01 M$), se observan muestras amorfas sin orden aparente (**Figura 3.1.3i**), mientras que a las 96 horas se observan nanopartículas amorfas de $TbPO_4$ que coexisten con nAp prismáticas (**Figura 3.1.3j**). A los 7 días, coexisten agregados prismáticos de apatito de

gran tamaño con nanopartículas de TbPO_4 tanto de la fase amorfa como de la fase rabdofano (**Figura 3.1.3o-r**). Los resultados combinados de PXRD y TEM indican que los tiempos de maduración óptimos para obtener nAp dopados con Tb^{3+} son inferiores a 7 días para $\text{Tb}^{3+} = 0.001 \text{ M}$, inferiores a 96 horas para $[\text{Tb}^{3+}] = 0.005 \text{ M}$, y de 4 horas para $[\text{Tb}^{3+}] = 0.010 \text{ M}$.

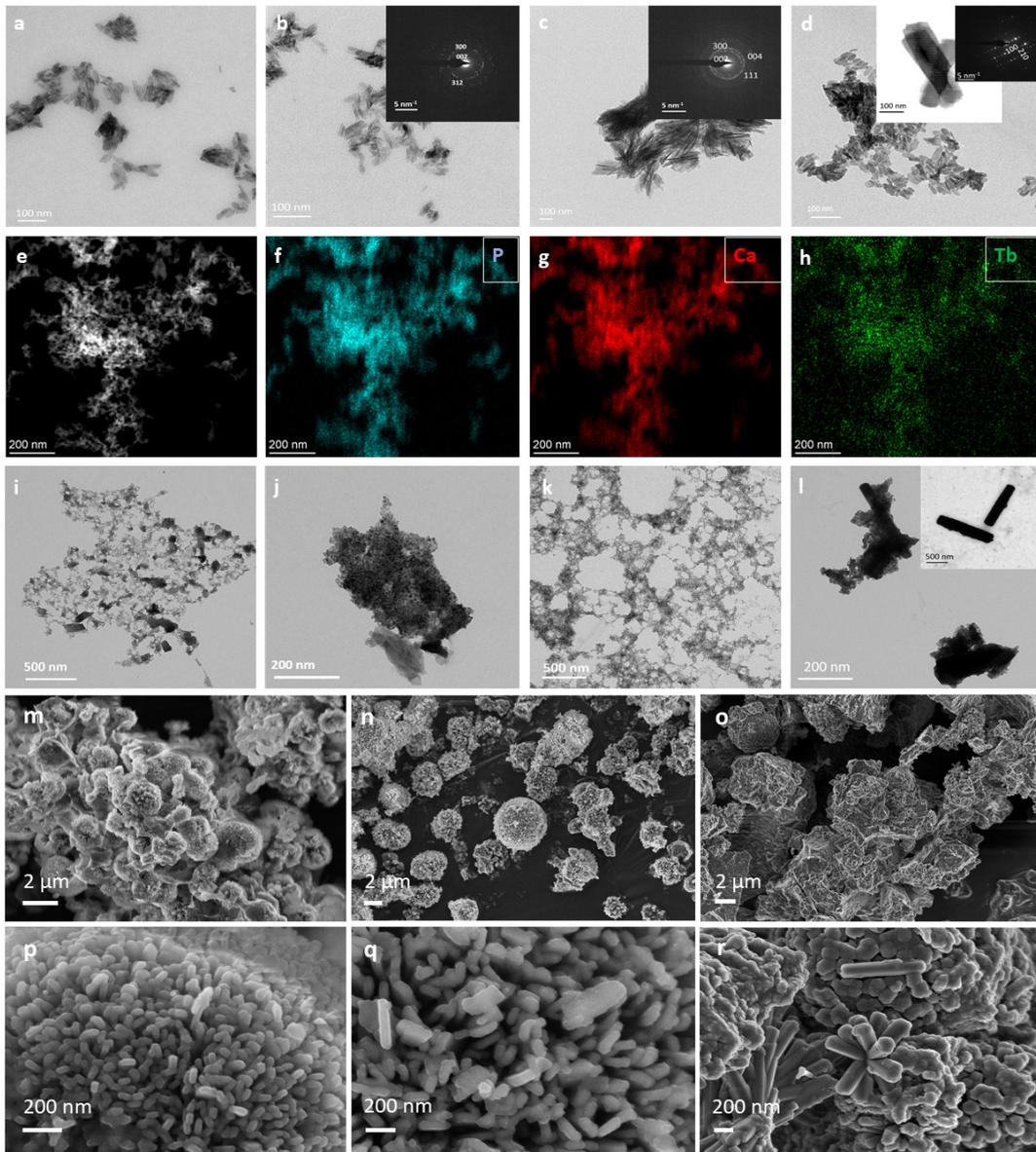


Figura 3.1.3. Imágenes de TEM de las nanopartículas preparadas a diferentes concentraciones de Tb^{3+} y tiempos de maduración. (a) $[\text{Tb}^{3+}] = 0 \text{ M}$, 96 horas; (b) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.001 \text{ M}$, 96 horas; (c) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.005 \text{ M}$, 96 horas; (d) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.010 \text{ M}$, 4 horas; $[\text{Tb}^{3+}] = 0.010 \text{ M}$, 96 horas; (e) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.001 \text{ M}$, 96 horas. (f, g, h) Análisis elemental de P, Ca y Tb mediante EDX. Imágenes HAADF de muestras; (i) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.015 \text{ M}$, 4 horas, (partículas amorfas); (j) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.015 \text{ M}$, 96 horas, $\text{TbPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{TbPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ amorfo y apatita; (k) $[\text{Tb}^{3+}] = 0.020 \text{ M}$, 4 horas, partículas amorfas; (l)

[Tb³⁺] = 0.020 M, 96 horas, apatito prismático y nanopartículas de TbPO₄·H₂O; la imagen insertada primas de Ap tras 7 días de maduración. Imágenes SEM de las muestras obtenidas a 7 días de maduración y concentraciones de Tb³⁺ (m,p) 0.005 M; (n, q) 0.010 M, y (o, r) 0.015 M.

Los espectros FTIR de las muestras dopadas con Tb³⁺ en el rango de concentraciones de 0.001 a 0.01 M, con tiempos de maduración de hasta 96 horas están representados en la **figura 3.1.4a**. Se puede observar una señal con una gran amplitud en el intervalo de 3600 a 2800 cm⁻¹ debida a la tensión del enlace O–H correspondiente al agua adsorbida en las nanopartículas. También se identifican las señales características del nAp en la región 400-1800 cm⁻¹, incluyendo la tensión asimétrica de los grupos PO₄³⁻ (ν₃PO₄) en la región 1000-1100 cm⁻¹, la tensión simétrica ν₁PO₄ a 958-960 cm⁻¹, y los modos de flexión ν₄PO₄ a 608 y 1564 cm⁻¹ y ν₂PO₄ a 470 cm⁻¹.

La presencia de grupos carbonato (CO₃²⁻) se evidencia debido a las bandas localizadas a 1414 cm⁻¹ y 1473 cm⁻¹ (ν₃CO₃), y a la banda intensa a 873 cm⁻¹ (ν₂CO₃). Además, a partir de la relación de áreas de las bandas correspondientes a los modos ν₃CO₃ y ν₁ν₃ PO₄ (rc/p) se puede estimar el grado de carbonatación o porcentaje de carbonato en el Ap.²¹² Para muestras preparadas con [Tb³⁺] = 0.010 M a 96 h el grado de carbonatación estimado es de 4.02 ± 0.5 % en peso, el cual concuerda con los valores determinados por TGA. Estos valores son ligeramente inferiores a los observados en muestras sin dopar, que llegan hasta un 5.9 wt.%.⁷¹ Por último, la señal en 535 cm⁻¹ en el dominio ν₄PO₄ determina la presencia de grupos superficiales HPO₄²⁻ (no-apatíticos). Estas señales en su conjunto determinan el carácter biomimético de las nanopartículas.²¹³

La caracterización espectroscópica Raman se utilizó como técnica complementaria a FTIR y PXRD. La **figura 3.1.4b** muestra los picos más representativos para el Ap ~960 cm⁻¹ (ν₁PO₄), ~430 cm⁻¹ (ν₂PO₄) y ~530 cm⁻¹ (ν₄PO₄). La señal que se observa en ~1072 cm⁻¹ se debe a la combinación de la banda del modo de vibración ν₁CO₃ en 1070 cm⁻¹ con la del modo ν₃PO₄ en 1076 cm⁻¹.^{214,215} Las pequeñas señales observadas en 845 cm⁻¹, se corresponden con el modo δCOO⁻ de los iones Cit.⁷¹ Para muestras preparadas con [Tb³⁺] = 0.015 M a 4 h; y aquellas preparadas con [Tb³⁺] = 0.020 M a cualquier tiempo de maduración, las señales ν₁PO₄ aparecen a 965-967 cm⁻¹, probablemente por la presencia de la fase amorfa de TbPO₄·nH₂O.²¹⁶

La **figura 3.1.4c** muestra la deconvolución de la región ν₂CO₃ (picos ~880 y ~872 cm⁻¹) para la muestra [Tb³⁺] = 0.01 M y 96 horas. La deconvolución muestra los

picos a ~ 880 y ~ 872 cm^{-1} , que se corresponden con sustituciones tipo A y B, en las que los grupos carbonatos reemplazan a grupos OH^- y PO_4^{3-} respectivamente.²¹⁷ Además, todas las muestras presentan la banda a ~ 1590 - 1600 cm^{-1} , correspondiente a la tensión asimétrica de los grupos $-\text{COO}^-$ del Cit.²¹⁸ Estos datos corroboran el carácter biomimético de los nAp obtenidos y complementan los resultados descritos anteriormente.

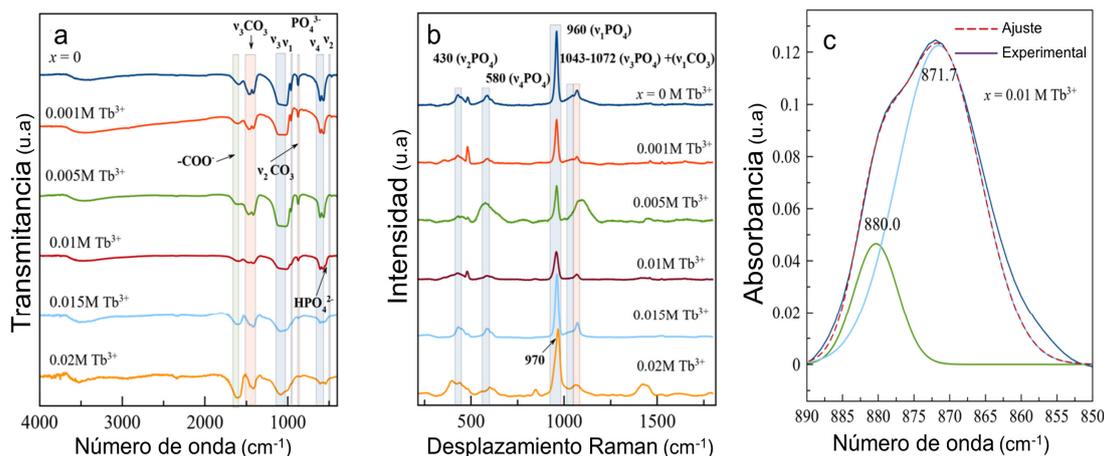


Figura 3.1.4. Espectros FTIR (a) y Raman (b) de muestras con $[\text{Tb}^{3+}]$ que varían de 0 a 0.02M y 96 horas de maduración. (c) Deconvolución de la región $\nu_2\text{CO}_3$ para la muestra $[\text{Tb}^{3+}] = 0.01$ M y 96 horas

La PSD y potencial ζ de las nAp a pH fisiológico es de gran interés para evaluar su utilidad en aplicaciones biomédicas, ya que los fenómenos de agregación/dispersión dependen del tamaño y la carga superficial de las partículas, por lo que cambios en el pH determinan la estabilidad del coloide. Estas características también afectan la formación de la “corona de proteínas” que envuelve las partículas cuando se encuentran en el plasma biológico, hecho a tener en cuenta cuando las nanopartículas se usan como sondas luminiscentes y de como vehículos de transporte y liberación de moléculas orgánicas.^{208,217,219}

La PSD se ha evaluado representado la distribución en volumen (**Figura 3.1.5a**) y la distribución en volumen acumulada (**Figura 3.1.5b**), ya que en ella podemos apreciar visualmente los percentiles de la distribución D_{10} , D_{50} y D_{90} . El percentil D_{10} es el más próximo al tamaño de partícula individual, mientras que D_{50} , mediana de la distribución, se ve afectado en cierta medida por la agregación de partículas. D_{90} está afectado en su totalidad por la agregación de las nanopartículas. En nanopartículas preparadas con

$[\text{Tb}^{3+}] = 0; 0.001; 0.005$ y 0.010 M a las 96 h se registraron valores $D_{10} = 59, 59, 111$ y 103 nm, y valores de D_{50} de $745, 186, 153$ y 210 nm respectivamente. Estos datos demuestran que el dopaje con Tb^{3+} dota a las nanopartículas de una mayor estabilidad en solución acuosa y una menor tendencia a la agregación que los nAp no dopados.

El estudio de las curvas de potencial ζ en función del pH nos permite deducir la influencia de los iones Tb^{3+} y el recubrimiento de Cit en la estabilidad coloidal de las nanopartículas (**Figuras 3.1.5c-f**). En estas medidas, todas las suspensiones de nAp presentan una disminución del potencial ζ a medida que disminuye el pH. Sin embargo, este efecto es significativamente mayor en las nanopartículas recubiertas con Cit. Ello se debe a que el Cit actúa como interfaz entre la solución y la nanopartícula, de tal manera que los iones OH^- y 1 o 2 de sus grupos $-\text{COO}^-$ se orientan hacia la solución, disminuyendo del potencial ζ lo cual favorece la repulsión entre partículas, mejorando la dispersión y la estabilidad del coloide.²²⁰ Por su parte, un aumento de la concentración de Tb^{3+} también intensifica la caída del potencial ζ a valores de $\text{pH} \geq 7$. Estos datos confirman que el Cit y el dopaje con Tb^{3+} actúan en sinergia para mejorar la dispersión de las nanopartículas en suspensión y por ende la estabilidad del coloide, principalmente a $\text{pH} \geq 7$ lo cual puede ser muy útil para aplicaciones *in vivo* y pHs fisiológicos.

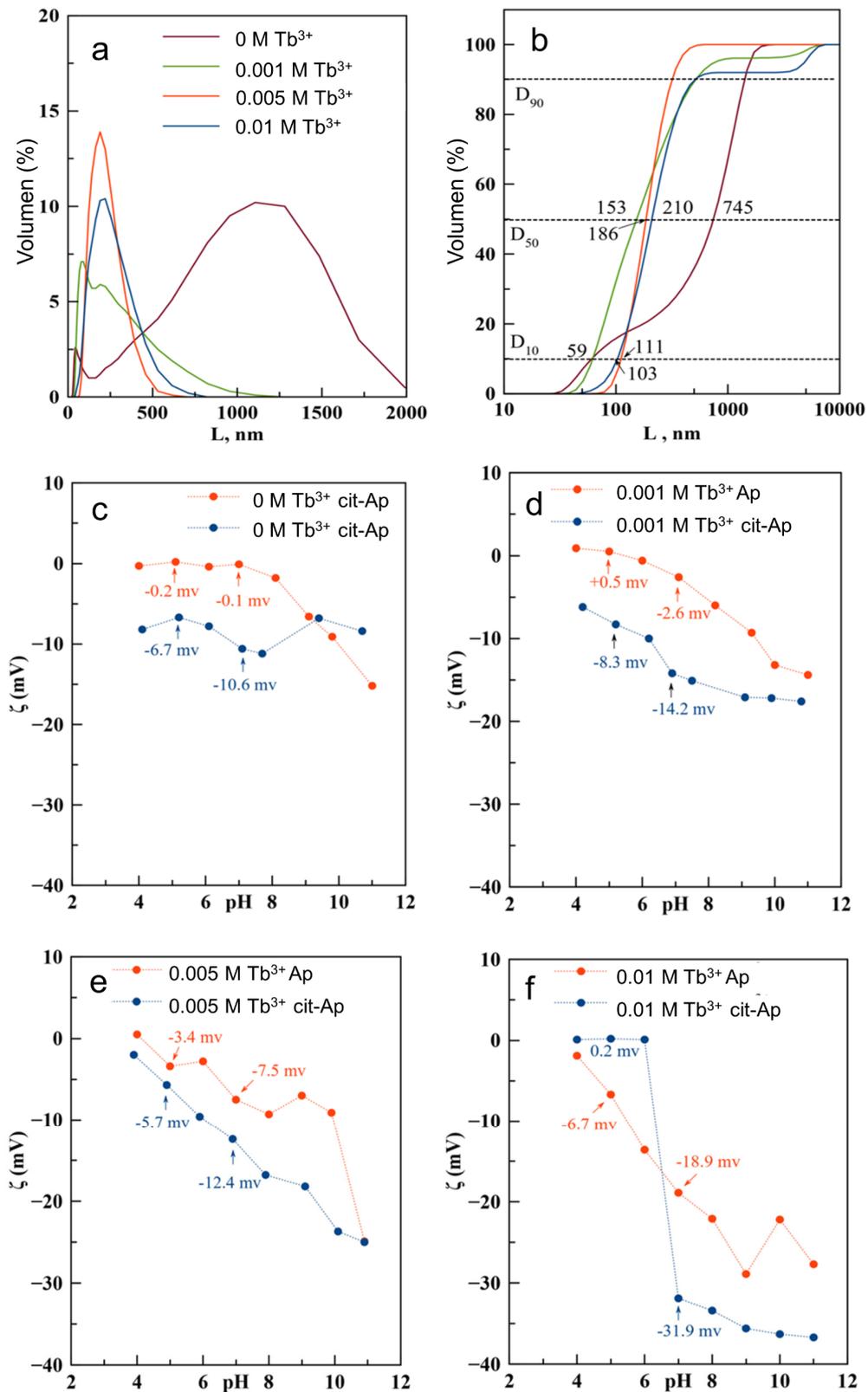


Figura 3.1.5. (a) PSD en volumen. (b) PSD en volumen acumulado. (c-f) Potencial ζ en función del pH de la suspensión de nanopartículas dopadas con Tb^{3+} y recubiertas con Cit, versus nanopartículas dopadas únicamente con $[Tb^{3+}] = 0; 0.001; 0.005$ y 0.010 M, a tiempos de maduración de 96 horas.

3.1.3.2. Estudio de las propiedades luminiscentes en estado sólido y en solución acuosa

Los resultados obtenidos en los estudios de luminiscencia se muestran en la **figura 3.1.6**. Las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) observadas fueron 230, 283, 302, 319, 340, 352, 369 y 375 nm. Las bandas anchas entre 200 y 300 nm, centradas en 230 nm, corresponden a las bandas de transferencia de carga (CTB), que ocurren por la deslocalización de electrones desde el orbital lleno 2p del O^{2-} hacia el orbital 4f parcialmente lleno del Tb^{3+} . Además, esta banda puede atribuirse parcialmente a la transición de transferencia de carga $X^{5+}-O^{2-}$.^{221,222} El resto de λ_{exc} menos intensas son debidas a transiciones ${}^7F_6 \rightarrow {}^5I_8$ y ${}^5F_{4,5} \rightarrow {}^5H_4$, ${}^7F_6 \rightarrow {}^5H_{5,6}$, ${}^7F_6 \rightarrow {}^5H_7$, and ${}^7F_6 \rightarrow {}^5L_{7,8}$, ${}^7F_6 \rightarrow {}^5L_9$, 5D_2 , 5G_5 , ${}^7F_6 \rightarrow {}^5L_{10}$, y ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_6$, 5D_3 .²²³ Dado a que los espectros de emisión son similares en intensidad cuando se usan λ_{exc} 230 nm (UV) y 375 nm (cercano a visible), se decidió usar $\lambda_{exc} = 375$ nm por su mayor potencial en aplicaciones biomédicas. La **figura 3.1.6** también muestra el aspecto visual de los precipitados obtenidos a 96 h, bajo luz blanca y bajo luz UV, donde se visualiza la emisión verde del Tb^{3+} .

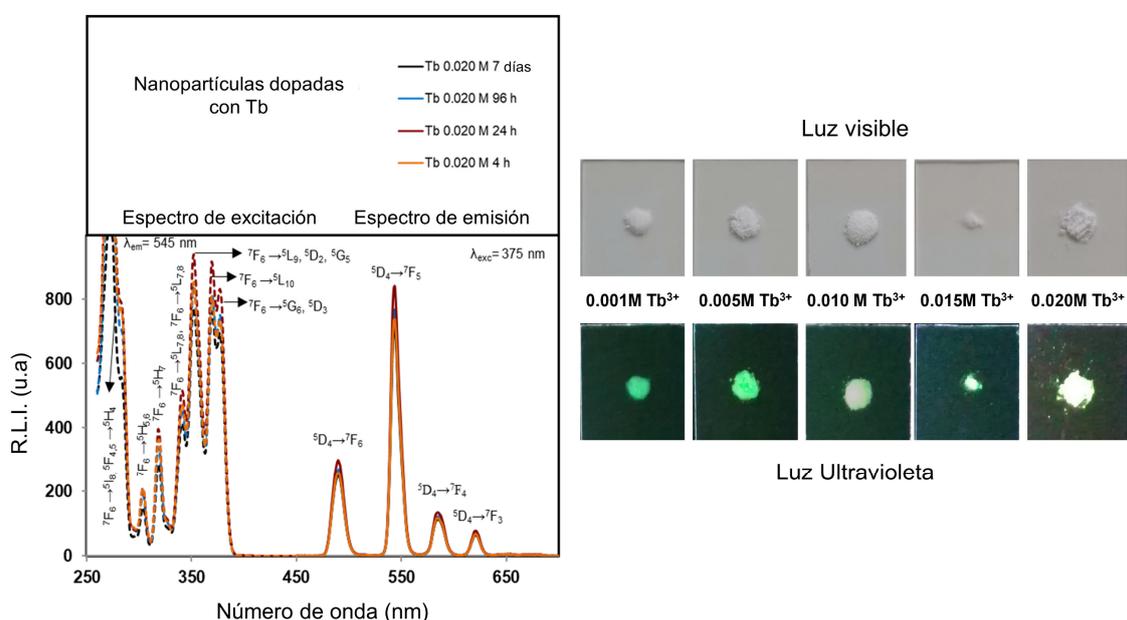


Figura 3.1.6. Espectros no corregidos de excitación (líneas discontinuas) y emisión (líneas sólidas) de las muestras sólidas preparadas con $[Tb^{3+}] = 0.02$ M a 4, 24, 96 h y 7 días. Imágenes de muestras preparadas con diferentes concentraciones Tb^{3+} en tiempos de maduración de 96 h bajo luz solar (arriba) e iluminación con lámpara UV de 254 nm (abajo).

Las diferentes λ_{em} se centran en 491, 545, 585 y 621 nm, las cuales corresponden a las transiciones $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ and $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ del Tb^{3+} , respectivamente.²²⁴ Dado que la λ_{em} de la transición hipersensible sin centro de inversión ($^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, 545 nm para Tb^{3+}) es la que produce una mayor R.L.I., hemos seleccionado esta λ_{em} para el estudio.

En primer lugar, se ha estudiado el efecto del tiempo sobre la R.L.I. usando diferentes concentraciones de Tb^{3+} . Sólo las muestras con $[Tb^{3+}] = 0.010$ M muestran una variación significativa en el R.L.I., fenómeno que se atribuye a la presencia de la fase rabdofano, la cual presenta una menor emisión luminiscente. Esta fase también se ha encontrado en muestras preparadas con $[Tb^{3+}] = 0.015$ M y 0.020 M, pero en dichas muestras también se puede encontrar la fase amorfa $TbPO_4 \cdot nH_2O$, la cual contribuye positivamente al R.L.I. supliendo el efecto negativo del rabdofano en la luminiscencia.²¹¹ Al analizar la evolución del R.L.I. manteniendo constante el tiempo de maduración del Ap y variando la concentración de Tb^{3+} , se observa un aumento lineal en la luminiscencia con el incremento de la concentración de Tb^{3+} en todos los casos, lo cual es un resultado previsible y esperado.²⁰⁸ En cuanto al tiempo de vida de la luminiscencia (τ) se observa que sólo en el caso $[Tb^{3+}] = 0.010$ M, el tiempo de maduración afecta a τ . Al igual que en el caso anterior, este hecho se debe a la presencia de rabdofano en el precipitado. Fijando el tiempo de maduración de las nanopartículas, τ disminuye ligeramente cuando Tb^{3+} aumenta, hecho que es atribuido al aumento del tamaño y cristalinidad de las nanopartículas.

Tal como se observa en la **figura 3.1.8**, las propiedades luminiscentes de las muestras en suspensión acuosa son similares a las observadas en estado sólido. Las propiedades estudiadas (λ_{exc} , λ_{em} , R.L.I. y τ) son las mismas a cualquiera de los pH y temperaturas empleadas en este estudio. Estos resultados, demuestran la estabilidad de las propiedades luminiscentes bajo cambios en estas variables, las cuales son particularmente relevantes para el uso de nanopartículas en ambientes biológicos y estudios *in vivo*.

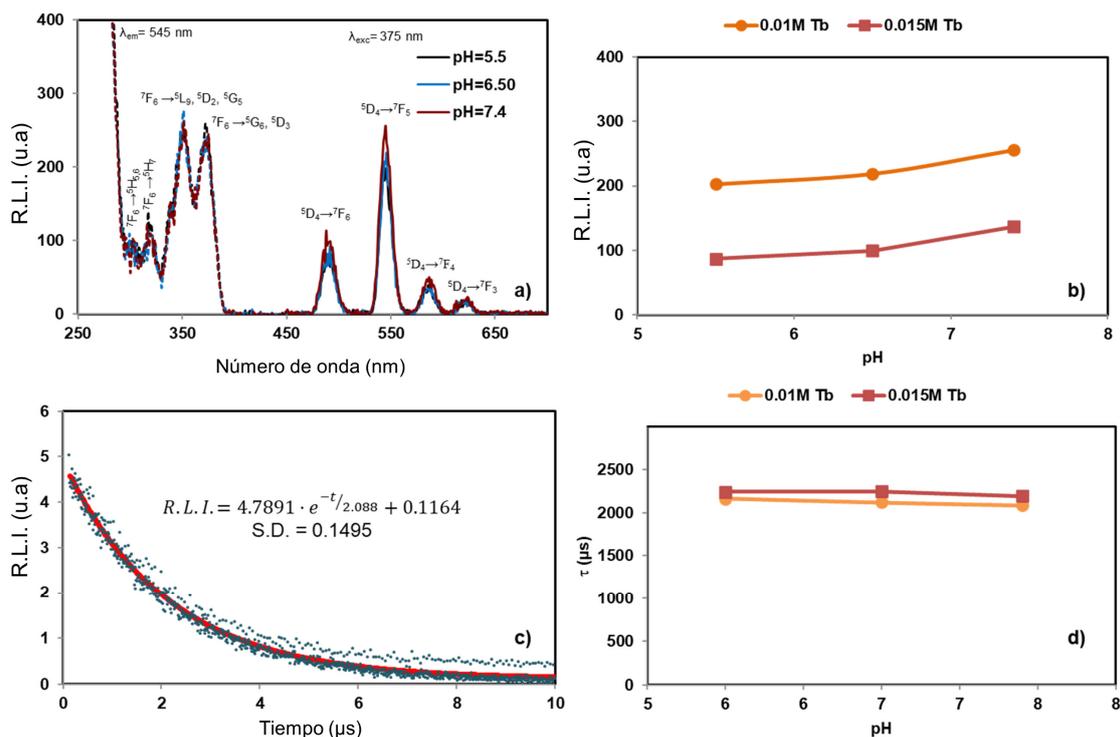


Figura 3.1.8. Propiedades luminiscentes de muestras preparadas con $[Tb^{3+}] = 0.015$ M, 96 h, dispersas en medios acuosos a 25 °C: (a) espectros de excitación (línea discontinua) y emisión (línea sólida) para muestras con $[Tb^{3+}] = 0.015$ M a diferentes pHs; (b) evolución de R.L.I. con el pH; (c) curva de decaimiento de la luminiscencia de la muestra $[Tb^{3+}] = 0.015$ M a pH = 7.4; y (d) evolución de τ en función del pH.

3.1.3.3. Estudios de las propiedades biológicas

Los efectos biológicos de las nanopartículas dopadas con Tb^{3+} a diferentes concentraciones se evaluaron en 3 líneas celulares carcinogénicas (A375, MCF7 y HeLa) y en fibroblastos (no carcinogénica). Como se muestra en la **Figura 3.1.9**, todas las muestras presentan una alta citocompatibilidad ya que la viabilidad celular no se ve afectada por el aumento en la concentración de Tb^{3+} . Estos datos se corroboran mediante el análisis estadístico, que no muestra diferencias significadas entre el crecimiento celular de las líneas tumorales tratadas y las células usadas como control (sin tratamiento). En el tratamiento de la línea celular de fibroblastos, se observa una leve disminución en la viabilidad celular, la cual se acentúa cuando se aumenta la dosis a 100 $\mu\text{g/mL}$. A pesar de ello, la viabilidad celular siempre permanece por encima del 70%, límite establecido por la norma ISO 10993–5:200970,²²⁵ para considerar un material biocompatible. Tampoco se observan cambios morfológicos en las células tratadas, independientemente de la concentración de Tb^{3+} usada.

Finalmente, las propiedades luminiscentes *in vitro*, la internalización, y la localización intracelular de las nanopartículas se estudiaron mediante citometría de flujo. El experimento se llevó a cabo utilizando la línea celular A375, con concentraciones de nanopartículas de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tiempos de tratamiento de 12 y 24 horas. Las muestras usadas en el estudio fueron aquellas preparadas con $[\text{Tb}^{3+}] = 0.010 \text{ M}$ y 0.020 M a 96 horas (**Figura 3.1.9b**). La intensidad de la fluorescencia celular aumentó en todos los casos en comparación con el control no tratado, siendo la más alta para las partículas preparadas con 0.010 M de Tb^{3+} a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 12 horas de tratamiento,. A las 24 horas, la fluorescencia disminuyó en todos los casos lo que sugiere una degradación o expulsión de las nanopartículas por parte de las células. La internalización celular se confirmó mediante microscopía confocal tal y como se observa en la **figura 3.1.9c**, demostrando el potencial de las nAp obtenidas para su uso en aplicaciones de bioimagen.

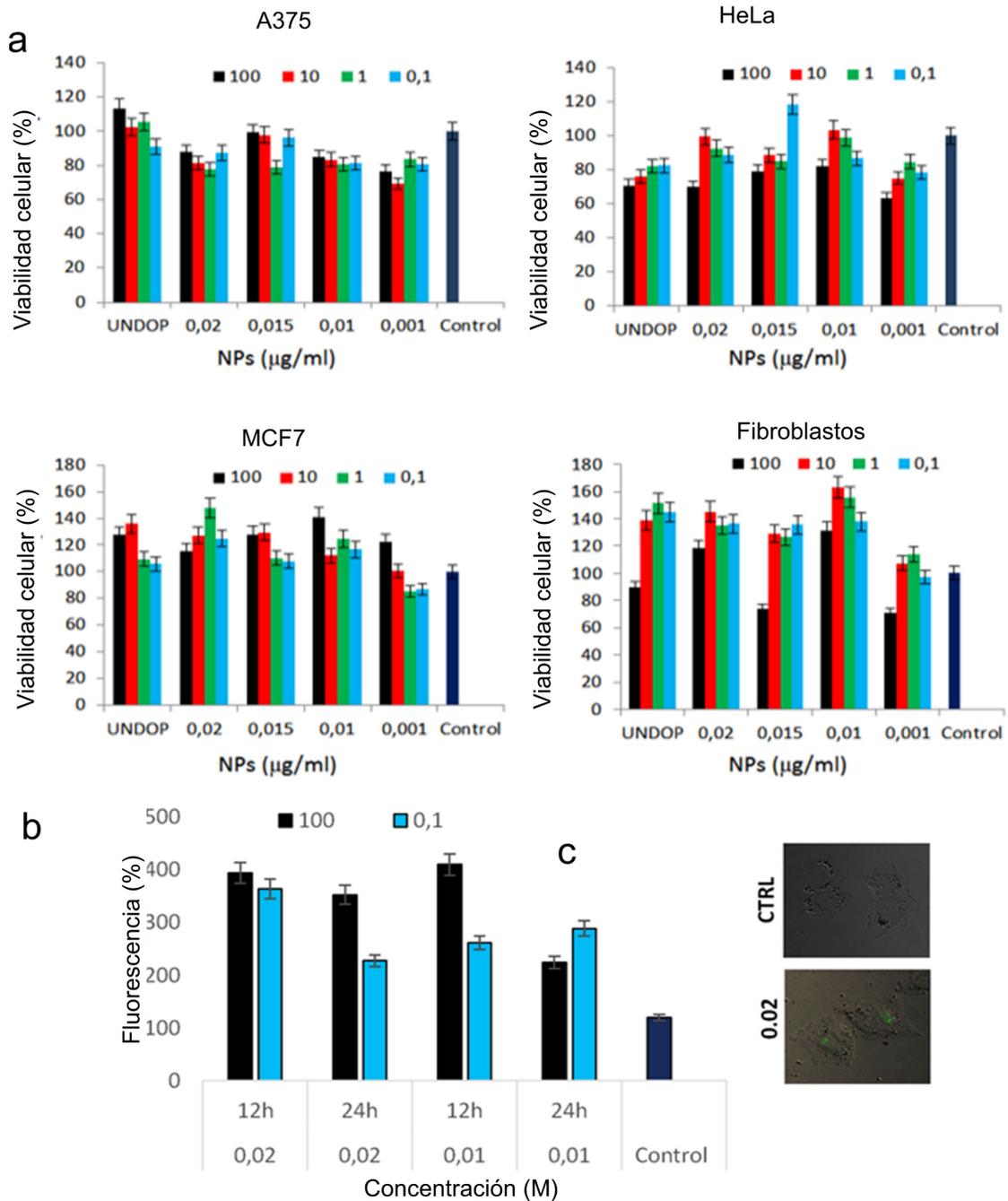


Figure 3.1.9. (a) Resultados de los ensayos MTT en células A375, HeLa, MCF7 y fibroblastos para muestras con concentraciones de $[Tb^{3+}] = 0.020, 0.010, 0.015, 0.001$ M. (b) Captación de partículas preparadas con $[Tb^{3+}] = 0.010$ M y 0.020 M a $100 \mu\text{g/mL}$ y $0.1 \mu\text{g/mL}$ a las 12 y 24 horas después del tratamiento. (c) Microscopía confocal de células A375 incubadas durante 12 horas con el tratamiento.

En resumen, el método de descomplejación térmica ha permitido preparar nanopartículas de Tb³⁺:cit-nAp con propiedades biomiméticas utilizando una concentración máxima de Tb³⁺ ~12.8% en peso (Tb³⁺=0.010 M, 96 h), ya para concentraciones mayores de Tb³⁺ (19.10% y 21.71% en peso) se produce una mezcla de Ap y TbPO₄. La concentración de Tb³⁺ en las muestras, conlleva un aumento casi lineal de la R.L.I., independientemente de la composición de la muestra, lo que demuestra que la presencia de fases de TbPO₄ en la muestra es positiva para aumentar la luminiscencia. Además de la intensidad, las nanopartículas presentan elevados tiempos de vida de luminiscencia, así como, propiedades ópticas similares en polvo y dispersas en agua, sin afectarse por el pH, la fuerza iónica o la temperatura. Por otro lado, las nAp no presentan citotoxicidad frente a las líneas celulares carcinogénicas A375, MCF7 y HeLa, así como frente a células sanas de fibroblastos. Se ha podido demostrar la internalización y la luminiscencia después de la captación celular, permitiendo la localización intracelular mediante citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia. Por lo tanto, las partículas son excelentes candidatas versátiles para bioimagen y transporte de fármacos.

Los resultados obtenidos en este capítulo, han dado lugar a la **publicación N°1** de esta tesis doctoral **“Luminescent citrate-functionalized terbium-substituted carbonated apatite nanomaterials: structural aspects, sensitized luminescence, cytocompatibility, and cell uptake imaging”** (Nanomaterials, 2022, 12(8), 1257).

3.1.4. Referencias

- (198) Sreenivasan, V. K. A.; Zvyagin, A. V.; Goldys, E. M. Luminescent Nanoparticles and Their Applications in the Life Sciences. *J. Phys. Condens. Matter* 2013, 25 (19), 194101. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/19/194101>.
- (199) Perera, T. S. H.; Han, Y.; Lu, X.; Wang, X.; Dai, H.; Li, S. Rare Earth Doped Apatite Nanomaterials for Biological Application. *Journal of Nanomaterials*. Hindawi Limited 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/705390>.
- (200) Al-Kattan, A.; Santran, V.; Dufour, P.; Dexpert-Ghys, J.; Drouet, C. Novel Contributions on Luminescent Apatite-Based Colloids Intended for Medical Imaging. *J. Biomater. Appl.* 2014, 28 (5), 697–707. <https://doi.org/10.1177/0885328212473510>.
- (201) Al-Kattan, A.; Dufour, P.; Dexpert-Ghys, J.; Drouet, C. Preparation and Physicochemical Characteristics of Luminescent Apatite-Based Colloids. *J. Phys. Chem. C* 2010, 114 (7), 2918–2924. <https://doi.org/10.1021/jp910923g>.
- (202) Wang, F.; Tan, W. B.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wang, M. Luminescent Nanomaterials for Biological Labelling. *Nanotechnology* 2005, 17 (1), R1. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/1/R01>.
- (203) Gómez-Morales, J.; Iafisco, M.; Delgado-López, J. M.; Sarda, S.; Drouet, C. Progress on the Preparation of Nanocrystalline Apatites and Surface Characterization: Overview of Fundamental and Applied Aspects. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. Pergamon March 1, 2013, pp 1–46. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2012.11.001>.
- (204) López-Macipe, A.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Clemente, R. Nanosized Hydroxyapatite Precipitation from Homogeneous Calcium/Citrate/Phosphate Solutions Using Microwave and Conventional Heating. *Adv. Mater.* 1998, 10 (1), 49–53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199801\)10:1<49::AID-ADMA49>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199801)10:1<49::AID-ADMA49>3.0.CO;2-R).
- (205) Delgado-López, J. M.; Frison, R.; Cervellino, A.; Gómez-Morales, J.; Guagliardi, A.; Masciocchi, N. Crystal Size, Morphology, and Growth Mechanism in Bio-Inspired Apatite Nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* 2014, 24 (8), 1090–1099. <https://doi.org/10.1002/adfm.201302075>.
- (206) Iafisco, M.; Ramírez-Rodríguez, G. B.; Sakhno, Y.; Tampieri, A.; Martra, G.; Gómez-Morales, J.; Delgado-López, J. M. The Growth Mechanism of Apatite Nanocrystals Assisted by Citrate: Relevance to Bone Biomineralization. *CrystEngComm* 2015, 17 (3), 507–511. <https://doi.org/10.1039/c4ce01415d>.
- (207) Hu, Y. Y.; Rawal, A.; Schmidt-Rohr, K. Strongly Bound Citrate Stabilizes the Apatite Nanocrystals in Bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, 107 (52), 22425–22429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009219107>.
- (208) Gómez-Morales, J.; Verdugo-Escamilla, C.; Fernández-Penas, R.; Parra-Milla, C. M.; Drouet, C.;

- Maube-Bosc, F.; Oltolina, F.; Prat, M.; Fernández-Sánchez, J. F. Luminescent Biomimetic Citrate-Coated Europium-Doped Carbonated Apatite Nanoparticles for Use in Bioimaging: Physico-Chemistry and Cytocompatibility. *RSC Adv.* 2018, 8 (5), 2385–2397. <https://doi.org/10.1039/c7ra12536d>.
- (209) Jabalera, Y.; Oltolina, F.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C.; Fernández-Sánchez, J. F.; Choquesillo-Lazarte, D.; Gómez-Morales, J. Eu-Doped Citrate-Coated Carbonated Apatite Luminescent Nanoprobes for Drug Delivery. *Nanomaterials* 2020, 10 (2), 199. <https://doi.org/10.3390/nano10020199>.
- (210) Hirai, H.; Masui, T.; Imanaka, N.; Adachi, G. ya. Characterization and Thermal Behavior of Amorphous Rare Earth Phosphates. In *Journal of Alloys and Compounds*; Elsevier, 2004; Vol. 374, pp 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2003.11.069>.
- (211) Jiménez-Flores, Y.; Suárez-Quezada, M.; Rojas-Trigos, J. B.; Lartundo-Rojas, L.; Suárez, V.; Mantilla, A. Characterization of Tb-Doped Hydroxyapatite for Biomedical Applications: Optical Properties and Energy Band Gap Determination. *J. Mater. Sci.* 2017, 52 (17), 9990–10000. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1201-8>.
- (212) Grunenwald, A.; Keyser, C.; Sautereau, A. M.; Crubézy, E.; Ludes, B.; Drouet, C. Revisiting Carbonate Quantification in Apatite (Bio)Minerals: A Validated FTIR Methodology. *J. Archaeol. Sci.* 2014, 49 (1), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.05.004>.
- (213) Vandecandelaere, N.; Rey, C.; Drouet, C. Biomimetic Apatite-Based Biomaterials: On the Critical Impact of Synthesis and Post-Synthesis Parameters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012, 23 (11), 2593–2606. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>.
- (214) Ramírez-Rodríguez, G. B.; Delgado-López, J. M.; Gómez-Morales, J. Evolution of Calcium Phosphate Precipitation in Hanging Drop Vapor Diffusion by in Situ Raman Microspectroscopy. In *CrystEngComm*; The Royal Society of Chemistry, 2013; Vol. 15, pp 2206–2212. <https://doi.org/10.1039/c2ce26556g>.
- (215) Awonusi, A.; Morris, M. D.; Tecklenburg, M. M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. *Calcif. Tissue Int.* 2007, 81 (1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9034-0>.
- (216) Gómez-Morales, J.; Fernández-Penas, R.; Romero-Castillo, I.; Verdugo-Escamilla, C.; Choquesillo-Lazarte, D.; D'urso, A.; Prat, M.; Fernández-Sánchez, J. F. Crystallization, Luminescence and Cytocompatibility of Hexagonal Calcium Doped Terbium Phosphate Hydrate Nanoparticles. *Nanomaterials* 2021, 11 (2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano11020322>.
- (217) Iafisco, M.; Delgado-Lopez, J. M.; Varoni, E. M.; Tampieri, A.; Rimondini, L.; Gomez-Morales, J.; Prat, M. Cell Surface Receptor Targeted Biomimetic Apatite Nanocrystals for Cancer Therapy. *Small* 2013, 9 (22), 3834–3844. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201202843>.

- (218) Socrates, G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts. *J. Raman Spectrosc.* 2001, 347.
- (219) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A. Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105 (38), 14265–14270. https://doi.org/10.1073/PNAS.0805135105/SUPPL_FILE/ST1.XLS.
- (220) López-Macipe, A.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Clemente, R. The Role of PH in the Adsorption of Citrate Ions on Hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 200 (1), 114–120. <https://doi.org/10.1006/JCIS.1997.5343>.
- (221) Siqueira, K. P. F.; Lima, P. P.; Ferreira, R. A. S.; Carlos, L. D.; Bittar, E. M.; Matinaga, F. M.; Paniago, R.; Krambrock, K.; Moreira, R. L.; Dias, A. Influence of the Matrix on the Red Emission in Europium Self-Activated Orthoceramics. *J. Phys. Chem. C* 2015, 119 (31), 17825–17835. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.5B05473/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2015-05473K_0012.JPEG.
- (222) Siqueira, K. P. F.; Lima, P. P.; Ferreira, R. A. S.; Carlos, L. D.; Bittar, E. M.; Granado, E.; González, J. C.; Abelenda, A.; Moreira, R. L.; Dias, A. Lanthanide Orthoantimonate Light Emitters: Structural, Vibrational, and Optical Properties. *Chem. Mater.* 2014, 26 (22), 6351–6360. https://doi.org/10.1021/CM502504B/SUPPL_FILE/CM502504B_SI_001.PDF.
- (223) Medina-Velazquez, D. Y.; Caldiño, U.; Morales-Ramirez, A.; Reyes-Miranda, J.; Lopez, R. E.; Escudero, R.; Ruiz-Guerrero, R.; Morales Perez, M. F. Synthesis of Luminescent Terbium-Thenoyltrifluoroacetone MOF Nanorods for Green Laser Application. *Opt. Mater. (Amst).* 2019, 87, 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.OPTMAT.2018.08.021>.
- (224) Richardson, F. S. Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems. *Chem. Rev.* 1982, 82 (5), 541–552. <https://doi.org/10.1021/cr00051a004>.
- (225) Geneve, I. S.-; For, S. I. O.; 2009, U. Biological Evaluation of Medical Devices —Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. In ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009/(R)2014; Biological evaluation of medical devices —Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; 2009. <https://doi.org/10.2345/9781570203558.ch1>.

3.2. Preparación de nanopartículas de apatito dopadas con iones Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} mediante un método hidrotermal *one-step*, partiendo de CaCO_3 biogénico

3.2.1. Introducción

Los estudios realizados en el capítulo anterior, han demostrado la importancia y algunas de las aplicaciones de las nAp dopadas con metales. Sin embargo, la producción de este material a gran escala es un proceso costoso que requiere gran cantidad de materia prima y energía. Sin embargo, existe la posibilidad de obtener materias primas de bajo costo a partir de desechos, favoreciendo además el reciclaje de estos materiales.

Las conchas de moluscos son estructuras complejas formadas por CaCO_3 y materia orgánica (1-5% peso), siendo considerados composites naturales. En 2018, la producción de conchas de moluscos a nivel mundial alcanzó 17.3 millones de toneladas.²²⁶ Diversos estudios han intentado transformar el CaCO_3 biogénico (bCCP) de estas conchas en Ap, proponiendo una alternativa ecológica que cumpla los principios de la economía circular.²²⁷⁻²²⁹ Las estrategias convencionales para tal fin constan de dos etapas: 1) calcinación de bCCP a 900-1100 °C para obtener CaO y CO_2 , y 2) valoración ácido-base del CaO hidratado con un reactivo ácido fosfatado, típicamente el H_3PO_4 .^{230,231} Sin embargo, las altas energías de calcinación se traducen en un aumento del costo de este tipo de operaciones cuando se escalan para obtener un aumento de la producción. En nuestro laboratorio, se ha desarrollado un método hidrotermal de una sola etapa para transformar bCCP en Ap de tamaño micro /nanométrico.^{232,233} Este método es de bajo coste pues no se requiere calcinación a altas temperaturas, además es respetuoso con el medio ambiente, ya que no existe liberación de CO_2 ni uso de ácidos fuertes contaminantes. Además, hemos introducido en la formulación diferentes iones metálicos (M) como Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , metales implicados biológicamente en el metabolismo y el desarrollo óseo, la diferenciación celular y la angiogénesis.²³⁴⁻²³⁶ Además, el Co^{2+} se conoce por su actividad antibacteriana y su influencia en el proceso de inflamación promoviendo la liberación de citocinas.²³⁷ El dopaje de nAp con estos metales permite introducir y reforzar propiedades de gran interés para su uso en ingeniería tisular.

El presente capítulo tiene como objetivo la síntesis de nAp dopadas con metales de interés biológico mediante transformación hidrotermal, utilizando como materia prima bCCP de conchas de moluscos. Se realizará una caracterización de las propiedades físico-químicas y se realizará un estudio exhaustivo de las propiedades biológicas evaluando parámetros como la citotoxicidad celular y la capacidad de las nuevas nanopartículas para inducir la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales *in vitro*.

3.2.2. Síntesis de nanopartículas

Las conchas se lavaron con agua y seguidamente se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico (NaClO) al 5 % v/v durante 24 horas. Este tratamiento de “bleaching” permite eliminar los residuos orgánicos de la superficie. A continuación, las conchas se secaron y trituraron en un molino de bolas. El polvo resultante se tamizó a $\varnothing < 45 \mu\text{m}$. El material tamizado ha sido el bCCP usado en la síntesis hidrotermal de Ap.

Para ello, se prepararon tres suspensiones acuosas de 100 mL, de composición 490 mM de bCCP y 10 mM de Co^{2+} , Mg^{2+} o Mn^{2+} , respectivamente, y tres soluciones de 100 mL de composición 300 mM KH_2PO_4 . Las suspensiones de bCCP/M y las soluciones KH_2PO_4 se mezclaron 1:1 v/v y se colocaron durante 7 días en una estufa a temperaturas entre 20 °C y 100 °C ($\Delta 20$ °C). Los experimentos se realizaron utilizando tubos de ensayo de vidrio Pyrex de 10 mL sellados. Para estudios a temperaturas superiores, entre 120 °C y 200 °C ($\Delta 20$ °C) se usó una caja de acero multipocillo con vasos de teflón y cierre atornillado, diseñada y construida específicamente para este trabajo. Los precipitados obtenidos se recogieron mediante sucesivos ciclos de lavado con agua desionizada y centrifugación (6 ciclos a 9.000 rpm durante 9 minutos cada uno), para finalmente liofilizarlos durante 12 horas (-50 °C y 3 mbar).^{208,209}

3.2.3. Resultados y discusión

3.2.3.1. Influencia de la temperatura en la transformación de bCCP en micro-nanopartículas de apatito dopadas con iones metálicos

La transformación de bCCP con la temperatura en presencia de 10 mM de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} se ha analizado mediante PXRD (**Figura 3.2.1**), espectroscopía FTIR y Raman (**Figura 3.2.2**).

Los diagramas PXRD muestran como a temperaturas bajas (20 y 40 °C) los precipitados presentan reflexiones correspondientes al bCCP (fase calcita, PDF 01-086-2339), principalmente a $2\theta = 23.6^\circ$ (012) y 29.3° (104). Además, se observa la presencia de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (brushita), caracterizada por la reflexión a $2\theta = 11.70^\circ$ (020) (PDF 00-009-0077). Por encima de 60 °C aparece la fase Ap cuyas reflexiones características son $2\theta = 25.8^\circ$ (002) y el cuádruplete (211), (112), (300) y (202) a 31.77° , 32.19° , 32.90° y 33.9° respectivamente (PDF 01-089-5631). Cabe destacar que, al usar Co^{2+} y Mg^{2+}

aparece una reflexión a 31.15° que corresponde a la fase whitlockita (W), probablemente dopada con el metal. Cuando se usa Co^{2+} , el porcentaje de esta fase en la muestra es menor; sin embargo, cuando utilizamos Mg^{2+} , la fase W es visible incluso en los experimentos a 200°C . Esta fase denominada Mg-W, de fórmula $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$ (PDF 04-009-3397), ha sido reportada previamente por otros autores. Conforme se aumenta la temperatura, los difractogramas muestran la transformación completa de bCCP en Ap a 200°C , independientemente del metal utilizado en el experimento. Este Ap, y a diferencia del nAp obtenido en el capítulo anterior, presenta un mayor grado de cristalinidad y un mayor tamaño de partícula a juzgar por las reflexiones más estrechas e intensas. Los resultados confirman la transformación completa de bCCP en Ap a 200°C ; por ello las muestras obtenidas a esta temperatura son las que se han usado en la mayoría de las caracterizaciones.

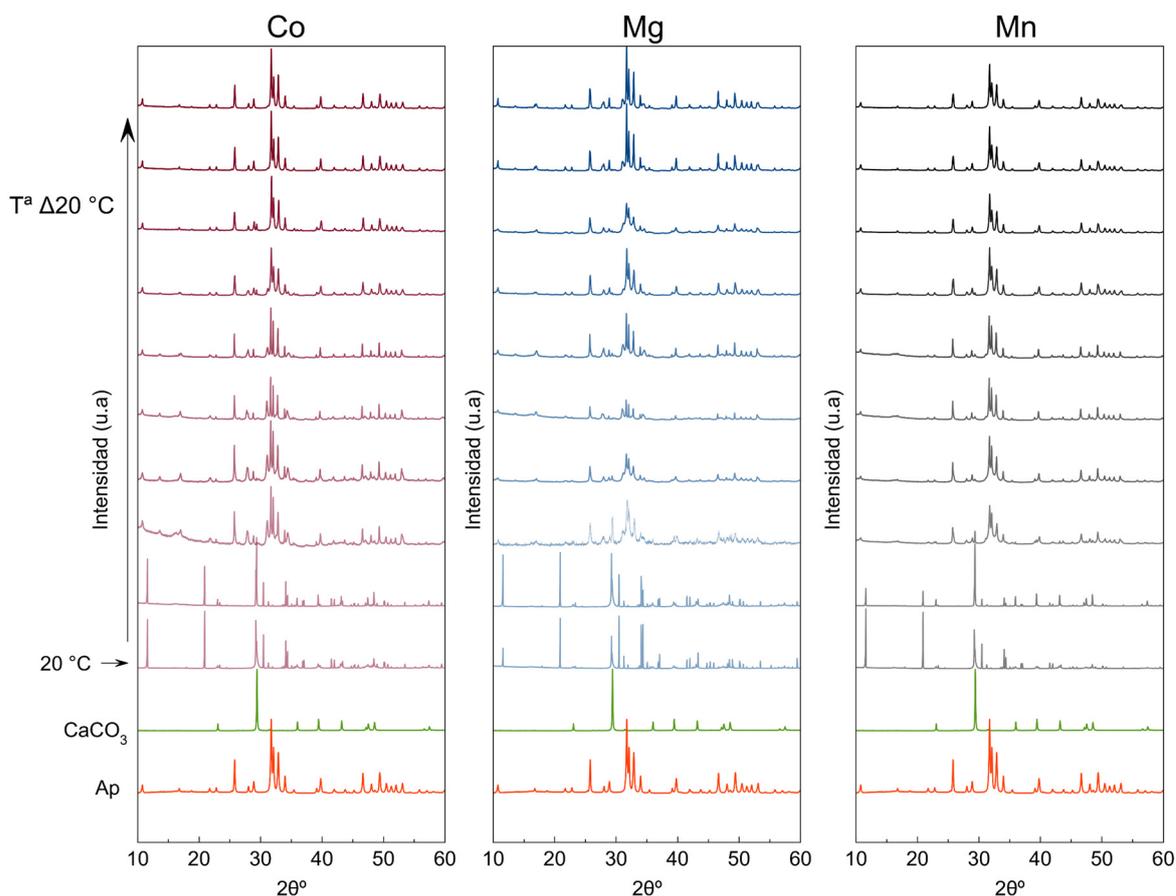


Figura 3.2.1. Difractogramas de PXRD correspondientes a la transformación de bCCP en Ap entre 20 y 200°C , en presencia de los iones dopantes Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , así al Ap (PDF 01-089-5631) y la calcita (PDF 01-086-2339).

La composición de las muestras obtenidas a 200 °C, se ha analizado mediante refinamiento Rietveld de los difractogramas de PXRD, así como mediante ICP-MS y ICP-OES. Los datos de este análisis cuantitativo, recogidos en la **Tabla 3.2.1**, revelan una alta cantidad de Mg-W (30% en peso), mientras que la cantidad de W disminuye a ~ 5% peso en el caso de usar el Co²⁺ y no aparece cuando usamos Mn²⁺, lo que indica una conversión de bCCP a Ap más eficiente. Con respecto a la cantidad de metal que dopa las muestras, la cantidad más alta correspondió al Co²⁺ (7.7 ppm) mientras que el Mg²⁺ se incorporó en cantidades de 4.3 ppm, sin embargo, parte de estos iones se encuentran dopando la Mg-W. Finalmente la cantidad de Mn²⁺ incorporada en las muestras es la más baja entre los metales usados (~1 ppm), pero a su vez es la única fase que no contiene W.

Tabla 3.2.1. Composición química (ppm), relaciones molares (Ca+M)/P determinadas mediante ICP-MS y ICP-OES, y composición de fases (en % en peso) determinadas mediante refinamiento Rietveld de difractogramas de las muestras preparadas a 200 °C

M Dopante	Co (ppm)	Mg (ppm)	Mn (ppm)	Ca (ppm)	(Ca+M)/P	M-Ap (wt%)	M-W (wt%)	C (wt%)
–	0	0	0	297.2	127,10	99.4	0	1.82
Co ²⁺	7.7	0	0	287.2	135.70	94.7	5.3	1.66
Mg ²⁺	0	4.3	0	286.7	136.30	70.1	28.7	1.66
Mn ²⁺	0	0	1.1	280.3	127.20	98.4	0	1.71

M-Ap (Ap dopado con metal); M-W (whitlockita dopada con metal); C (calcita)

Para corroborar los resultados obtenidos por PXRD se realizó una caracterización complementaria mediante FTIR (**Figura 3.2.2a,b**) y Raman (**Figura 3.2.2c,d**). El espectro FTIR de CaCO₃ muestra las señales correspondientes al modo de vibración $\nu_3\text{CO}_3 \sim 1415 \text{ cm}^{-1}$ y dos señales de pequeña intensidad a 875 cm^{-1} ($\nu_2\text{CO}_3$) y 710 cm^{-1} ($\nu_4\text{CO}_3$). El Ap por su parte muestra las bandas correspondientes a los modos de vibración principales del grupo PO_4^{3-} en la zona de 1020 cm^{-1} ($\nu_3\text{PO}_4$) y en 560 y 604 cm^{-1} ($\nu_4\text{PO}_4$). La presencia de una banda a 875 cm^{-1} es habitual en Ap sustituido con grupos CO_3^{2-} . Se observa como a 200 °C las principales señales del CaCO₃ desaparecen, quedando pequeñas señales en 1419 cm^{-1} , 1449 cm^{-1} y 875 cm^{-1} ($\nu_2\text{CO}_3$) correspondientes a los grupos CO₃ que dopan el Ap.

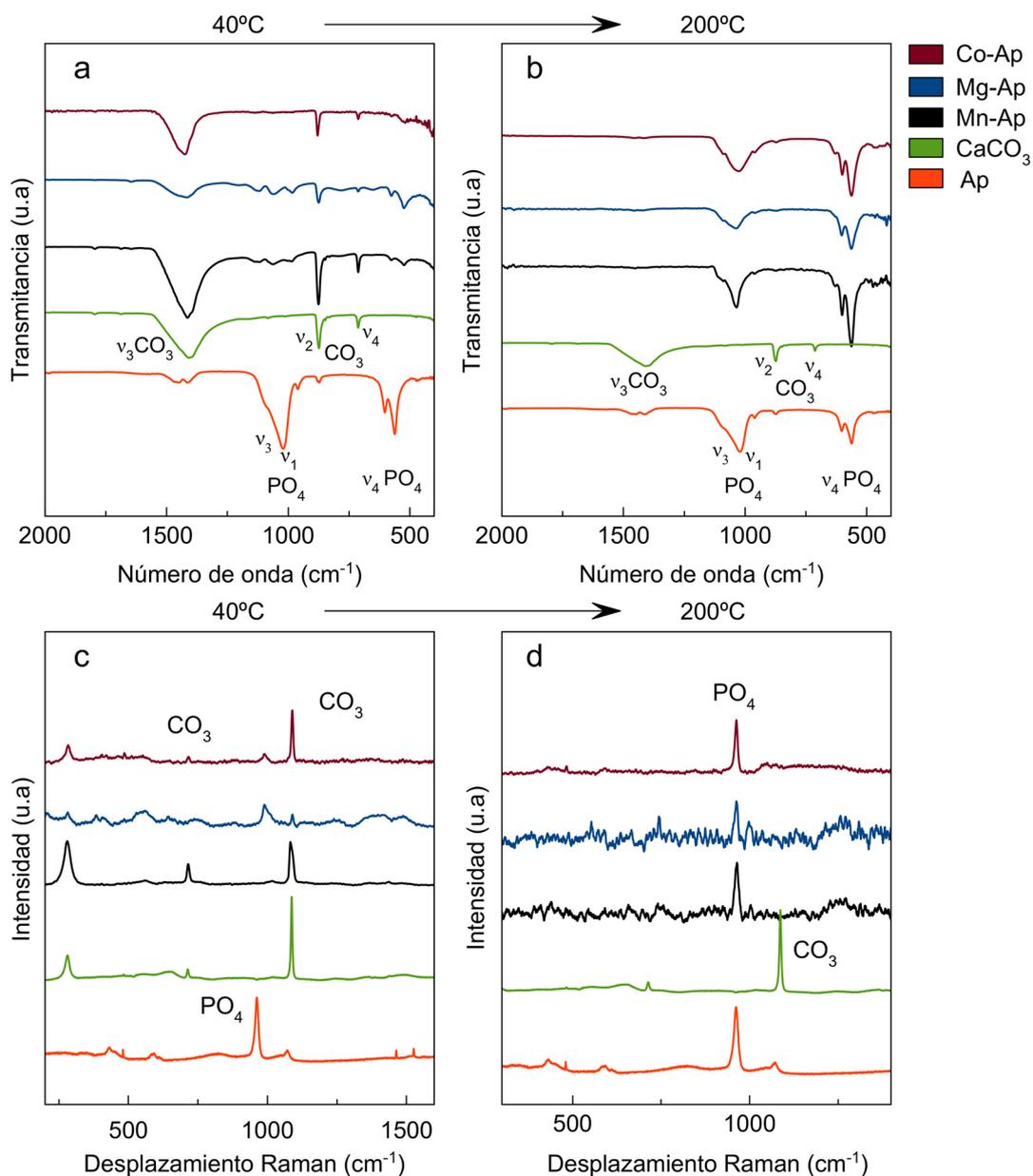


Figura 3.2.2. Análisis FTIR (a,b) y Raman (c,d) de la transformación de bCCP en Ap a 40 y 200 °C, usando Co, Mg y Mn como elementos dopantes.

El tipo de carbonatación (A o B) se puede determinar mediante deconvolución de la banda $\nu_2\text{CO}_3$ lo cual revela tres sub-bandas diferentes (**Figura 3.2.3**). Para Co-Ap, se encuentran en ~ 880 , ~ 872 , y ~ 866 cm^{-1} ; para Mg-Ap en ~ 879 , ~ 873 , y ~ 868 cm^{-1} y para Mn-Ap en ~ 880 , ~ 873 , y ~ 868 cm^{-1} . En los tres casos se atribuyen a especies de CO_3^{2-} tipo A (reemplazando OH^-), tipo B (reemplazando PO_4^{3-}) y CO_3^{2-} lábiles ubicadas en la superficie de las partículas.^{212,238} El grado de carbonatación también se estimó utilizando el método que compara la intensidad de $\nu_2\text{CO}_3$ con las de ν_1 - $\nu_3\text{PO}_4$. Según este método, el grado de carbonatación estimado fue de $2.1 \pm 0.2\%$ en peso para Co-Ap, $3.2 \pm 0.2\%$ en

peso para Mg-Ap y $1.9 \pm 0.1\%$ en peso para Mn-Ap. Estos datos demuestran que el Ap dopado con estos metales presenta una sustitución de CO_3^{2-} similar a la observada en la síntesis de Ap biomimético mediante el método de descomplejación térmica usando reactivos comerciales en el capítulo anterior. Ello indica que el uso de bCCP como materia prima es válido para el propósito de obtener apatitos biomiméticos.

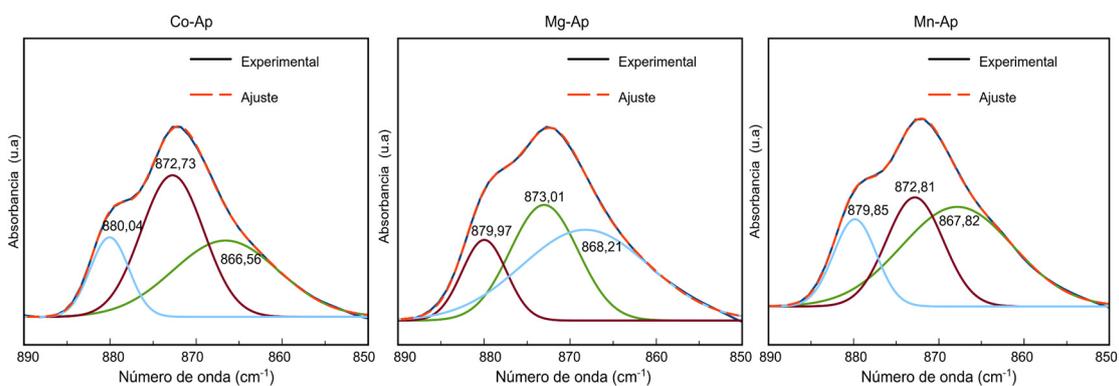


Figura 3.2.3. Deconvolución de la banda $\nu_2\text{CO}_3$ localizada a $\sim 875 \text{ cm}^{-1}$ para las muestras Co-Ap, Mg-Ap y Mn-Ap preparadas a $200 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para evaluar el tamaño de partículas de las muestras, las **figuras 3.2.4a,b** muestran las PSD en volumen y en volumen acumulado. Estas últimas permiten la observación visual de los percentiles D_{10} , D_{50} y D_{90} mediante líneas horizontales discontinuas. El porcentaje mayor de partículas se encuentra entorno a los 15.7 nm para las muestras dopadas con Mg, 255 nm para el Mn y 825 nm para aquellas muestras dopadas con Co, mientras que el Ap sin dopar presenta un tamaño de partícula promedio de 68 nm. Además, en estas curvas se observa un porcentaje de partículas de mayor tamaño hacia los 1000 nm, que se consideran agregados. Si observamos el porcentaje en volumen acumulado, sólo Ap sin dopar presenta el D_{10} y la mediana D_{50} en el rango de tamaños nanométricos, mientras que en las muestras dopadas con metales estos valores se encuentran en el intervalo submicrométrico y micrométrico, debido a la presencia de partículas más grandes y agregados. El D_{90} , completamente dominado por la agregación se encuentra en el rango de tamaños micrométricos para todas las muestras, menos para el Ap no dopado. Estos datos indican que el dopaje del Ap con M, induce fenómenos de agregación y crecimiento de las partículas, resultando en partículas y agregados de mayor tamaño.

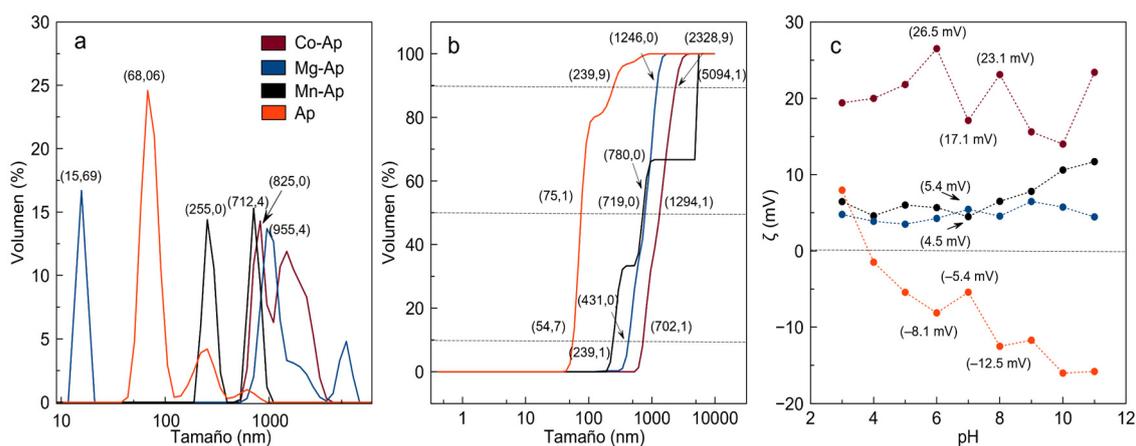


Figura 3.2.4. (a) Distribución de tamaño en volumen. (b) Distribución de tamaños en volumen acumulada. (c) Potencial ζ versus pH.

Para realizar un estudio más profundo sobre los fenómenos de agregación y dispersión en suspensión acuosa se ha analizado el potencial ζ en función del pH (**Figura 3.2.4c**). En el Ap, se observa una disminución del potencial ζ a -5.4 (pH 7) y -15 mV (pH 11) debido al aumento de cargas negativas superficiales (OH^-), lo que indica que a medida que aumenta el pH las fuerzas repulsivas son más fuertes que las atractivas, lo que conduce a la dispersión del coloide, ergo a una suspensión estable. Por su parte, las muestras dopadas con M muestran potenciales ζ positivos debido a la reversión de la carga causada por los metales dopantes. Este resultado se debe a la presencia de cationes en la superficie de las partículas, especialmente en el caso de Co^{2+} , ya que Co-Ap muestra el potencial ζ más alto, alcanzando valores de $+25.4$ mV (pH 6) y $+17.1$ mV (pH 7), lo que está relacionado con una mayor cantidad de metal dopante (7.7 ppm). Los potenciales ζ medidos para las muestras dopadas con Mg^{2+} y Mn^{2+} , sin embargo, son muy bajos a pH fisiológicos (5.4 y 4.5 mV a pH 7), lo que indica que las partículas están prácticamente descargadas. En estas condiciones, las repulsiones electrostáticas son menos decisivas y las suspensiones coloidales son menos estables, por lo que tienen más tendencia a la agregación que el Ap en su estado natural.^{209,239}

Un análisis detallado de la morfología de las partículas preparadas a 200 °C ha sido realizado mediante SEM. Las **figuras 3.2.5a-d** confirman los resultados de PSD mostrando la presencia de partículas submicrométricas (dimensiones características (L) <1000 nm) con diferentes morfologías (placas hexagonales, prismas, cubos, varillas). Sólo en la muestra Mg-Ap (**Figura. 3.2.5c**), compuesta por Mg-Ap ($\sim 70\%$ en peso) y Mg-W (29% en peso), se pueden distinguir claramente dos tipos de morfologías, varillas

de tamaño nanométrico y prismas hexagonales de tamaño micrométrico. Además de las partículas de mayor tamaño, se observan nanopartículas con tamaños inferiores a 100 nm, que han podido ser observadas en TEM (**Figuras 3.2.52e-h**). Estas nanopartículas dopadas con metales tienden a adoptar una morfología de plaqueta, diferente de la morfología en varilla característica de la Ap.

Las partículas de mayor tamaño estudiadas presentan valores de L de 460 ± 102 nm para el Ap; 217 ± 38 nm para Co-Ap; 360 ± 32 nm para Mg-Ap y 180 ± 19 nm para Mn-Ap. Por su parte, las partículas de menor tamaño presentan un L de 48 ± 20 nm para Ap; 73 ± 18 nm para Co-Ap; 57 ± 6 nm para Mg-Ap y 47 ± 8 nm para el Mn-Ap.

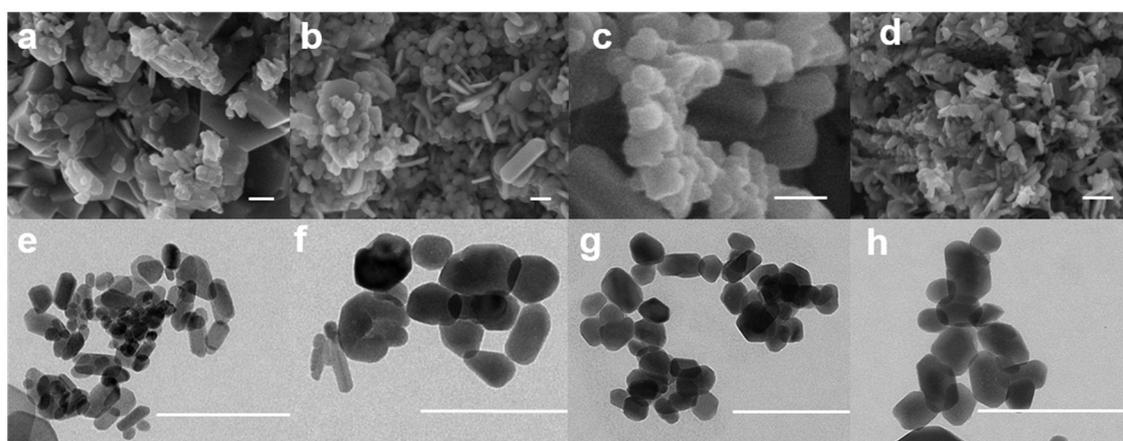


Figura 3.2.5. Imágenes SEM (a-d) e imágenes TEM (e-h) de las muestras Ap, Co-Ap, Mg-Ap y Mn-Ap respectivamente, preparadas a 200 °C. La escala de todas las imágenes corresponde a 200 nm.

Debido a que la muestra Mg-Ap es la única que presenta dos morfologías claramente definidas, dicha muestra fue la seleccionada para realizar un análisis mediante HRTEM. La micrografía HAADF-STEM y los mapas de composición elemental EDX de Ca, Mg y P representados en la **figura 3.2.6**, muestran la presencia de iones Mg^{2+} en ambas morfologías cristalinas. Además, el patrón de difracción de electrones en el área seleccionada (SAED) de las nanopartículas muestra las reflexiones de los planos (002) y (211) del Ap, mientras que el patrón SAED del área que muestra los prismas contiene anillos y puntos que se asocian a los espaciados de red 2.87 Å, 2.74 Å, 2.69 Å, 2.66 Å, 1.94 Å, 1.91 Å y 1.67 Å. Dichos espaciados corresponden a los planos (0 2 10), (1 2 8), (0 3 6), (1 1 12), (1 4 3), (1 1 18) y (5 0 8) de la fase Mg-W (PDF 04-009-3397). Algunos de los anillos están asociados con los planos (002), (121) y (311) del Ap, lo indica la

presencia de ambas fases en la muestra, confirmando definitivamente los resultados obtenidos mediante PXRD.

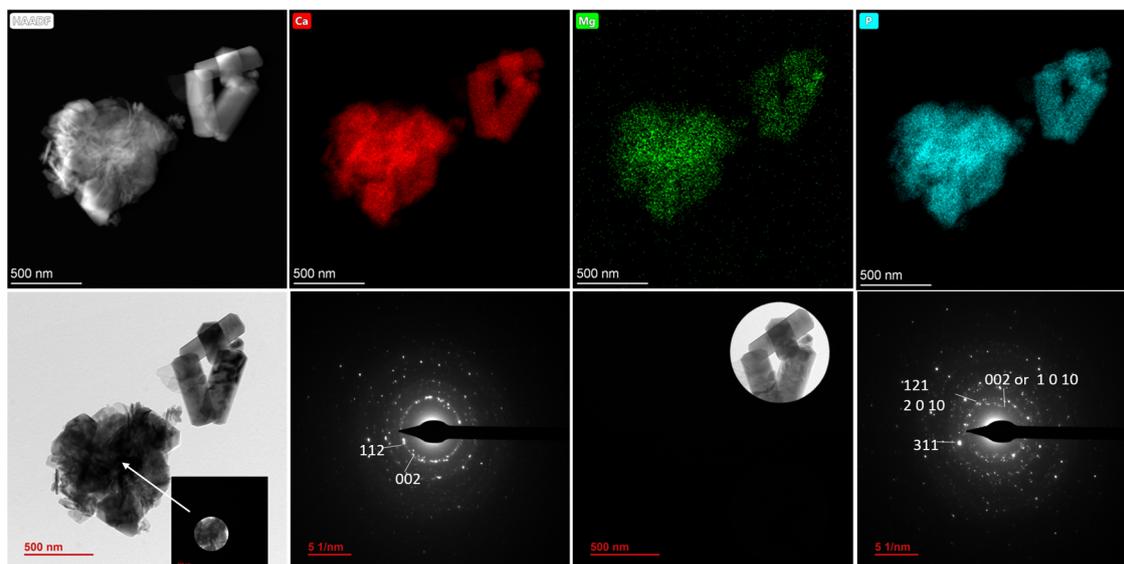


Figura 3.2.6. Imágenes de HAADF-STEM y mapas de composición elemental EDX de Ca, Mg y P para la muestra Mg-Ap preparada a 200 °C.

3.2.3.2. Estudios de las propiedades biológicas

3.2.3.2.1. Citotoxicidad celular

El Ap es un material muy utilizado para aplicaciones biomédicas y la introducción de un dopaje parcial con metales en su estructura cristalina puede tener un gran impacto en sus propiedades biológicas, lo que constituye una cuestión importante que debe investigarse. Para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas, se ha realizado el ensayo MTT tras 3 días de incubación con dos líneas celulares murinas, MS1 (células pancreáticas endoteliales) y m17.ASC (células madre mesenquimales). La **figura 3.2.7** muestra los resultados de viabilidad celular, en los que el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (reportada como Doxo) es utilizada como control interno. Todos los tratamientos se dan en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se comparan con las células no tratadas (CTRL⁻).

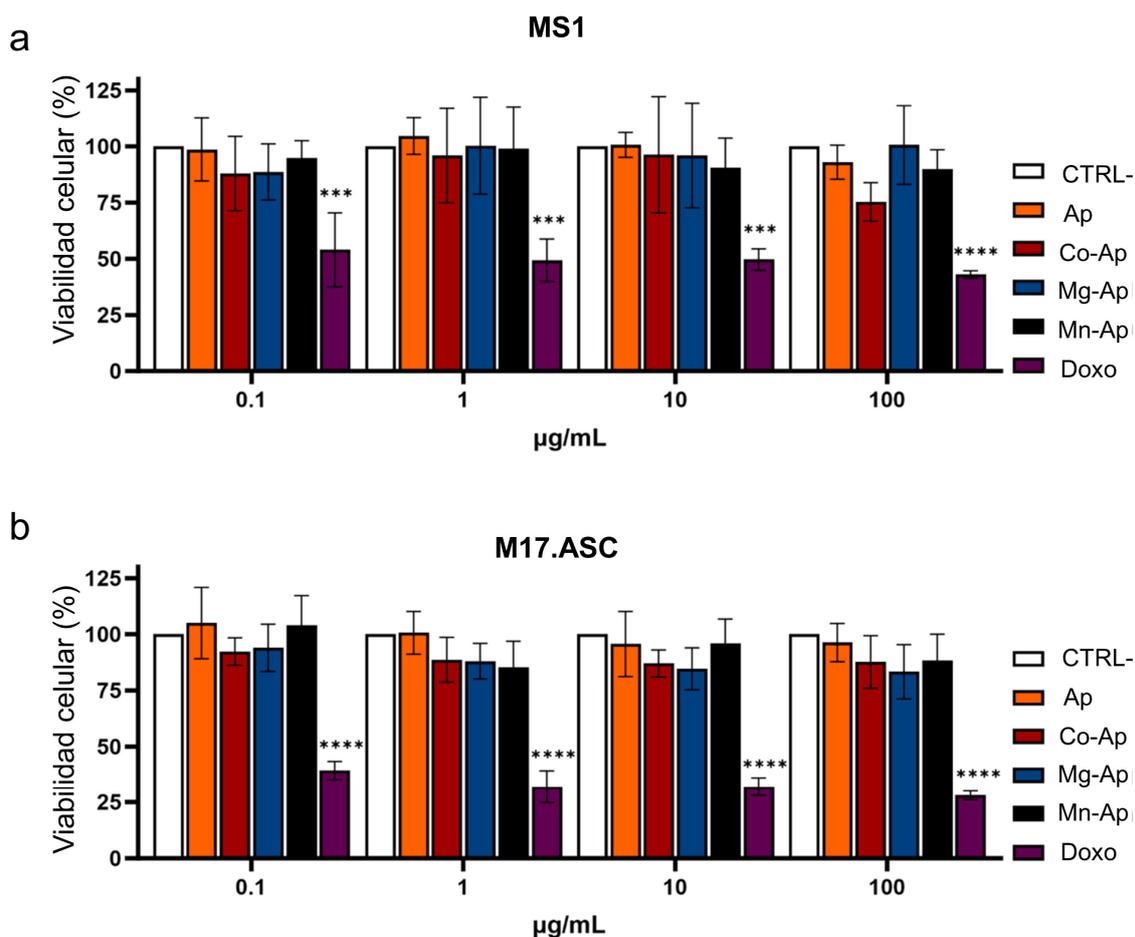


Figura 3.2.7. Viabilidad celular de las nanopartículas en células (a) MS1 y (b) m17.ASC. Los niveles de significación se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

Las nanopartículas mostraron una excelente citocompatibilidad en ambas líneas celulares, ya que la viabilidad es sistemáticamente superior al 80 % en todos los materiales y concentraciones probadas. Sólo en las células MS1, cuando se trataron 100 µg/mL de Co-Ap, se observó una viabilidad inferior, de alrededor del 75 %, también aceptada como biocompatible, ya está por encima del 70%, límite establecido por la norma ISO 10993-5:2009.²⁴⁰ Esta ligera reducción de la viabilidad celular puede deberse a la absorción celular directa de las nanopartículas dopadas o a la liberación parcial de iones Co^{2+} en el medio circundante, que puede inducir estrés oxidativo en las células. El estrés oxidativo se caracteriza por una sobreproducción de especies de oxígeno reactivas que pueden provocar daños en componentes de las células tales como proteínas, lípidos y ADN.²⁴¹ Estos fenómenos de estrés oxidativo también han sido reportados en tratamientos con dosis elevadas de Mn^{2+} . No obstante, en las concentraciones adecuadas el Mn^{2+} desempeña un papel crucial como cofactor en numerosas enzimas vitales para

funciones biológicas específicas como el metabolismo energético, la coagulación de la sangre y el desarrollo óseo.²⁴² Por su parte, y como es de esperar, la viabilidad celular en presencia de Doxo disminuye por debajo del 50 % en todas las concentraciones, lo que confirma la citocompatibilidad de los materiales en el rango de concentraciones evaluadas.

3.2.3.2.2. Inducción de la diferenciación osteogénica

Además de las propiedades osteogénicas del apatito,²⁴³⁻²⁴⁵ los iones metálicos como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} desempeñan un papel importante en el metabolismo de los huesos y en los procesos de angio-osteogénesis.²⁴⁶⁻²⁴⁸ Por ello, en otra serie de experimentos, se ha evaluado la capacidad de las nanopartículas para inducir la diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales murinas. En estos ensayos se ha utilizado la cuantificación de la expresión de genes osteogénicos, así como ensayos de tinción ALP y ARS, para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la diferenciación osteogénica.

3.2.3.2.2.1. Expresión génica

Para evaluar la diferenciación ósea mediante estudios de expresión génica, las células m17.ASC se trataron con 25 $\mu g/mL$ de nanopartículas durante 10 días. El medio de diferenciación osteogénica se utilizó como control positivo, tal como se indica en Zamperone et al.²⁴⁹ En estos ensayos se analizaron mediante q-RT-PCR los genes de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2), colágeno tipo 1 A (COL1A1 - COL1A2), proteína gamma-carboxiglutamato ósea (BGLAP - osteocalcina), fosfoproteína secretada 1 (SPP1 - osteopontina) y el activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B (RANKL). Todos estos genes están involucrados en la osteogénesis y se toman como marcadores para la diferenciación osteogénica.

Los resultados obtenidos (**Figura 3.2.8**), indican una regulación secuencial ascendente de los genes marcadores, que se corresponden con varias etapas de diferenciación y maduración osteogénica.

En primer lugar, se evalúa el principal componente en el desarrollo de los huesos que es la proteína ósea morfogenética BMP2. Esta proteína desempeña un papel fundamental en la formación ósea a lo largo del desarrollo, la curación de fracturas y la

fusión espinal, al unirse a receptores de la superficie celular e inducir la diferenciación de los osteoblastos y la actividad osteoinductora.²⁴⁹ El tratamiento con las nanopartículas regula al alza la BMP2 lo que impulsa la expresión de las principales macromoléculas de la matriz ósea, el colágeno de tipo I (COL1A1 y COL1A2), por lo que también es conocida como un indicador temprano de las células osteoprogenitoras.^{250,251} COL1A1 y COL1A2, así como la expresión de la ALP, desempeñan un papel fundamental en la osteogénesis porque actúan como componentes estructurales formando colágeno de tipo I que proporciona la resistencia a la tracción necesaria para la formación de la matriz ósea. Además, los COL1A1 y COL1A2 influyen en varias vías de señalización esenciales para la osteogénesis dando lugar a interacciones con integrinas localizadas en la superficie de los osteoblastos, lo que, a su vez, desencadena cascadas de señalización intracelulares fundamentales para el intrincado proceso de formación ósea.²⁵² Curiosamente, todas las nanopartículas inducen un aumento significativo de la expresión de COL1A1, mientras que COL1A2 sólo se sobre expresa en los tratamientos con nAp y Mg-Ap.

El análisis de la expresión del gen BGLAP, también conocida como osteocalcina, se considera un marcador de diferenciación osteogénica de etapa media a tardía.²⁵³ Al igual que en los casos anteriores, las nanopartículas inducen un aumento significativo de la expresión de BGLAP. Del mismo modo, la expresión del SPP1 sigue la misma tendencia, ya que todos los compuestos son capaces de regular al alza este gen en comparación con el medio de inducción osteogénica. La sobreexpresión de SPP1 es importante ya que se considera un marcador de etapa intermedia en el proceso de osteogénesis, ya que este gen codifica la proteína osteopontina, que promueve la formación ósea y la mineralización. Por lo tanto, esta glicoproteína está relacionada con la osteogénesis y el anclaje de los osteoclastos a la matriz de remodelación ósea. Además, la SPP1 está presente no sólo en los osteoblastos y la matriz ósea mineralizada, sino también en la osificación intramembranosa, potenciando la diferenciación y proliferación osteoblásticas.^{254,255}

Por último, el RANKL se ha estudiado debido a su papel en la maduración, diferenciación y activación de los osteoclastos.²⁵⁶ En consecuencia, el RANKL se reconoce como una pieza fundamental del equilibrio entre la formación y la resorción del tejido óseo. En la literatura, las pruebas directas que relacionan las nanopartículas de hidroxiapatita con el aumento de la expresión del gen RANKL son limitadas, pero algunos estudios sugieren posibles mecanismos por los que podría producirse este

fenómeno. En este estudio, aunque se observa una ligera sobreexpresión del gen RANKL por parte de las nanopartículas, sólo el medio osteogénico indujo la expresión del gen RANKL de forma diferencial en las m17.ASC.

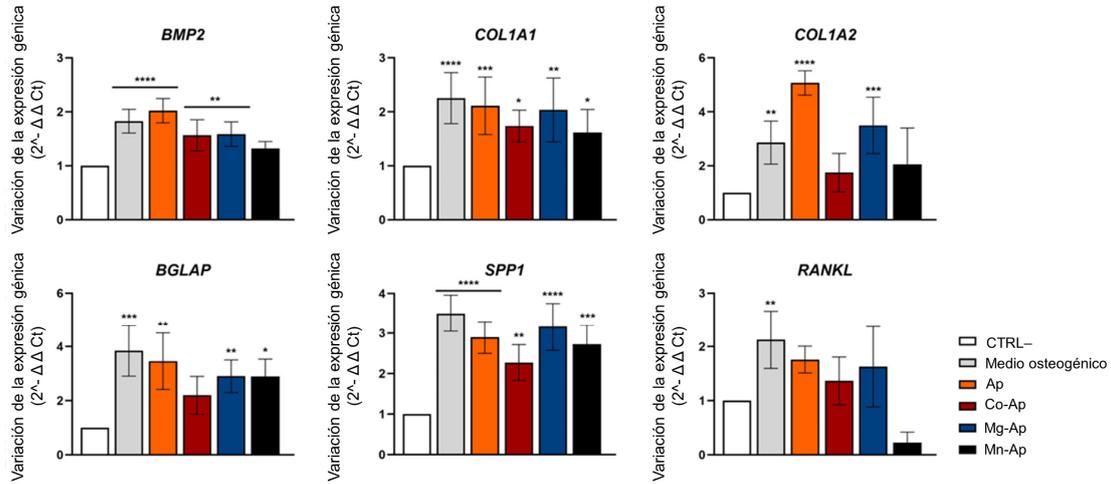


Figura 3.2.8. Expresión relativa de genes marcadores en m17.ASC. Los histogramas muestran los niveles de ARNm de los genes BMP2, COL1A1 y COL1A2, BGLAP, SPP1 y RANKL, detectados mediante q-RT-PCR tras el tratamiento con las nanopartículas. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes utilizando ANOVA unidireccional con la prueba posterior de comparación de Dunnet frente a CTRL⁻ (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

3.2.3.2.2.2. Tinción Fosfatasa Alcalina

La tinción ALP permite evaluar la actividad de la enzima ALP, que es un indicador temprano de la diferenciación osteogénica. La **figura 3.2.9a** muestra las células m17.ASC tras ser tratadas durante 14 días con las nanopartículas y ser teñidas para ALP. Los análisis cuantitativos de las imágenes (**Figura 3.2.9b**) demuestran que el Ap induce un efecto osteogénico similar al del medio de diferenciación osteogénico. En comparación con las células no tratadas, las muestras de Mg-Ap y Mn-Ap también presentaban niveles significativamente superiores de actividad ALP, lo que indica una tasa mayor de diferenciación osteogénica. Sin embargo, estos resultados sugieren que, en las condiciones experimentales ensayadas, la capacidad osteogénica de Ap se ve reducida por la introducción de iones metálicos en su estructura cristalina y probablemente por la presencia de la fase M-W. A su vez, la introducción de Co, disminuye drásticamente la capacidad osteogénica del Ap debido a las ya mencionadas propiedades antiproliferativas.²⁵⁷

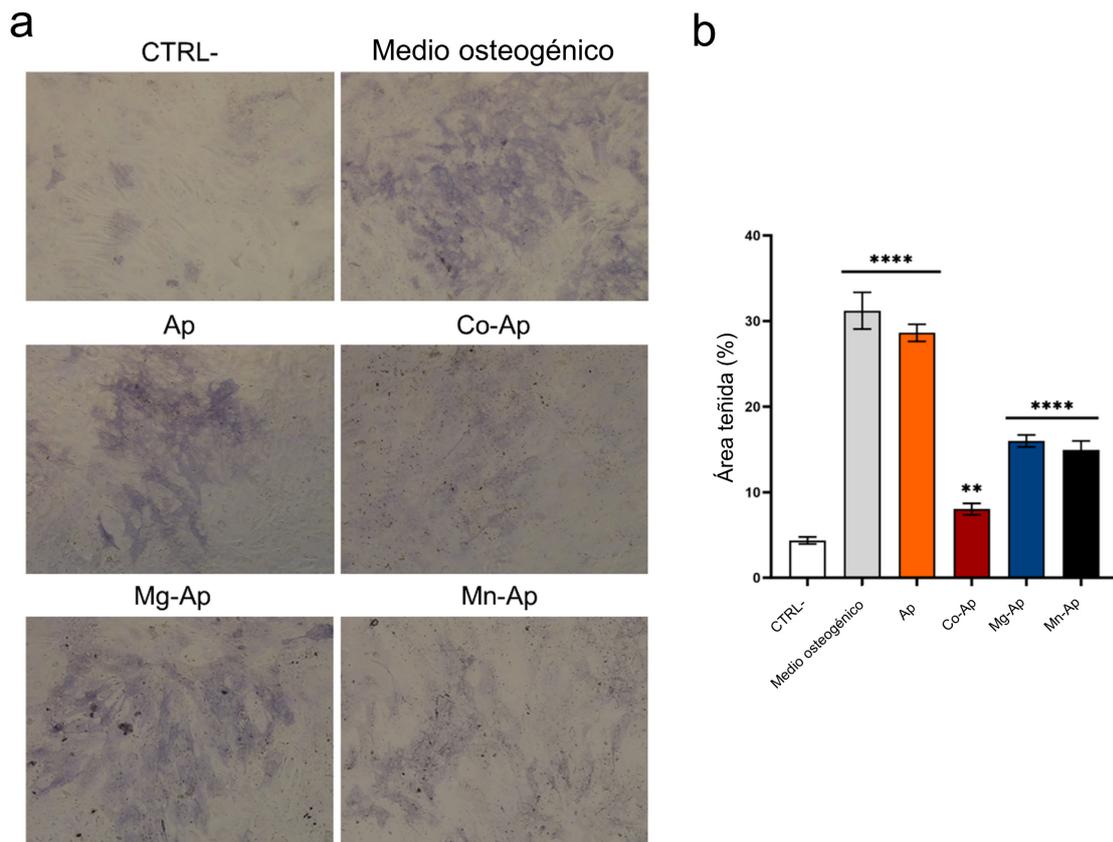


Figura 3.2.9. Efecto de las nanopartículas sobre la actividad de la enzima ALP en células m17.ASC. Imágenes de microscopio tomadas con 200 aumentos. Análisis cuantitativo de la actividad ALP obtenido mediante el recuento del área teñida con el software ImageJ. La estadística se calculó mediante ANOVA unidireccional con posttest de comparación de Dunnett frente a CTRL⁻ (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

3.2.3.2.2.3. Tinción Rojo de Alizarina

Además de la ALP, la tinción ARS es un indicador importante del proceso de diferenciación osteogénica, ya que permite observar y cuantificar los depósitos de calcio en la matriz celular lo que se considera un rasgo distintivo de la osteogénesis que se produce durante la última fase de diferenciación

La **figura 3.2.10a** muestra las imágenes de microscopía óptica, mientras que la **figura 3.2.10b** muestra el correspondiente análisis cuantitativo de los experimentos con ARS tras 14 días de incubación con las células m17.ASC. Los datos demuestran la no mineralización de la matriz celular en las células no tratadas (CTRL⁻), mientras que las células tratadas con el medio de diferenciación osteogénica presentan la mayor tasa de mineralización. En cuanto al tratamiento con nanopartículas, el Ap presenta la mayor tasa

de mineralización, estando casi al mismo nivel que el medio osteogénico. Por su parte, las nanopartículas dopadas con metales también fueron capaces de inducir un aumento significativo de la matriz de mineralización lo que demuestra un impacto en la capacidad osteogénica. En este caso, la tendencia de las muestras dopadas con Co, es similar a la ya reportada, ya que presenta los valores de absorbancia más bajos.

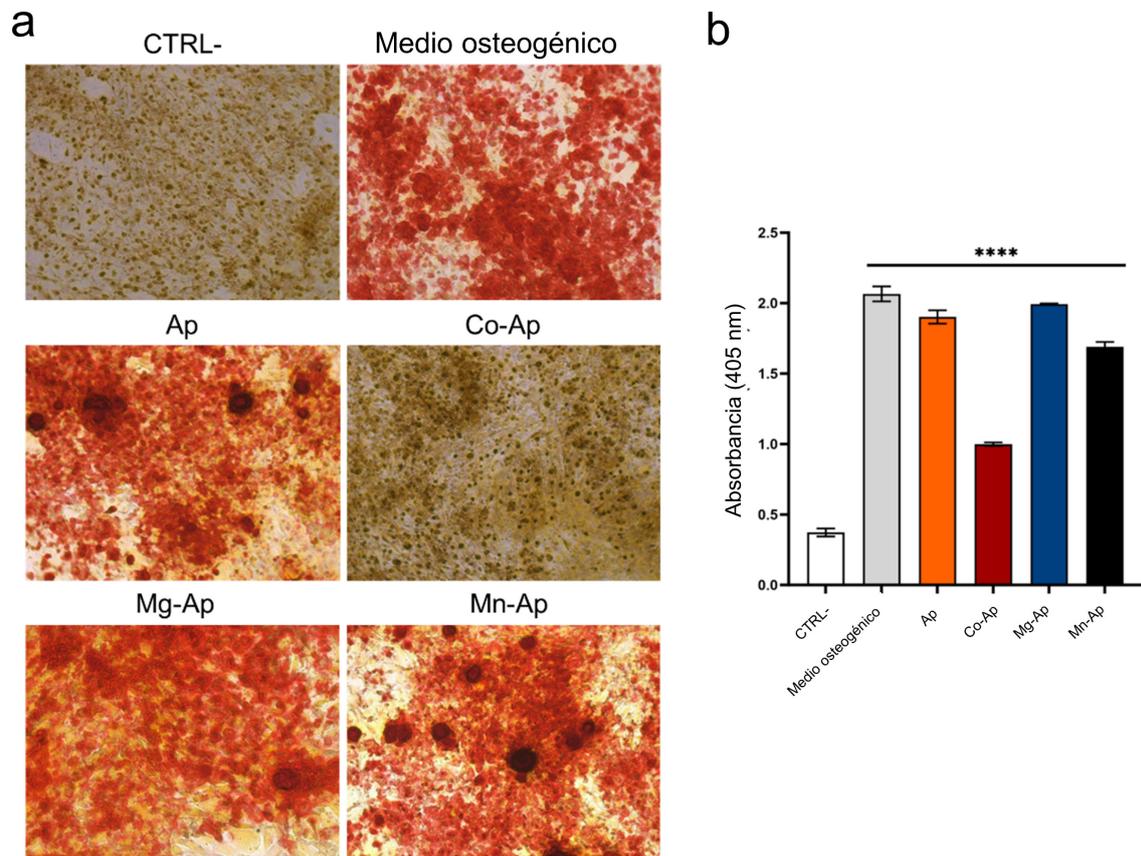


Figura 3.2.10. Efecto de las nanopartículas sobre los depósitos de calcio en la matriz celular m.17.ASC teñida con ARS y cuantificadas. (a) Imágenes de microscopio óptico de las células m17.ASC con un aumento de 200. (b) Análisis cuantitativo de ARS. La estadística se calculó mediante ANOVA unidireccional con posttest de comparación de Dunnett frente a CTRL⁻ (**** p < 0,0001).

En resumen, se ha logrado una transformación en una sola etapa del bCCP en nAp mediante la técnica hidrotermal a temperaturas de 200 °C. Durante este proceso, ha sido posible el dopaje de las nAp con iones biológicamente relevantes como Mn^{2+} , Co^{2+} y Mg^{2+} . La caracterización de las nAp ha revelado la presencia de grupos CO_3^{2-} en la estructura, así como morfologías en placas y varillas, típicamente del Ap biológico. La introducción de iones metálicos ha demostrado tener un impacto en el tamaño de partícula del Ap, así como aumentar la tendencia a la agregación, propiedades, que son relevantes en los fenómenos de regeneración ósea. El comportamiento biológico de estas nanopartículas ha sido excelente, demostrando una alta citocompatibilidad cuando se incuban con células madre endoteliales y mesenquimales murinas y permitiendo la modulación de genes y la actividad enzimática de factores clave involucrados en la diferenciación osteogénica *in vitro*.

La publicación de los resultados de este capítulo se encuentra en fase de preparación.

3.2.4. Referencias

- (226) Jacob, D. E.; Soldati, A. L.; Wirth, R.; Huth, J.; Wehrmeister, U.; Hofmeister, W. Nanostructure, Composition and Mechanisms of Bivalve Shell Growth. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2008, 72 (22), 5401–5415. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.08.019>.
- (227) Rujitanapanich, S.; Kumpapan, P.; Wanjanoi, P. Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation. *Energy Procedia* 2014, 56 (C), 112–117. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2014.07.138>.
- (228) Scialla, S.; Carella, F.; Dapporto, M.; Sprio, S.; Piancastelli, A.; Palazzo, B.; Adamiano, A.; Esposti, L. D.; Iafisco, M.; Piccirillo, C. Mussel Shell-Derived Macroporous 3D Scaffold: Characterization and Optimization Study of a Bioceramic from the Circular Economy. *Mar. Drugs* 2020, 18 (6), 309. <https://doi.org/10.3390/md18060309>.
- (229) Pal, A.; Maity, S.; Chabri, S.; Bera, S.; Chowdhury, A. R.; Das, M.; Sinha, A. Mechanochemical Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite from Mercenaria Clam Shells and Phosphoric Acid. *Biomed. Phys. Eng. Express* 2017, 3 (1), 015010. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa54f5>.
- (230) Santhosh, S.; Balasivanandha Prabu, S. Thermal Stability of Nano Hydroxyapatite Synthesized from Sea Shells through Wet Chemical Synthesis. *Mater. Lett.* 2013, 97, 121–124. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2013.01.081>.
- (231) Goloshchapov, D. L.; Lenshin, A. S.; Savchenko, D. V.; Seredin, P. V. Importance of Defect Nanocrystalline Calcium Hydroxyapatite Characteristics for Developing the Dental Biomimetic Composites. *Results Phys.* 2019, 13, 102158. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102158>.
- (232) Fernández-Penas, R.; Verdugo-Escamilla, C.; Triunfo, C.; Gärtner, S.; D'Urso, A.; Oltolina, F.; Follenzi, A.; Maoloni, G.; Cölfen, H.; Falini, G.; Gómez-Morales, J. A Sustainable One-Pot Method to Transform Seashell Waste Calcium Carbonate to Osteoinductive Hydroxyapatite Micro-Nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* 2023, 11 (32), 7766–7777. <https://doi.org/10.1039/d3tb00856h>.
- (233) Torres-Mansilla, A.; Álvarez-Lloret, P.; Fernández-Penas, R.; D'Urso, A.; Baldión, P. A.; Oltolina, F.; Follenzi, A.; Gómez-Morales, J. Hydrothermal Transformation of Eggshell Calcium Carbonate into Apatite Micro-Nanoparticles: Cytocompatibility and Osteoinductive Properties. *Nanomaterials* 2023, 13 (16), 2299. <https://doi.org/10.3390/nano13162299>.
- (234) Predoi, D.; Iconaru, S. L.; Predoi, M. V.; Stan, G. E.; Buton, N. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Magnesium-Doped Hydroxyapatite Suspensions. *Nanomater.* 2019, Vol. 9, Page 1295 2019, 9 (9), 1295. <https://doi.org/10.3390/NANO9091295>.
- (235) Kanchana, P.; Sudhan, N.; Sekar, C.; Neri, G. Manganese Doped Hydroxyapatite Nanoparticles Based Enzyme-Less Electrochemical Sensor for Detecting Hydroquinone. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2018, 19 (4), 2034–2043. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.15760>.

- (236) Shi, Q.; Luo, X.; Huang, Z.; Midgley, A. C.; Wang, B.; Liu, R.; Zhi, D.; Wei, T.; Zhou, X.; Qiao, M.; Zhang, J.; Kong, D.; Wang, K. Cobalt-Mediated Multi-Functional Dressings Promote Bacteria-Infected Wound Healing. *Acta Biomater.* 2019, 86, 465–479. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.048>.
- (237) Mo, Y.; Zhu, X.; Hu, X.; Tollerud, D. J.; Zhang, Q. Cytokine and NO Release from Peripheral Blood Neutrophils after Exposure to Metal Nanoparticles: In Vitro and Ex Vivo Studies. *Nanotoxicology* 2008, 2 (2), 79–87. <https://doi.org/10.1080/17435390802112874>.
- (238) Rey, C.; Marsan, O.; Combes, C.; Drouet, C.; Grossin, D.; Sarda, S. Characterization of Calcium Phosphates Using Vibrational Spectroscopies; Springer, Berlin, Heidelberg, 2014; pp 229–266. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0_8.
- (239) Gómez-Morales, J.; Fernández-Penas, R.; Acebedo-Martínez, F. J.; Romero-Castillo, I.; Verdugo-Escamilla, C.; Choquesillo-Lazarte, D.; Esposti, L. D.; Jiménez-Martínez, Y.; Fernández-Sánchez, J. F.; Iafisco, M.; Boulaiz, H. Luminescent Citrate-Functionalized Terbium-Substituted Carbonated Apatite Nanomaterials: Structural Aspects, Sensitized Luminescence, Cytocompatibility, and Cell Uptake Imaging. *Nanomaterials* 2022, 12 (8), 2385–2397. <https://doi.org/10.3390/nano12081257>.
- (240) INTERNATIONAL STANDARD, I. Biological Evaluation of Medical Devices —Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. In ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009/(R)2014; Biological evaluation of medical devices —Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; 2009. <https://doi.org/10.2345/9781570203558.ch1>.
- (241) Papageorgiou, I.; Brown, C.; Schins, R.; Singh, S.; Newson, R.; Davis, S.; Fisher, J.; Ingham, E.; Case, C. P. The Effect of Nano- and Micron-Sized Particles of Cobalt–Chromium Alloy on Human Fibroblasts in Vitro. *Biomaterials* 2007, 28 (19), 2946–2958. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.02.034>.
- (242) Sule, K.; Umbhaar, J.; Prenner, E. J. Mechanisms of Co, Ni, and Mn Toxicity: From Exposure and Homeostasis to Their Interactions with and Impact on Lipids and Biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2020, 1862 (8), 183250. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2020.183250>.
- (243) Chou, Y. F.; Huang, W.; Dunn, J. C. Y.; Miller, T. A.; Wu, B. M. The Effect of Biomimetic Apatite Structure on Osteoblast Viability, Proliferation, and Gene Expression. *Biomaterials* 2005, 26 (3), 285–295. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.02.030>.
- (244) Surmenev, R. A.; Surmeneva, M. A.; Ivanova, A. A. Significance of Calcium Phosphate Coatings for the Enhancement of New Bone Osteogenesis – A Review. *Acta Biomater.* 2014, 10 (2), 557–579. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.10.036>.
- (245) Xiao, D.; Zhang, J.; Zhang, C.; Barbieri, D.; Yuan, H.; Moroni, L.; Feng, G. The Role of Calcium Phosphate Surface Structure in Osteogenesis and the Mechanisms Involved. *Acta Biomater.* 2020, 106, 22–33. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.12.034>.

- (246) Wu, T.; Shi, H.; Liang, Y.; Lu, T.; Lin, Z.; Ye, J. Improving Osteogenesis of Calcium Phosphate Bone Cement by Incorporating with Manganese Doped β -Tricalcium Phosphate. *Mater. Sci. Eng. C* 2020, 109, 110481. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110481>.
- (247) Liu, Y.; Li, H.; Xu, J.; TerBush, J.; Li, W.; Setty, M.; Guan, S.; Nguyen, T. D.; Qin, L.; Zheng, Y. Biodegradable Metal-Derived Magnesium and Sodium Enhances Bone Regeneration by Angiogenesis Aided Osteogenesis and Regulated Biological Apatite Formation. *Chem. Eng. J.* 2021, 410, 127616. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.127616>.
- (248) Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Understanding of Dopant-Induced Osteogenesis and Angiogenesis in Calcium Phosphate Ceramics. *Trends Biotechnol.* 2013, 31 (10), 594–605. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2013.06.005>.
- (249) Zamperone, A.; Pietronave, S.; Merlin, S.; Colangelo, D.; Ranaldo, G.; Medico, E.; Di Scipio, F.; Berta, G. N.; Follenzi, A.; Prat, M. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Multipotent Mesenchymal Cell Line Derived from Mouse Subcutaneous Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2013, 22 (21), 2873–2884. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0718>.
- (250) Köllmer, M.; Buhrman, J. S.; Zhang, Y.; Gemeinhart, R. A. Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *J. Dev. Biol. tissue Eng.* 2013, 5 (2), 18. <https://doi.org/10.5897/JDBTE2013.0065>.
- (251) Jikko, A.; Harris, S. E.; Chen, D.; Mendrick, D. L.; Damsky, C. H. Collagen Integrin Receptors Regulate Early Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2. *J. Bone Miner. Res.* 1999, 14 (7), 1075–1083. <https://doi.org/10.1359/JBMR.1999.14.7.1075>.
- (252) Amarasekara, D. S.; Kim, S.; Rho, J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 2851 2021, 22 (6), 2851. <https://doi.org/10.3390/IJMS22062851>.
- (253) Hatakeyama, W.; Taira, M.; Chosa, N.; Kihara, H.; Ishisaki, A.; Kondo, H. Effects of Apatite Particle Size in Two Apatite/Collagen Composites on the Osteogenic Differentiation Profile of Osteoblastic Cells. *Int. J. Mol. Med.* 2013, 32 (6), 1255–1261. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1516>.
- (254) Denhardt, D. T.; Noda, M. Osteopontin Expression and Function: Role in Bone Remodeling. *J. Cell. Biochem. Suppl* 1998, 30, 92–102. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(1998\)72:30/31](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31).
- (255) Chen, J. H.; Chen, Y. C.; Mao, C. L.; Chiou, J. M.; Tsao, C. K.; Tsai, K. S. Association between Secreted Phosphoprotein-1 (SPP1) Polymorphisms and Low Bone Mineral Density in Women. *PLoS One* 2014, 9 (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0097428>.
- (256) Atkins, G. J.; Kostakis, P.; Pan, B.; Farrugia, A.; Gronthos, S.; Evdokiou, A.; Harrison, K.; Findlay, D. M.; Zannettino, A. C. W. RANKL Expression Is Related to the Differentiation State of Human Osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 2003, 18 (6), 1088–1098.

<https://doi.org/10.1359/JBMR.2003.18.6.1088>.

- (257) Liang, W.; Ding, P.; Qian, J.; Li, G.; Lu, E.; Zhao, Z. Polarized M2 Macrophages Induced by Mechanical Stretching Modulate Bone Regeneration of the Craniofacial Suture for Midfacial Hypoplasia Treatment. *Cell Tissue Res.* 2021, 386 (3), 585–603. <https://doi.org/10.1007/S00441-021-03533-5/FIGURES/7>.

3.3. Nucleación de apatito sobre láminas de grafeno y óxido de grafeno funcionalizadas mediante difusión de vapor en microgotas

3.3.1. Introducción

A pesar de ser el mayor constituyente inorgánico del tejido óseo y exhibir unas propiedades biológicas excelentes,^{207,258} el nAp tiene un uso limitado en sustitución ósea, ya que carece de las propiedades mecánicas adecuadas.^{258,259} La preparación de materiales híbridos (composites) que combinen las propiedades bioactivas del nAp con las propiedades mecánicas de un material de refuerzo, es una estrategia de gran interés para enfrentar este desafío.^{260,261}

En este capítulo se ha explotado la técnica de mineralización en microgotas por difusión de vapor (del inglés, *sitting drop vapour diffusion*, SDVD) para generar nanocomposites de Ap con propiedades híbridas. Esta técnica, investigada desde hace tiempo por nuestro grupo de investigación, permite inducir la nucleación de nAp biomimético sobre diferentes superficies.²⁶²⁻²⁶⁴ En este caso particular, y debido a sus excelentes propiedades mecánicas, se han seleccionado materiales derivados del grafito, como son G y GO, para actuar como superficies heteronucleantes en la deposición del nAp y preparar así nanocomposites G/nAp y GO/nAp que permitan mejorar las propiedades mecánicas del Ap.

Durante el proceso de exfoliación mediante sonicación en fase líquida (*sonication assisted liquid phase exfoliation*, LPE) del grafito se han utilizado diferentes biomoléculas, a saber, los aminoácidos esenciales L-arginina (L-Arg), L-alanina (L-Aln) y ácido L-aspartico (L-Asp), y el ácido cítrico (Cit) (**Figura 3.3.1**).²⁶⁵ Además de actuar como biotensioactivos estabilizando las suspensiones de G y GO, se espera que estas biomoléculas funcionalicen sus superficies, y desempeñen un papel importante en la nucleación y en las propiedades del nAp depositado.^{71,266,267} Adicionalmente, para completar la paleta de aplicaciones de los nanocomposites se han introducido iones Tb³⁺ en la formulación, con objeto de desarrollar un material que combine las propiedades biológicas del nAp, las propiedades mecánicas del G y GO y las propiedades luminiscentes del Tb³⁺.²⁶⁸

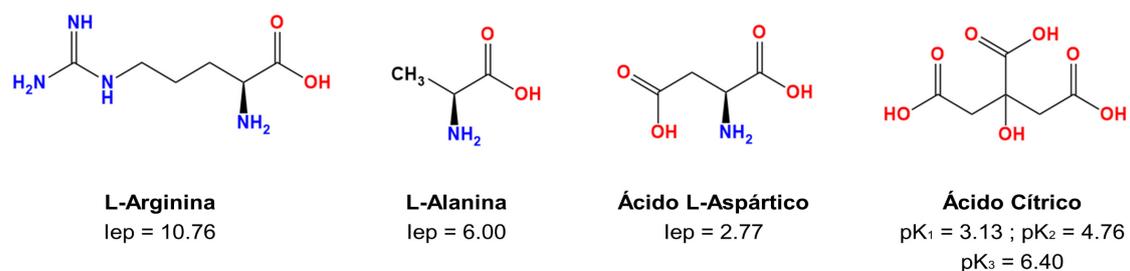


Figura 3.3.1. Diagrama de los aminoácidos utilizados para la LPE de grafito y la estabilización de suspensiones de GO, los puntos isoeléctricos y los pK_a del ácido cítrico

Los objetivos desarrollados en este capítulo se centran en evaluar la capacidad del método SDVD para la síntesis de nanocomposites híbridos G/nAp, GO/nAp y dopados con Tb³⁺. Se ha realizado una caracterización exhaustiva de los materiales evaluando sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, abordando aspectos de composición, morfología, estabilidad, fluorescencia, propiedades mecánicas y biocompatibilidad, además de estudiar la influencia de los diferentes aminoácidos sobre las propiedades finales del material.

3.3.2. Síntesis de los nanocomposites

Las láminas de G se prepararon mediante la técnica LPE a partir de grafito. En este proceso las biomoléculas L-Arg, L-Aln, L-Asp y Cit actuaron como tensioactivos para estabilizar las suspensiones. Se prepararon suspensiones de 10 mL que contenían 100 mg de grafito (Sigma-Aldrich, pureza 99.99%) y 3.48 mg de L-Arg, 1.78 mg de L-Aln, 2.66 mg de L-Asp o 3.84 mg de Cit (Sigma-Aldrich, pureza 99%) en agua desionizada ultrapura (Milli-Q). La sonicación se realizó durante 5 horas en baño de hielo para evitar aumentos desmesurados de la temperatura. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió cuidadosamente y se sónico nuevamente durante 1 hora, seguido de una segunda centrifugación de 5 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante final se retiró y se almacenó a 4 °C antes de los experimentos de mineralización. De manera similar, las suspensiones de GO (10 mL) se prepararon diluyendo 1 mL de GO concentrado (Sigma-Aldrich, pureza 99.99%) y 3.48 mg de L-Arg, 1.78 mg de L-Aln, 2.66 mg de L-Asp o 3.84 mg de Cit. La mezcla se sonicó durante 30 minutos. Tras la preparación de las suspensiones de G y GO se midió el pH para evaluar su variación durante la fase de precipitación.

Los experimentos de mineralización se llevaron a cabo mediante el método SDVD en una “seta de cristalización” (Triana Sc. & Tech, S.L.) a 20 °C y 1 atm de presión total. En la “seta de cristalización”, la cámara de cristalización (superior) y de generación de gas (inferior) están conectadas a través de un agujero de 6 mm de diámetro para permitir la difusión de vapor. La tapa de vidrio y la cámara de cristalización se sellaron con grasa de silicona. Se utilizó una seta de cristalización para cada nanocomposite. En las setas, se colocaron 10 gotas de 40 μL que se prepararon mezclando 20 μL de suspensiones de G o GO más 50 mM de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ con 20 μL de 30 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, mientras que la cámara de generación de gas se depositan 3 mL de una solución de 40 mM NH_4HCO_3 . En cada seta se incluyeron 2 gotas de solución de control sin material de refuerzo. Los experimentos duraron 21 días, asegurando la maduración del Ap depositado. Al final del experimento, todas las gotas de la misma condición se recogieron en un mismo eppendorf de 1 mL y se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm, para posteriormente retirar el sobrenadante y lavar el pellet resultante con 1 mL de agua (2 lavados). El pellet final se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 día.

3.3.3. Resultados y discusión

3.3.3.1. Especiación, sobresaturación y propiedades físico-químicas

El primer paso para estudiar la nucleación heterogénea de CaPs sobre láminas de G y GO mediante SDVD es evaluar la evolución de la especiación iónica y sobresaturación en las gotas. La **figura 3.3.2a** representa la actividad de las principales especies iónicas en función del pH; a saber, calcio, acetato, fosfato y pares iónicos y neutros. Por simplicidad, la actividad de los aminoácidos no se ha considerado en los cálculos; sólo las actividades de las especies que contienen carbonato, incluida la del CO_3^{2-} libre. De este modo, la descomposición de NH_4HCO_3 en CO_2 y NH_3 , en la cámara inferior de la seta, produce un aumento de la presión parcial y ascenso de ambos gases a la cámara superior, difundiéndose en las gotas. Ello genera un aumento progresivo de iones amonio y OH^- que eleva el pH, lo que provoca una ligera desestabilización del complejo $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})^+$, disminuyendo la actividad de la especie $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})^+$ a la vez que la actividad de Ca^{2+} aumenta. Además, el aumento de pH también conduce a una disminución en la actividad del par iónico $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)^+$ y un aumento en la actividad de los pares CaPO_4^- y CaHPO_4 .

La gráfica de sobresaturación ($S.I. > 1$) (**Figura 3.3.2b**) muestra como el aumento del pH genera una sobresaturación en las fases $ACP < OCP < HA$ mientras disminuye para la brushita, cuyo intervalo de estabilidad se encuentra en un rango de pHs más ácido. Por tanto, de acuerdo con la regla de Ostwald, la secuencia de precipitación a $pH > 6$ es ACP primero, luego OCP y finalmente HA, la fase más insoluble. La probabilidad de precipitación de $CaCO_3$ (calcita) en todo el rango de pH es muy pequeña. En un experimento control de SDVD (sin aditivos ni láminas), el pH aumentó lentamente desde 5.4 hasta alcanzar el equilibrio a pH 8.2-8.3 en 7 días. En este ensayo, la fase OCP se observó tras 1 día de experimento, después comenzaron a observarse los nanocristales aciculares de Ap y a los 7 días el OCP había casi desaparecido. Por este motivo todos los experimentos se llevan a cabo con tiempos de maduración más largos, de 21 días, para asegurar la mineralización sólo con Ap. En todos los experimentos realizados en presencia de G y GO, la difusión de vapor elevó el pH de las gotas hasta valores de 8.1, pH considerado óptimo para formación del Ap.⁶⁴ Sin embargo, las variaciones en los puntos isoeléctricos de los aminoácidos tienen un impacto sustancial en el pH inicial, influyendo posteriormente en las características del apatito y del composite resultante. El pH inicial de las soluciones fue el siguiente G-Arg, 7.34; G-Aln, 6.24; G-Asp, 3.85; G-Cit, 3.30; GO-Arg, 3.94; GO-Aln, 3.15; GO-Asp 3.00, y GO-Cit, 3.10.

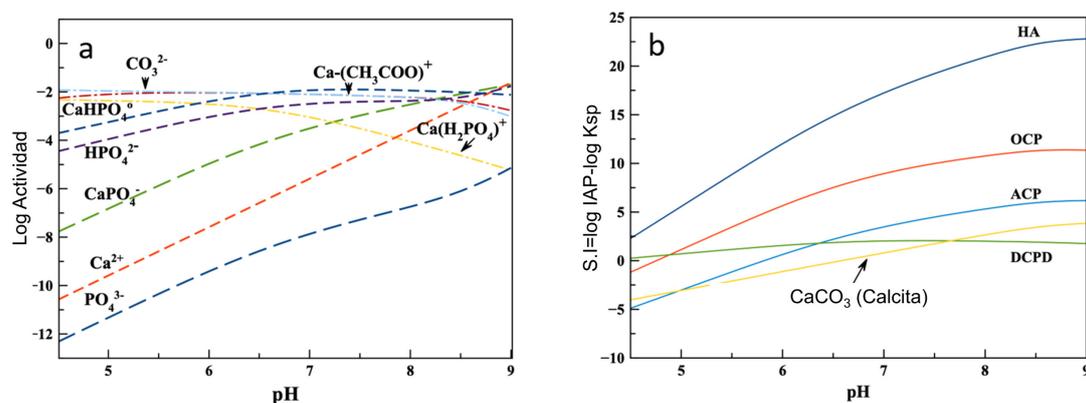


Figura 3.3.2. (a) Actividad de las especies iónicas y neutras en solución acuosa en función del pH. (b) Evolución de los índices de saturación en solución respecto de las principales fases sólidas del CaP (ACP, DCPD, OCP y HA) y respecto de $CaCO_3$ (fase calcita).

Tras la evaluación de la actividad iónica en solución acuosa, se procede a la caracterización en estado sólido de los nanocomposites. En PXRD (**Figura 3.3.3a,d,g,j**) columna izquierda) los sólidos obtenidos muestran las reflexiones características del Ap (ASTM no. 9-432): a $2\theta = 25.87^\circ$, correspondiente al plano (002); el triplete en 31.77° ,

32.19° y 32.90°, correspondiente a los planos (211), (112) y (300)); las reflexiones en 33.9°, 35.48° y 39.81° (planos (202), (301) y 310), y otros picos pequeños en el intervalo 2θ de 40°-55°. No se observaron reflexiones asociadas a otros CaPs, como fosfato octacálcico (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ASTM no. 26-1056) y brushita (ASTM no. 11-295). Destacando casos aislados, GO-Aln-Ap-Tb muestra una pequeña reflexión adicional en $2\theta=29.5^\circ$ característica del óxido terbio (PDF 00-019-1326). Sin embargo, en las muestras de G que contienen Tb^{3+} , se observa la reflexión principal del grafito en $2\theta=26.51^\circ$ (PDF 01-089-7213), lo que indicaría que algunos copos de grafito permanecieron en la suspensión sin exfoliarse completamente. Además del estudio de las fases presentes en los composites, la caracterización mediante PXRD nos aporta información morfológica del Ap depositado. La amplitud de las reflexiones del Ap es debida al tamaño nanométrico de los dominios cristalinos, cuya dimensión promedio es 30 ± 2 nm. Por su parte, la presencia de reflexiones muy estrechas en relación a las demás, como la observada a 25.87° (plano 002), indica el carácter anisotrópico del Ap, característico del apatito biológico con biología acicular.

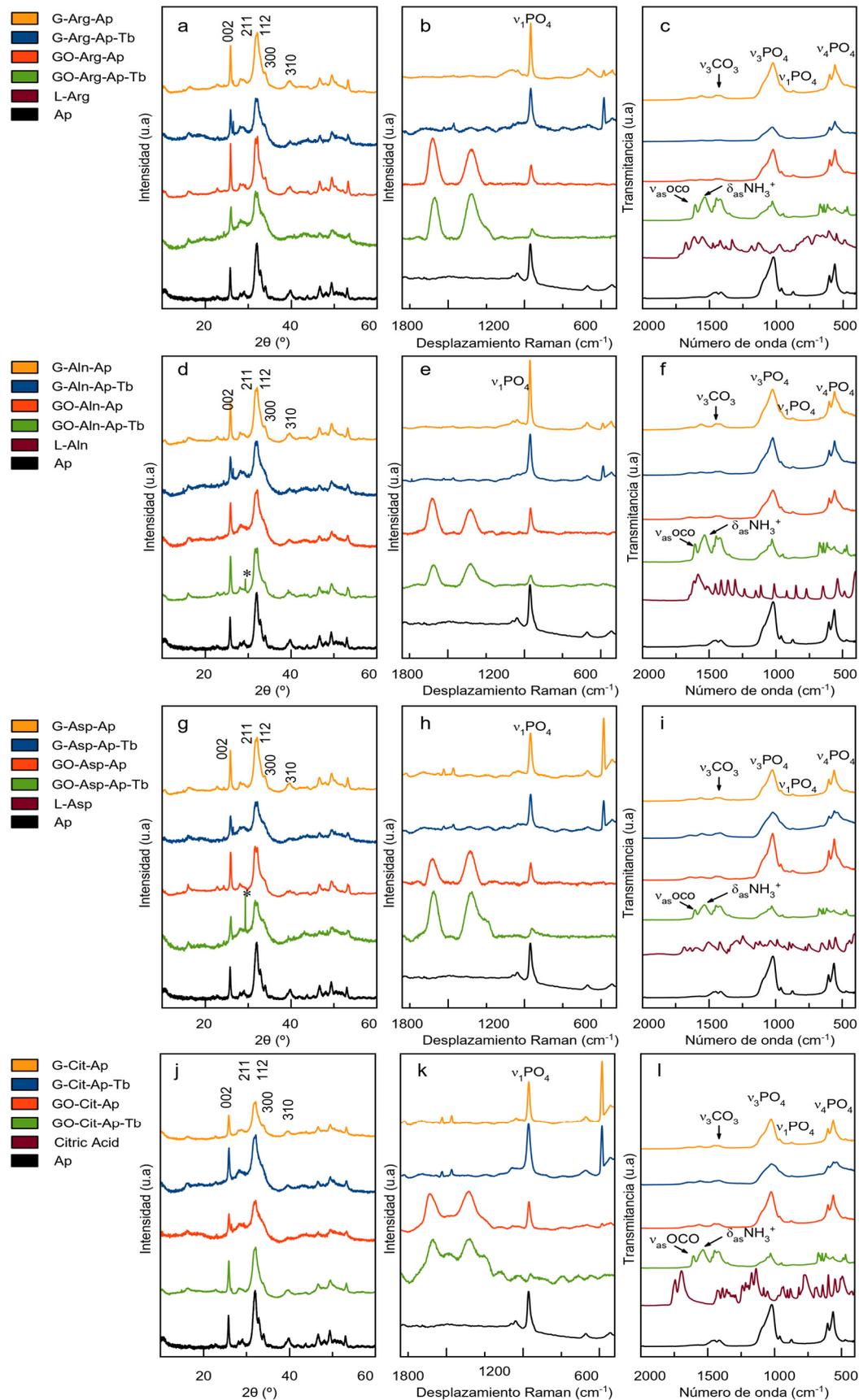


Figura 3.3.3. Difractogramas PXRD (a,d,g,j) y espectros Raman (b,e,h,k) y FTIR (c,f,i,l) de las muestras obtenidas por el método VDSO a 21 días.

Al igual que los diagramas PXRD, los espectros Raman representados en la **figura 3.3.3b,e,h,k** muestran las principales señales del Ap a $958\text{-}962\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_1\text{PO}_4$), cm^{-1} ($\nu_2\text{PO}_4$), $585\text{-}588\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_4\text{PO}_4$) y 1043 cm^{-1} ($\nu_3\text{PO}_4$), mientras que las de CO_3 ($\nu_1\text{CO}_3$) se localizan alrededor de $1069\text{-}1071\text{ cm}^{-1}$, indicando la carbonatación del mineral, un aspecto fundamental del apatito biológico.^{269,270} La observación de las bandas D, G y 2D características del grafeno no ha sido posible con el microespectrómetro Raman (espectrómetro + microscopio óptico) del laboratorio debido a la pequeña cantidad de láminas obtenidas y su extremada delgadez. En un trabajo anterior, estas bandas sólo pudieron ser observadas con un espectrómetro Raman acoplado a un microscopio VPSEM.²⁶² En el caso de las muestras de GO comerciales se observan dos bandas de gran amplitud en 1350 y 1590 cm^{-1} , que podrían deberse a las bandas D y G, observables en este caso, debido a que el porcentaje en masa de GO con respecto al Ap precipitado es mayor.

Los espectros FTIR (**Figura 3.3.3c,f,i,l**) también permiten identificar las principales señales del Ap en las muestras, una banda intensa a $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ atribuida al modo de tensión asimétrica de los grupos PO_4^{3-} ($\nu_3\text{PO}_4$), y las bandas en $958\text{-}960\text{ cm}^{-1}$ debidas a la tensión simétrica ($\nu_1\text{PO}_4$). Los modos de flexión de los grupos PO_4^{3-} ($\nu_4\text{PO}_4$) aparecen aproximadamente entre 608 y 564 cm^{-1} , mientras que el modo $\nu_2\text{PO}_4$ lo hace en 470 cm^{-1} . La presencia de carbonato en las muestras se observa gracias al modo vibracional $\nu_3\text{CO}_3$, con señales entre 1414 y 1473 cm^{-1} , y el modo $\nu_2\text{CO}_3$ con un pico pequeño alrededor de 875 cm^{-1} . A pesar de que los espectros de G no muestran características notables, las muestras de GO, muestran una señal amplia alrededor de 3650 cm^{-1} en la zona de alta frecuencia que se atribuye al estiramiento del enlace O–H, y otra señal en 1720 cm^{-1} debida a la tensión simétrica del enlace C=O, característico de los grupos carboxilato. Además, podemos encontrar algunas bandas en el intervalo de números de onda de 1300 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} que se corresponden con las señales del grupo -COO^- y otras en los intervalos $1400\text{-}1430/1560\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ debidas a la tensiones simétrica y asimétrica del grupo $\text{-NH}_2\cdots\text{H}^+$. Estas señales corresponden a los grupos funcionales de los aminoácidos utilizados para funcionalizar los composites.²⁷¹⁻²⁷³ Las bandas de los aminoácidos muestran mayor intensidad que las de los grupos PO_4^{3-} en los compuestos de GO/Ap dopados con Tb^{3+} y más baja en aquellos sin dopar. En los nanocompuestos de G/Ap, la intensidad relativa de estas bandas es muy baja. La intercalación de las biomoléculas entre las escamas de G exfoliadas después de la LPE

podría explicar esta observación. De forma general, estos resultados confirman la mineralización de las láminas de G y GO con nAp de características biomiméticas mediante la metodología VDS, además de la funcionalización de G y GO durante la etapa de sonicación.

El tipo de carbonatación (A o B) se puede determinar mediante deconvolución de la banda $\nu_2\text{CO}_3$ (picos ~ 880 y $\sim 872\text{ cm}^{-1}$) de los espectros FTIR. El grado de carbonatación promedio de los cristales de Ap se ha determinado mediante el método de Grunenwald et al.²¹² a partir de la relación de áreas de las bandas correspondientes a los modos $\nu_3\text{CO}_3$ y $\nu_1\nu_3\text{ PO}_4$ (rc/p). Los datos obtenidos se recogen en la **tabla 3.3.1** y muestran un mayor grado de carbonatación en los composites generados con GO

Tabla 3.3.1. Porcentaje en peso de carbonato.

				Ap			
WT%CO ₃				3.21± 0.3			
G-Arg	G-Aln	G-Asp	G-Cit	G-Arg-Tb	G-Aln-Tb	G-Asp-Tb	G-Cit-Tb
0.97± 0.01	1.07± 0.1	1.00± 0.1	1.31± 0.1	0.86± 0.1	1.12± 0.1	1.55± 0.1	1.37± 0.1
GO-Arg	GOAln	GO-Asp	GO-Cit	GO-Arg-Tb	GO-Aln-Tb	GO-Asp-Tb	GO-Cit-Tb
1.17± 0.01	1.70± 0.1	0.83± 0.1	1.44± 0.1	2.05± 0.1	2.08± 0.2	1.75± 0.1	2.41± 0.2

El análisis del potencial ζ y el PSD de los nanocomposites nos permite obtener información sobre la estabilidad de una suspensión acuosa coloidal, determinando la tendencia hacia la agregación o dispersión de las partículas. Cuanto mayor sea el potencial ζ en valor absoluto, mayor será la estabilidad de la suspensión.^{274,275} Los resultados (**Figura 3.3.4a**) indican que las suspensiones de G y GO, previas al proceso de mineralización, presentan un potencial ζ elevado en todo el rango de pH (4.0 a 11.0), lo que sugiere una gran estabilidad coloidal. Sin embargo, tras el proceso de mineralización los nanocomposites presentan potenciales ζ cercanos a cero, especialmente a pH fisiológicos (~ 7.4), indicando una clara tendencia a la agregación. Una tendencia similar se observa al estudiar la PSD (**Figura 3.3.4b**) en la que se muestra un aumento del tamaño de partícula después del proceso de mineralización. Estas observaciones generales no guardan una relación aparente con el punto isoeléctrico de los aminoácidos utilizados, ni con la presencia de Tb^{3+} en el apatito. Cabe destacar que, diferentes estudios señalan que aquellos materiales enfocados a aplicaciones de regeneración ósea deben poseer una capacidad considerable de aglomeración, además de mostrar una buena biocompatibilidad y osteoinductividad.

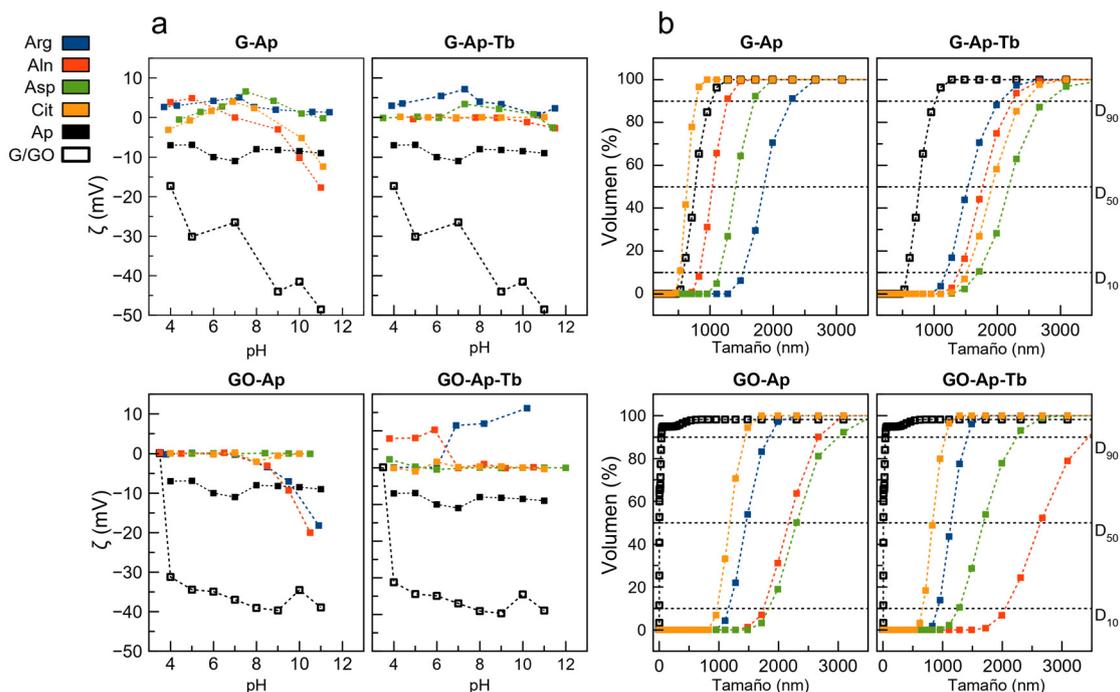


Figura 3.3.4. (a) valores de potencial ζ y (b) PSD en volumen acumulado de los nanocomposites.

La **figura 3.3.5a** muestra la caracterización morfológica de los materiales obtenidos en cada condición mediante SEM (columna izquierda) y TEM (columna derecha). Las imágenes SEM revelan una estructura multicapa en los compuestos de G, mientras que en aquellos basados en GO se observan estructuras laminares de menor grosor. Asimismo, se observan las partículas de Ap únicamente sobre las láminas de G y GO, y no fuera de ellas, lo que indicaría que la nucleación es fundamentalmente heterogénea. Este hecho se atribuye a los aminoácidos y el Cit que funcionalizan las superficies, ya que actúan como centros de nucleación para el CaP. Esto sugiere que las biomoléculas se encuentran adsorbidas en cierto grado a las superficies. Se observa además que el recubrimiento de Ap es más homogéneo y amplio en GO que en G. Ello puede ser debido a la gran cantidad de grupos funcionales OH- existentes en su superficie que actúan como puntos de nucleación del Ap. No se observan diferencias significativas en la morfología y en la densidad del recubrimiento entre muestras con diferentes aminoácidos.

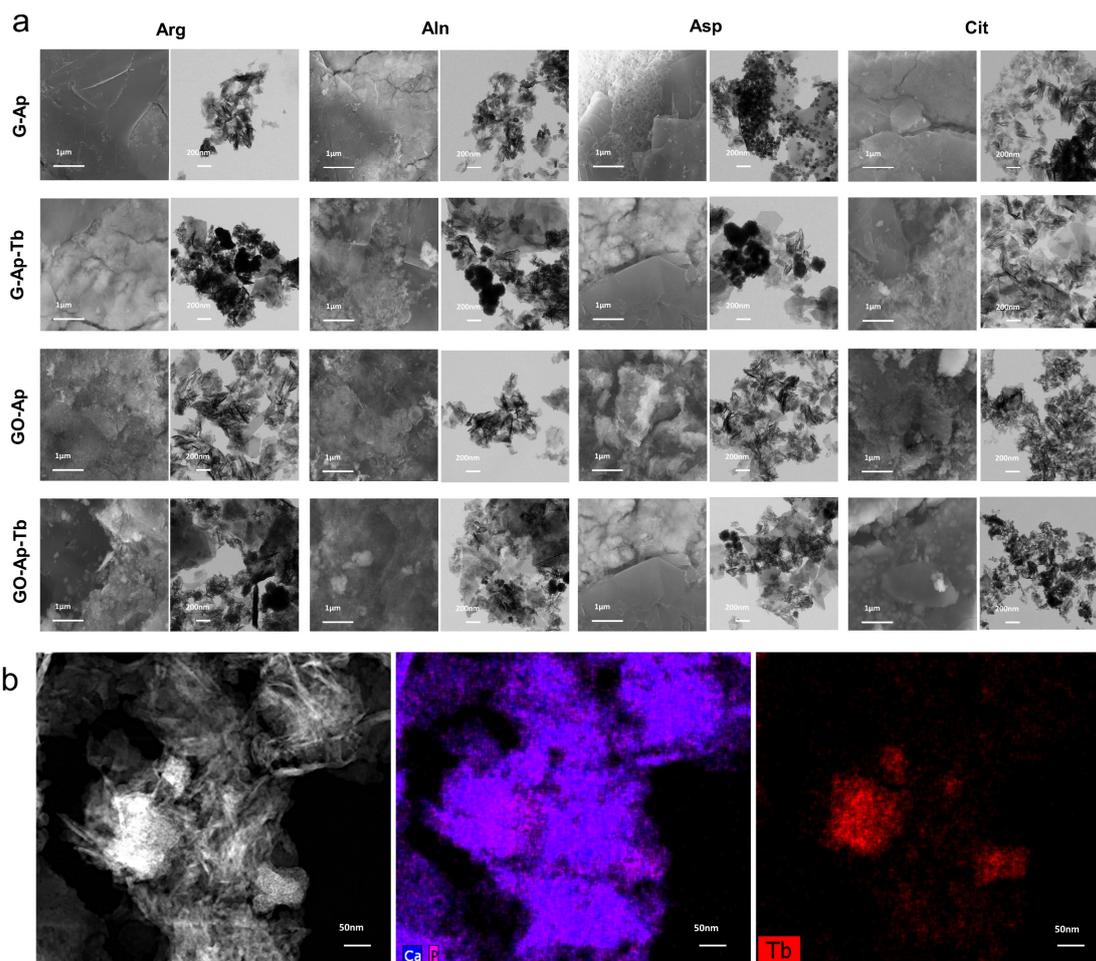


Figura 3.3.5. (a) Imágenes SEM (columna izquierda) y TEM (columna derecha) de los nanocomposites obtenidos usando cada una de las biomoléculas (b) Imagen microscópica HAADF-STEM y mapas de composición elemental EDX de Ca, P y Tb de la muestra G-Cit-Ap-Tb.

Las imágenes TEM nos muestran una morfología más detallada del composite. Se observa un Ap depositado de morfología acicular y tamaño nanométrico, de 50-60 nm de longitud y 6-10 nm de ancho, datos que concuerdan con los obtenidos inicialmente mediante PXRD. Además, se observa como el Ap tiende a la aglomeración en todas las muestras y condiciones, formando cúmulos de alta densidad de partículas, resultados que complementan los observados en el estudio del potencial ζ y PSD. Con respecto a las láminas de G y GO, se observa en ambos casos una población polidispersa con formas irregulares y tamaños que van desde 50 hasta 200 nm, resultantes de fracturas por sonicación. La estructura multicapa de G es apreciable a voltajes muy bajos (1-3 kV) en SEM, volviéndose transparentes a voltajes más altos, debido a su delgadez. Sin embargo,

se observan con gran nitidez en TEM. Por su parte, las partículas de grafito no exfoliado completamente se observan en SEM.

El análisis elemental mediante EDX se representa en la **figura 3.3.5b** y en la **tabla 3.3.2**. Estos datos muestran la presencia de carbono (C) y (O) en las muestras de G y GO, siendo el (O) mucho más abundante en las muestras de GO, como es de esperar. También podemos encontrar calcio (Ca) y fósforo (P) en el recubrimiento de Ap confirmando su composición. En las muestras dopadas con Tb^{3+} hemos encontrado una relación entre el contenido de Tb^{3+} y el punto isoeléctrico de los aminoácidos, de modo que las muestras con más contenido en Tb^{3+} son aquellas funcionalizadas con Arg (mayor punto isoeléctrico), a la que le siguen las funcionalizadas con Aln, Asp y Cit. Estos datos apoyan el hecho de que a pesar de que los aminoácidos no parezcan tener influencia en la morfología o densidad del Ap depositado, sí desempeñan un papel fundamental en la cantidad de iones Tb^{3+} que se introducen en el Ap. Es importante destacar que en los nanocomposites de G no se detectaron señales asociadas al nitrógeno (N) en FTIR, o éstas eran muy pequeñas en intensidad, mientras que en los nanocomposites de GO, excepto en GO-Cit, sí se observaron dichas señales, y se cuantificó su contenido en un porcentaje cercano al 10%. Esto se atribuye a una mayor incorporación de aminoácidos en el GO debido a los grupos funcionales ya presentes. Estas señales, y debido a la heterogeneidad de los nanocomposites, sólo se observaron en las zonas que no estaban cubiertas con nAp, lo cual indica que las biomoléculas se encuentran funcionalizando las láminas, actuando como interfaz entre la superficie y la capa de Ap depositada.

Tabla 3.3.2. Contenido en % atómico de los composites.

Elemento (%)	G-Arg	G-Aln	G-Asp	G-Cit
C	69.65	55.47	75.78	41.33
O	17.97	20.95	13.52	29.96
P	5.33	10.27	4.44	11.26
Ca	7.04	11.46	6.25	17.45
N	—	—	—	—
Elemento (%)	G-Arg-Tb	G-Aln-Tb	G-Asp-Tb	G-Cit-Tb
C	36.40	43.97	39.98	37.81
O	38.10	39.25	38.32	40.24
P	10.99	8.26	9.41	8.60
Ca	11.22	4.67	9.57	11.35
N	—	—	—	—
Tb	1.86	1.55	1.21	1.16

Tabla 3.3.2 (cont.). Contenido en % atómico de los composites.

Elemento (%)	GO-Arg	GO-Aln	GO-Asp	GO-Cit
C	20.12	28.62	44.48	38.31
O	41.28	28.01	32.31	27.88
P	11.43	12.17	3.05	11.80
Ca	18.34	22.12	6.65	14.50
N	8.80	9.08	10.02	7.42
Elemento (%)	GO-Arg-Tb	GO-Aln-Tb	GO-Asp-Tb	GO-Cit-Tb
C	30.87	31.03	25.52	28.46
O	36.03	32.12	49.04	50.30
P	10.63	11.22	3.99	8.82
Ca	13.35	15.18	12.97	9.42
N	9.07	8.73	6.74	—
Tb	3.28	1.68	1.49	1.26

3.3.3.2. Propiedades mecánicas de los nanocomposites

Uno de los objetivos principales en este capítulo, es la mejora de las propiedades mecánicas del Ap, para potenciar su uso en aplicaciones de ingeniería tisular. En este contexto, la rugosidad, adherencia, parámetros eléctricos (variación del potencial eléctrico, ΔV) y deformación elástica de los composites se evaluaron mediante AFM.

Los resultados obtenidos (**tabla 3.3.3**) muestran como aquellos nanocomposites de base GO presentan mayor rugosidad superficial que los obtenidos usando G, independientemente del aminoácido utilizado en la preparación, lo cual se explica por un mayor recubrimiento superficial, como se observa en SEM y TEM. Por su parte, la adición de Tb^{3+} también genera una mayor cantidad de precipitado en las láminas, aumentando la rugosidad superficial en todos los casos.

Con respecto a la adherencia, se observan valores similares entre el Ap y los nanocomposites funcionalizados con Asp y Cit en presencia de Tb^{3+} , sobre todo en el caso de los composites de base GO. Sin embargo, la fuerza de adhesión es inferior a la del Ap en las muestras preparadas con Arg y Aln, en presencia o ausencia de Tb^{3+} . Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios en lo que que la adición de GO a recubrimientos de Ap sobre titanio puede reducir la propagación de grietas superficiales y aumentar la resistencia de unión del recubrimiento, así como la resistencia a la corrosión, lo que favorece la biocompatibilidad, mientras genera una superficie bioactiva con propiedades antimicrobianas.

Se ha observado que la formación de nanocomposites disminuye drásticamente el potencial eléctrico con respecto al Ap, resultados que corroboran los datos observados en los estudios de potencial ζ , en los que se ha demostrado un carácter neutro de estos materiales. Además, un resultado notable, es como la presencia de iones Tb^{3+} en las muestras de G disminuye este parámetro, sin embargo, en aquellas obtenidas a partir de GO, el Tb^{3+} induce un aumento de ΔV en todos los casos.

Tabla 3.3.3. Valores de rugosidad, adherencia y variación del potencial de los nanocomposites de G y GO.

Composite	Rugosidad	Fuerza de adhesión	Variación del potencial eléctrico (mW)
Ap	35.8 ± 28.9	13.6 ± 3.2	13936
G-Arg-Ap	28.8 ± 23.7	3.7 ± 1.8	74
G-Arg-Ap-Tb	33.1 ± 10.7	6.3 ± 4.2	69
G-Aln-Ap	13.1 ± 9.9	5.8 ± 2.9	890
G-Aln-Ap-Tb	38.9 ± 28.7	7.6 ± 3.7	39.8
G-Asp-Ap	8.1 ± 6.1	14.8 ± 5.4	1358
G-Asp-Ap-Tb	23.3 ± 18.4	8.02 ± 6.5	32
G-Cit-Ap	6.8 ± 5.6	7.7 ± 3.2	1600
G-Cit-Ap-Tb	15.8 ± 10.5	8.6 ± 3.2	19.8
GO-Arg-Ap	120.4 ± 95.8	4.4 ± 3.1	147.6
GO-Arg-Ap-Tb	127.4 ± 97.3	6.2 ± 4.2	367
GO-Aln-Ap	41.1 ± 27.5	6.2 ± 16.3	16.52
GO-Aln-Ap-Tb	118.9 ± 99.1	10.2 ± 4.7	105.6
GO-Asp-Ap	133.5 ± 109.6	16.1 ± 6.2	110
GO-Asp-Ap-Tb	163.8 ± 116.2	21.5 ± 11.2	426
GO-Cit-Ap	105.2 ± 23.6	20.6 ± 10.1	21.2
GO-Cit-Ap-Tb	116.4 ± 90.8	31.06 ± 13.3	310

Los cálculos del módulo elástico mostraron variaciones significativas con valores extremos en los composites, ya que debido a su naturaleza heterogénea en el material coexisten láminas de G y GO no mineralizadas con láminas mineralizadas. Sin embargo, el uso de AFM permitió mapear las propiedades mecánicas a escala nanométrica, ya que, debido a su alta resolución, permite realizar mediciones en áreas y partículas individuales, posibilitando el estudio de heterogeneidades locales entre dominios cristalinos y dominios amorfos. Aunque la interacción sonda-muestra es muy compleja, el modelo de Hertz genera curvas de fuerza-indentación que indican que se alcanzan condiciones hertzianas de deformación elástica sin exceder el límite elástico de la muestra. Al igual que en este

estudio, este enfoque ha tenido éxito para la caracterización de una amplia variedad de materiales con diferente rigidez.

En cuanto a los resultados obtenidos (**figura 3.3.6** y **tabla 3.3.4**), se observa como la presencia de G y GO produce un aumento en el módulo elástico respecto del Ap, significativamente mayor en muestras de GO con Tb³⁺, en las que se observa un aumento del módulo elástico hasta 14 MPa para GO-Cit-Ap-Tb y más de 2 GPa para GO-Arg-Ap-Tb. Una de las causas probables para la mejora en las propiedades mecánicas de los composites es el llamado *fortalecimiento de grano fino*. La funcionalización de G y GO actúa como nucleante en la cristalización de Ap, lo que restringe el crecimiento del Ap. El menor tamaño de partícula, sumado, la aparición de microfisuras ramificadas, y el puenteo de fisuras por la nucleación del Ap, añaden una contribución positiva a las propiedades mecánicas del material. Resultados similares también sido reportados en otros estudios centrados en el desarrollo de nanocomposites de Ap.^{276,277}

Por lo tanto, nuestros resultados han demostrado que la formación de nanocomposites de Ap y G o GO aumenta la resistencia a la deformación elástica cuando se compara con el Ap, lo que contribuye a la resistencia final del material. Este efecto de refuerzo ha sido documentado por Prakash *et al.* a través de la fabricación de una película de quitosano que contiene GO/HAp/Au para su uso en ingeniería de tejidos óseos. Este enfoque permitió mejorar la resistencia a la tracción y compresión de las películas del composite. En odontología también se ha reportado cómo la adición de G puede mejorar las propiedades mecánicas, tribológicas y antibacterianas del silicato de calcio para la protección del complejo pulpo-dentinario. Estos compuestos no sólo aumentan la microdureza y la resistencia a la compresión, sino que también disminuyen el coeficiente de fricción. De este modo, los resultados obtenidos nos permiten explorar nuevos horizontes en el uso de nanocomposites de Ap y G/GO para aplicaciones en reparación ósea, en cementos dentales bioactivos, como material de refuerzo de materiales poliméricos en odontología, o como recubrimiento de implantes metálicos.

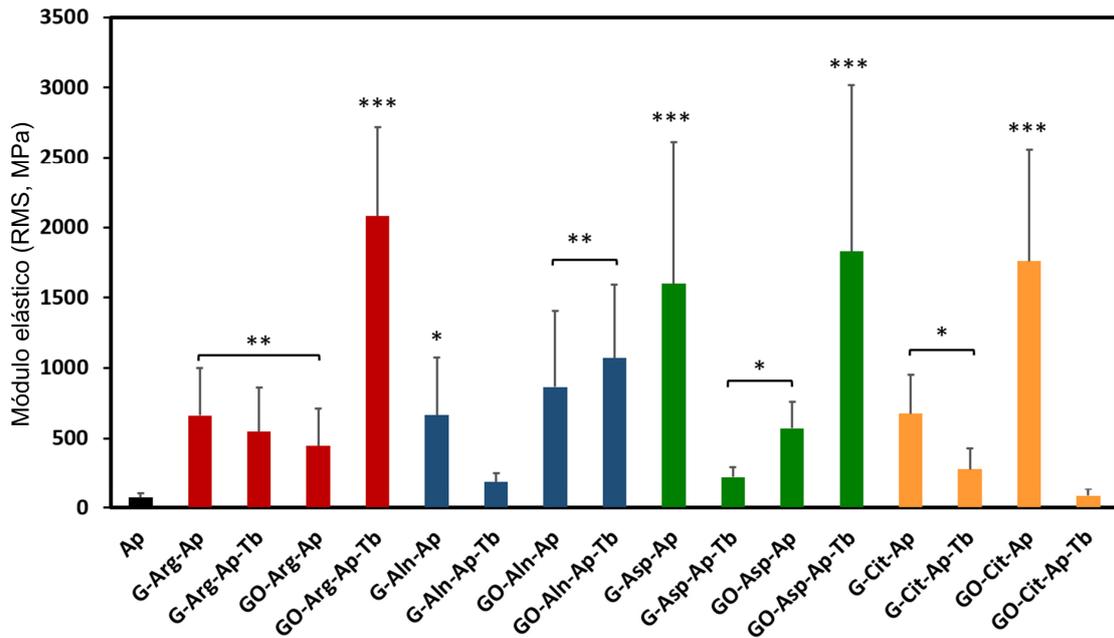


Figura 3.3.6. Valores de RMS del módulo elástico. Datos obtenidos aplicando una carga compresiva de 10 nN para generar curvas fuerza-distancia utilizando el modelo de Hertz para obtener medidas cuantitativas del módulo elástico. En cada muestra, la deformación se evaluó en 100 puntos de la superficie. Las diferencias estadísticamente significativas se calculan frente al Ap de la siguiente manera: (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.005$.

Tabla 3.3.4. Valores del módulo elástico de las muestras en la escala nanométrica, obtenidos mediante AFM.

Composite	Módulo elástico $\bar{X} \pm SD^*$ (MPa)	Composite	Módulo elástico $\bar{X} \pm SD^*$ (MPa)
Ap	30.2 \pm 6.5	Ap	30.2 \pm 6.5
G-Arg-Ap	138.9 \pm 65.04	GO-Arg-Ap	273.8 \pm 35.4
G-Arg-Ap-Tb	415.5 \pm 35.8	GO-Arg-Ap-Tb	494.9 \pm 96.5
G-Aln-Ap	479.9 \pm 46.2	GO-Aln-Ap	465.3 \pm 73.3
G-Aln-Ap-Tb	17.2 \pm 8.4	GO-Aln-Ap-Tb	3489 \pm 101.01
G-Asp-Ap	433.4 \pm 160	GO-Asp-Ap	48.1 \pm 5.74
G-Asp-Ap-Tb	204.4 \pm 94	GO-Asp-Ap-Tb	903.7 \pm 160
G-Cit-Ap	588.4 \pm 33.2	GO-Cit-Ap	298.1 \pm 17.46
G-Cit-Ap-Tb	135.3 \pm 24.5	GO-Cit-Ap-Tb	51.2 \pm 6.8

* $\bar{X} \pm SD$: Media y desviación estándar.

3.3.3.3. Propiedades luminiscentes de los nanocomposites

Las propiedades luminiscentes en estado sólido se muestran en **figura 3.3.7**. La **figura 3.3.7a** muestra los espectros de absorción y emisión, en los que se observan las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) a 350, 360 y 380 nm, y de emisión (λ_{em}) a 490, 545, 585, 620 y 650 nm.^{239,278} Los estudios previos con nAp dopadas con Tb^{3+} han demostrado que este elemento puede ser excitado en la banda que aparece a 230 nm, pero también se puede obtener el mismo espectro de emisión utilizando longitudes de ondas menos energéticas, lo que incrementa su aplicabilidad biológica, ya que permite observar las propiedades de luminiscencia de los composites a simple vista (**Figura 3.3.8**).²⁷⁹ Por este motivo, para los estudios de luminiscencia se ha seleccionado una longitud de onda de excitación de 375 nm (correspondiente a la transición $^7F_6 \rightarrow ^5G_6, ^5D_3$ del Tb^{3+}).

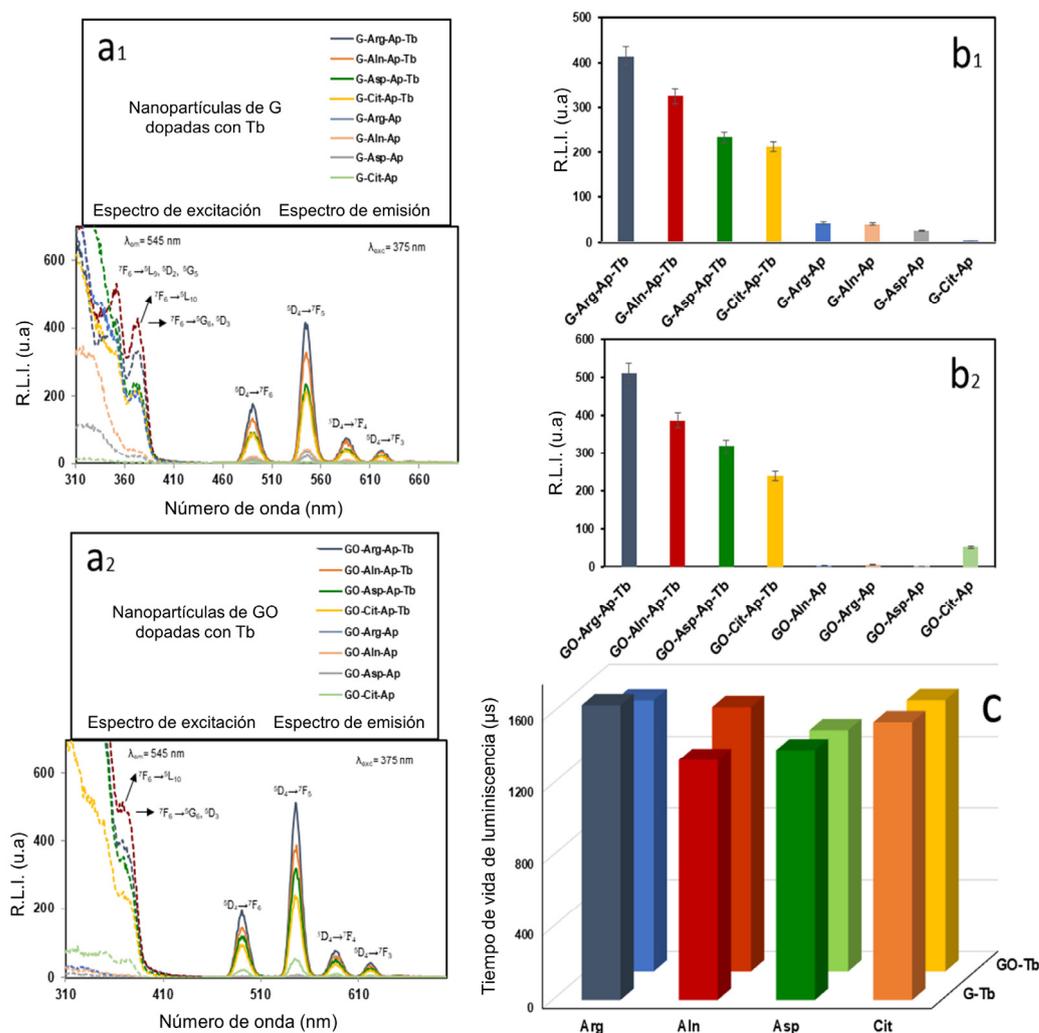


Figura 3.3.7. (a) Espectros de excitación (líneas discontinuas) y emisión (líneas sólidas) no corregidos de nanocomposites de Ap con 1) G-Tb y 2) GO-Tb. (b) R.L.I. de los nanocomposites de Ap con 1) G y 2) GO. $\lambda_{exc/em}=375/545$ nm, anchura de ranura de excitación/emisión = 10/10

nm, $t_d = 120 \mu s$, $t_g = 5 ms$, y voltaje del detector = 700 V. (c) Comparación del tiempo de vida de la luminiscencia entre los nanocomposites dopados con Tb^{3+} . $\lambda_{exc/em} = 375/545 nm$, anchura de ranura de excitación/emisión = 20/20 nm, y voltaje del detector = 800 V.

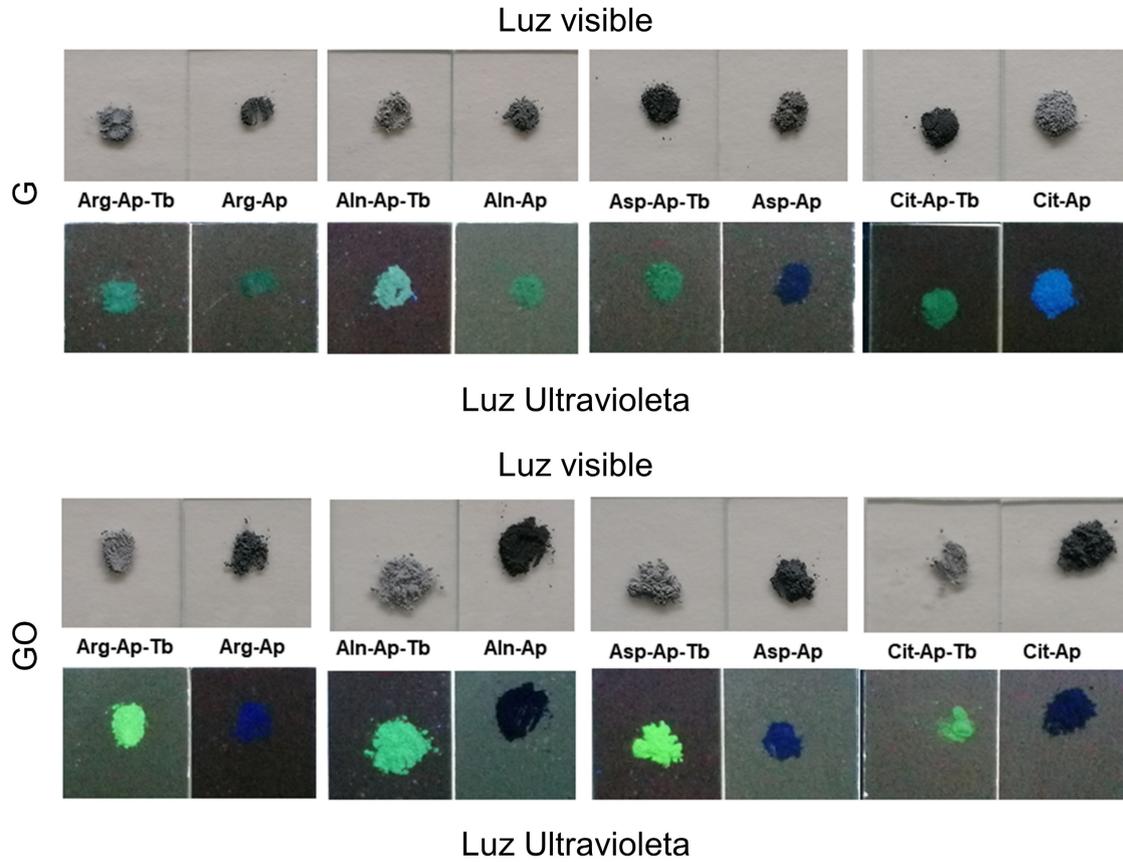


Figura 3.3.8. Imágenes de los nanocomposites expuestos a la luz natural y luz ultravioleta.

En la **figura 3.3.7b** también se puede observar la comparación de R.L.I. entre los composites de G (**b1**) y GO (**b2**). Se observa de forma clara, como aquellas muestras sin Tb^{3+} no presentan emisión luminiscente o es residual. Además, se observa una relación directamente proporcional entre el punto isoeléctrico del aminoácido presente en las muestras y la R.L.I. de forma que, las muestras con mayor emisión luminiscente son las que contienen Arg seguidas de Aln, Asp y Cit. Cuando comparamos entre materiales de refuerzo, las muestras de GO presentan valores de luminiscencia ligeramente superiores. Estos datos coinciden y corroboran los resultados obtenidos mediante EDX en los que se muestra un mayor contenido de Tb^{3+} en las muestras con Arg, y principalmente en la muestra GO-Arg-Ap-Tb.

El tiempo de vida de la luminiscencia se muestra en la **figura 3.3.7c**. Esta comparación muestra como los materiales que componen los composites, ya sea G, GO o los diferentes aminoácidos utilizados, no afectan significativamente al tiempo de vida de luminiscencia, ya que este se debe a la presencia de Tb^{3+} . Con estos resultados podemos concluir que los nanocompuestos G/Ap y GO/Ap funcionalizados con biomoléculas pueden ser dopados con Tb^{3+} para incorporar propiedades luminiscentes con el fin de aumentar sus potenciales aplicaciones.

3.3.3.4. Propiedades biológicas de los nanocomposites

La citocompatibilidad de los nanocomposites se estudió mediante ensayos MTT usando células madre mesenquimales murinas m17.ASC y tiempos de incubación de 3 días con diferentes dosis de nanocomposites que van desde 0.1 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos (**figura 3.3.9**) muestran una excelente biocompatibilidad para el Ap que es tomado como control en este estudio. En todos los casos la viabilidad celular para el Ap, independientemente de la concentración utilizada, es superior al 80%, siendo 70% el corte establecido en la ISO 10993–5:200970²²⁵ para considerar un material biocompatible.

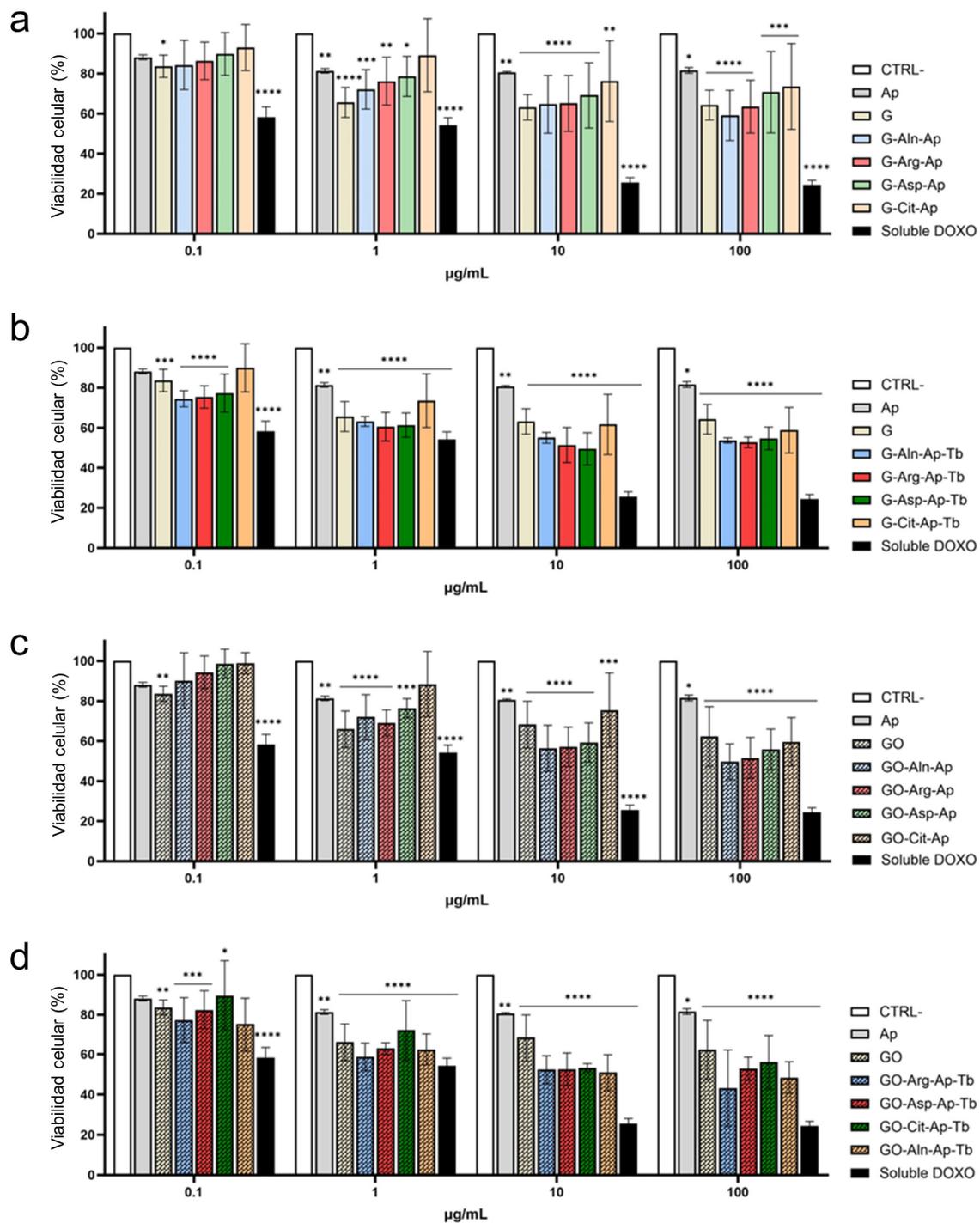


Figura 3.3.9. Viabilidad celular de células m17.ASC incubadas durante 3 días con nanocomposites de (a) G, (b) G-Tb, (c) GO y (d) GO-Tb. Los datos representan medias \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La estadística se calculó mediante ANOVA unidireccional con postest de comparación de Dunnett frente a CTRL-, mientras DOXO soluble se utilizó como control interno (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En el caso de los nanocomposites, sólo para las concentraciones inferiores, de 0.1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se obtiene una biocompatibilidad superior al 70% en todos los casos, mostrando un comportamiento similar al Ap. Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la citotoxicidad aumenta ligeramente, de forma que la viabilidad celular cae hasta el 60%. Cabe destacar que, las muestras funcionalizadas con Cit presentan la mejor biocompatibilidad comparada con el resto de aminoácidos, lo cual es ciertamente interesante debido al papel de esta molécula en el carácter biomimético del apatito. Por su parte, el dopaje con Tb^{3+} produce una disminución de la biocompatibilidad lo que indica que, a pesar de su amplio uso en biomedicina, su propensión a depositarse en células y tejidos, obliga a realizar estudios muy focalizados para evaluar el impacto de estos metales en líneas celulares sensibles como la m17.ASC.²⁸⁰

Por su parte, los nanocomposites que contienen GO disminuyen su biocompatibilidad respecto a los que contienen G. Este comportamiento se ha observado también en otros estudios que señalan que niveles elevados de GO pueden producir efectos inhibidores sobre la viabilidad celular.²⁸¹ En todos los casos y como era de esperar, la doxorubicina (DOXO) soluble, utilizado como control interno, ejerce su actividad bloqueando la proliferación celular.

En resumen, las láminas de G y GO funcionalizadas con biomoléculas han demostrado su efectividad como superficies heteronucleantes para la deposición de Ap, generando nanocomposites híbridos con propiedades mixtas aplicables en el campo de la ingeniería de tejidos y la odontología. La funcionalización con aminoácidos, y la incorporación de Tb^{3+} generan un impacto significativo en la rugosidad superficial, la fuerza de adhesión y las propiedades eléctricas del material resultante. Además, se ha observado una mejora sustancial en el módulo elástico, cuando se compara con el Ap.

La incorporación de iones Tb^{3+} al nanocomposite, no sólo afecta a las propiedades mecánicas del mismo, si no que permite incorporar propiedades luminiscentes, observables a simple vista, lo que permite ampliar la gama de aplicaciones de los materiales en el área de la bioimagen y el diagnóstico. El R.L.I. de las muestras es proporcional al contenido de Tb^{3+} de las mismas, que a su vez está determinado por los grupos funcionales y el punto isoelectrico de las biomoléculas que funcionalizan las láminas de G y GO, aumentando en el orden Arg > Aln > Asp > Cit. El tiempo de vida de luminiscencia, solo depende del contenido de Tb^{3+} , ya que ni las láminas, ni la incorporación de biomoléculas afectan significativamente al tiempo de vida de la luminiscencia.

Por último, los ensayos biológicos han demostrado la biocompatibilidad de las muestras cuando se incuban con células madre mesenquimales murinas a dosis bajas (0.1 $\mu\text{g/mL}$), mientras que dosis elevadas los nanocomposites han demostrado ejercer efectos inhibitorios sobre la viabilidad celular. La presencia de Tb^{3+} en las concentraciones que dopan los compuestos, también afecta la viabilidad celular en comparación con el compuesto no dopado correspondiente por lo que se necesita un control cuidadoso de la dosis del material y la respectiva concentración de Tb^{3+} para preservar la supervivencia celular mientras se maximiza su eficacia en las aplicaciones propuestas.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la **publicación N°2** de esta tesis doctoral “**Vapour diffusion sitting drop method to induce nucleation of calcium phosphate on exfoliated graphene and graphene oxide flakes**” (Crystals, 2021, 11(7), 767). Una segunda publicación está en fase de preparación.

3.3.4. Referencias

- (258) Pina, S.; Oliveira, J. M.; Reis, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Advanced Materials*. John Wiley & Sons, Ltd February 1, 2015, pp 1143–1169. <https://doi.org/10.1002/adma.201403354>.
- (259) Morgan, E. F.; Yetkinler, D. N.; Constantz, B. R.; Dauskardt, R. H. Mechanical Properties of Carbonated Apatite Bone Mineral Substitute: Strength, Fracture and Fatigue Behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1997, 8 (9), 559–570. <https://doi.org/10.1023/A:1018550831834>.
- (260) Hsissou, R.; Seghiri, R.; Benzekri, Z.; Hilali, M.; Rafik, M.; Elharfi, A. Polymer Composite Materials: A Comprehensive Review. *Compos. Struct.* 2021, 262, 113640. <https://doi.org/10.1016/J.COMPSTRUCT.2021.113640>.
- (261) Bai, H.; Li, C.; Shi, G. Functional Composite Materials Based on Chemically Converted Graphene. *Adv. Mater.* 2011, 23 (9), 1089–1115. <https://doi.org/10.1002/adma.201003753>.
- (262) Gómez-Morales, J.; González-Ramírez, L. A.; Verdugo-Escamilla, C.; Penas, R. F.; Oltolina, F.; Prat, M.; Falini, G. Induced Nucleation of Biomimetic Nanoapatites on Exfoliated Graphene Biomolecule Flakes by Vapor Diffusion in Microdroplets. *Crystals* 2019, 9 (7), 341. <https://doi.org/10.3390/cryst9070341>.
- (263) Gómez-Morales, J.; Verdugo-Escamilla, C.; Gavira, J. A. Bioinspired Calcium Phosphate Coated Mica Sheets by Vapor Diffusion and Its Effects on Lysozyme Assembly and Crystallization. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (9), 5150–5158. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00716>.
- (264) Torres-Mansilla, A.; Álvarez-Lloret, P.; Voltres-Martínez, A.; López-Ruiz, E.; Baldión, P. A.; Marchal, J. A.; Gómez-Morales, J. Apatite-Coated Outer Layer Eggshell Membrane: A Novel Osteoinductive Biohybrid Composite for Guided Bone/Tissue Regeneration. *Biomater. Adv.* 2023, 154, 213605. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213605>.
- (265) Ciesielski, A.; Samori, P. Graphene via Sonication Assisted Liquid-Phase Exfoliation. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry December 2, 2014, pp 381–398. <https://doi.org/10.1039/c3cs60217f>.
- (266) Gómez-Morales, J.; Delgado-López, J. M.; Iafisco, M.; Hernández-Hernández, A.; Prat, M. Amino Acidic Control of Calcium Phosphate Precipitation by Using the Vapor Diffusion Method in Microdroplets. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11 (11), 4802–4809. <https://doi.org/10.1021/cg2004547>.
- (267) Schneiders, W.; Reinstorf, A.; Pompe, W.; Grass, R.; Biewener, A.; Holch, M.; Zwipp, H.; Rammelt, S. Effect of Modification of Hydroxyapatite/Collagen Composites with Sodium Citrate, Phosphoserine, Phosphoserine/RGD-Peptide and Calcium Carbonate on Bone Remodelling. *Bone* 2007, 40 (4), 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.019>.
- (268) Gómez-Morales, J.; Fernández-Penas, R.; Acebedo-Martínez, F. J.; Romero-Castillo, I.; Verdugo-

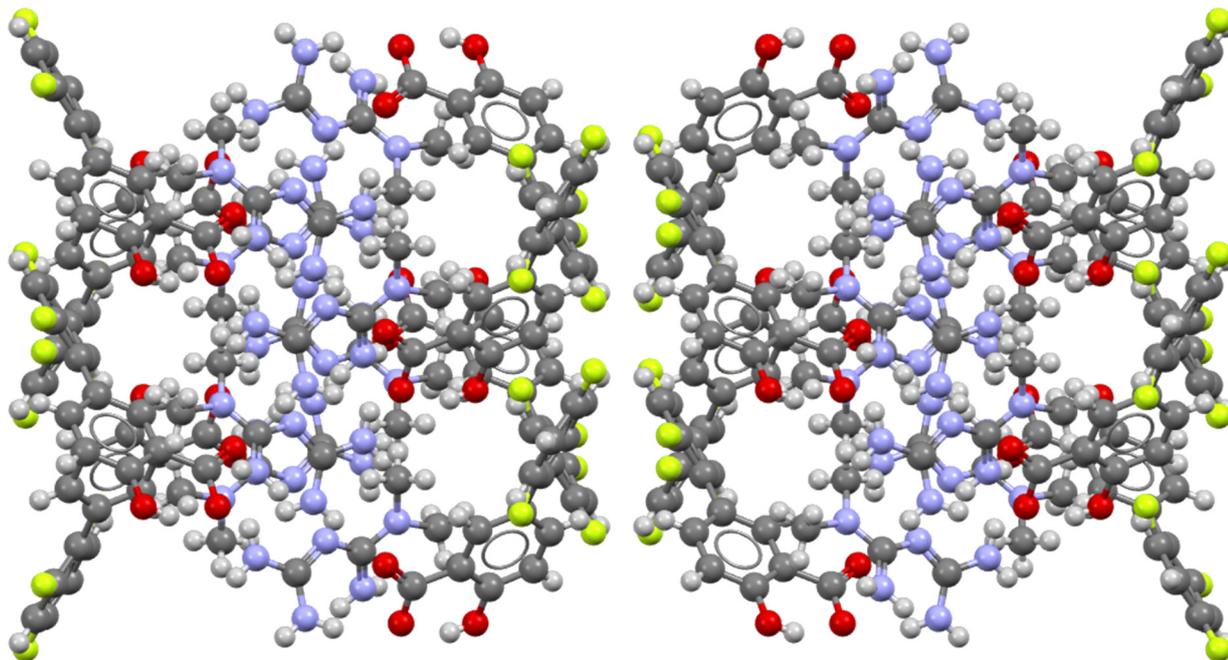
- Escamilla, C.; Choquesillo-Lazarte, D.; Esposti, L. D.; Jiménez-Martínez, Y.; Fernández-Sánchez, J. F.; Iafisco, M.; Boulaiz, H. Luminescent Citrate-Functionalized Terbium-Substituted Carbonated Apatite Nanomaterials: Structural Aspects, Sensitized Luminescence, Cytocompatibility, and Cell Uptake Imaging. *Nanomaterials* 2022, 12 (8), 1257. <https://doi.org/10.3390/nano12081257>.
- (269) Foley, B.; Greiner, M.; McGlynn, G.; Schmahl, W. W. Anatomical Variation of Human Bone Bioapatite Crystallography. *Crystals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute September 24, 2020, pp 1–25. <https://doi.org/10.3390/cryst10100859>.
- (270) Khairoun, I.; Boltong, M. G.; Driessens, F. C. M.; Planell, J. A. Effect of Calcium Carbonate on the Compliance of an Apatitic Calcium Phosphate Bone Cement. *Biomaterials* 1997, 18 (23), 1535–1539. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)80005-1).
- (271) Tsortos, A.; Nancollas, G. H. The Adsorption of Polyelectrolytes on Hydroxyapatite Crystals. *J. Colloid Interface Sci.* 1999, 209 (1), 109–115. <https://doi.org/10.1006/JCIS.1998.5881>.
- (272) Koutsopoulos, S.; Dalas, E. Hydroxyapatite Crystallization in the Presence of Serine, Tyrosine and Hydroxyproline Amino Acids with Polar Side Groups. *J. Cryst. Growth* 2000, 216 (1), 443–449. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(00\)00415-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(00)00415-2).
- (273) Gonzalez-McQuire, R.; Chane-Ching, J. Y.; Vignaud, E.; Lebugle, A.; Mann, S. Synthesis and Characterization of Amino Acid-Functionalized Hydroxyapatite Nanorods. *J. Mater. Chem.* 2004, 14 (14), 2277–2281. <https://doi.org/10.1039/B400317A>.
- (274) Sur, U. K.; Saha, A.; Datta, A.; Ankamwar, B.; Surti, F.; Roy, S. D.; Roy, D. Synthesis and Characterization of Stable Aqueous Dispersions of Graphene. *Bull. Mater. Sci.* 2016, 39 (1), 159–165. <https://doi.org/10.1007/S12034-015-0893-0/TABLES/1>.
- (275) Szabo, T.; Maroni, P.; Szilagyi, I. Size-Dependent Aggregation of Graphene Oxide. *Carbon N. Y.* 2020, 160, 145–155. <https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2020.01.022>.
- (276) Liu, Y.; Huang, J.; Niinomi, M.; Li, H. Inhibited Grain Growth in Hydroxyapatite–Graphene Nanocomposites during High Temperature Treatment and Their Enhanced Mechanical Properties. *Ceram. Int.* 2016, 42 (9), 11248–11255. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2016.04.038>.
- (277) Liu, Y.; Huang, J.; Li, H. Synthesis of Hydroxyapatite–Reduced Graphite Oxide Nanocomposites for Biomedical Applications: Oriented Nucleation and Epitaxial Growth of Hydroxyapatite. *J. Mater. Chem. B* 2013, 1 (13), 1826–1834. <https://doi.org/10.1039/C3TB00531C>.
- (278) Hemmilä, I.; Dakubu, S.; Mikkala, V. M.; Siitari, H.; Lövgren, T. Europium as a Label in Time-Resolved Immunofluorometric Assays. *Anal. Biochem.* 1984, 137 (2), 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2).
- (279) Plá, S. M. C.; D'urso, A.; Fernández-Sánchez, J. F.; Colangelo, D.; Choquesillo-Lazarte, D.; Ferracini, R.; Bosetti, M.; Prat, M.; Gómez-Morales, J. Biomimetic Citrate-Coated Luminescent Apatite Nanoplatforms for Diclofenac Delivery in Inflammatory Environments. *Nanomaterials*

2022, 12 (3), 562. <https://doi.org/10.3390/nano12030562>.

- (280) Liu, Z.; Yu, Y.; Kang, W.; Chen, F.; Yan, F.; Ma, B.; Ge, S. Self-Assembled Terbium-Amino Acid Nanoparticles as a Model for Terbium Biosafety and Bone Repair Ability Assessment. *Compos. Part B Eng.* 2022, 244, 110186. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2022.110186>.

CAPÍTULO 4

MATERIALES MULTICOMPONENTE DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS



4.1. Estudio de la influencia del sintón en la formación de cocristales farmacéuticos de etenzamida

4.1.1. Introducción

La etenzamida (ETZ) es un medicamento de la familia de los AINEs que ha demostrado tener propiedades analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias y antirreumáticas. Este fármaco suele utilizarse en combinación con otros AINEs, para el tratamiento de la inflamación y los dolores agudos.²⁸²⁻²⁸⁴ A pesar de su amplio uso en el entorno clínico, su mecanismo de acción detallado aún sigue siendo desconocido. ETZ pertenece a la clase II del SCB de medicamentos, presentando una solubilidad acuosa muy limitada (0.034 mg/mL^{-1}) lo que compromete gravemente su biodisponibilidad oral.¹³¹ Sin embargo, la presencia de grupos funcionales con tendencia a formar enlaces de hidrógeno, permiten que la molécula de ETZ sea un buen candidato para la aplicación de estrategias de ingeniería cristalina y la obtención de nuevos cocristales de ETZ que permitan solventar los problemas descritos.

En este capítulo, además de mejorar la solubilidad de ETZ, se busca introducir una nueva ventaja en el cocrystal con respecto al API. Los AINEs como ETZ, presentan propiedades antioxidantes que eliminan radicales libres en el organismo. Sin embargo, cuando el AINE se involucra en estos procesos, su efecto antiinflamatorio suele reducirse.²⁸⁵ Por lo tanto, la formulación de cocristales de ETZ con moléculas antioxidantes puede ayudar a focalizar su actividad en los procesos antiinflamatorios, mejorando su eficacia.²⁸⁶ En este contexto, los polifenoles son moléculas con excelentes propiedades antioxidantes, que presentan un perfil de seguridad sólido, siendo ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria.²⁸⁷⁻²⁸⁹ Esto, sumado al versátil comportamiento de los grupos hidroxilo presentes en los polifenoles permiten su uso en la construcción de redes supramoleculares, lo que se traduce en la formación de MMFs.²⁹⁰⁻²⁹³

Así pues, los objetivos de este capítulo se centran en la síntesis y caracterización de nuevos cocristales farmacéuticos de ETZ con polifenoles isoméricos. Se pretende evaluar cómo la posición relativa de los grupos -OH en los coformadores afecta la arquitectura cristalina del material, estableciendo relaciones estructura-propiedad. Para lograr este propósito, se ha llevado a cabo un profundo estudio cristalográfico, teórico y de caracterización de los cocristales, que incluye su estudio en estado sólido, el análisis energético de las interacciones intermoleculares y el estudio de sus propiedades farmacocinéticas, en términos de estabilidad y solubilidad.

4.1.2. Síntesis de cocrystalos farmacéuticos de ETZ

4.1.2.1 Diseño teórico de los cocrystalos de ETZ

Antes de comenzar con la síntesis de los cocrystalos de ETZ, se han de seleccionar los coformadores que tengan mayor predisposición para interactuar con el API. En la estructura cristalina de la ETZ pura, se puede observar una fuerte interacción por puentes de hidrógeno entre grupos amida-amida (homosintón $R_2^2(8)$) que genera dímeros de ETZ:ETZ (**Figura 4.1.1 (I)**).^{294,295} También existen polimorfos de ETZ que no se disponen formando dímeros, sino cadenas infinitas de ETZ unidas por homosintones $C_1^1(4)$ (**Figura 4.1.1 (II)**).²⁹⁶ En todas las estructuras reportadas de ETZ los grupos amida presentan un papel crítico en la formación de la estructura cristalina, por lo que se deduce que la interacción con una molécula coformadora, se dará mediante interacciones no covalentes implicando dichos grupos.

Una estrategia que nos permite estudiar las moléculas con mayor afinidad para interactuar con ETZ, consiste en realizar una búsqueda bibliográfica que recoja los MMFs obtenidos hasta la fecha. Para este fin, se utilizó la Base de Datos Estructural de Cambridge (CSD versión 5.43, actualización 4 de noviembre de 2022).²⁹⁷ Esta búsqueda reporta diferentes MMFs incluyendo cocrystalos^{131,294,305,296,298-304} y solvatos.³⁰⁶⁻³¹⁰ Entre éstos, se observó un gran número de estructuras cristalinas caracterizadas por la presencia de heterosintones supramoleculares que siguen el siguiente orden: amida-carboxílico (51%) > amida-amida (20%) > amida-hidroxilo (fenol) (10%) > amida-carbonilo (6%).

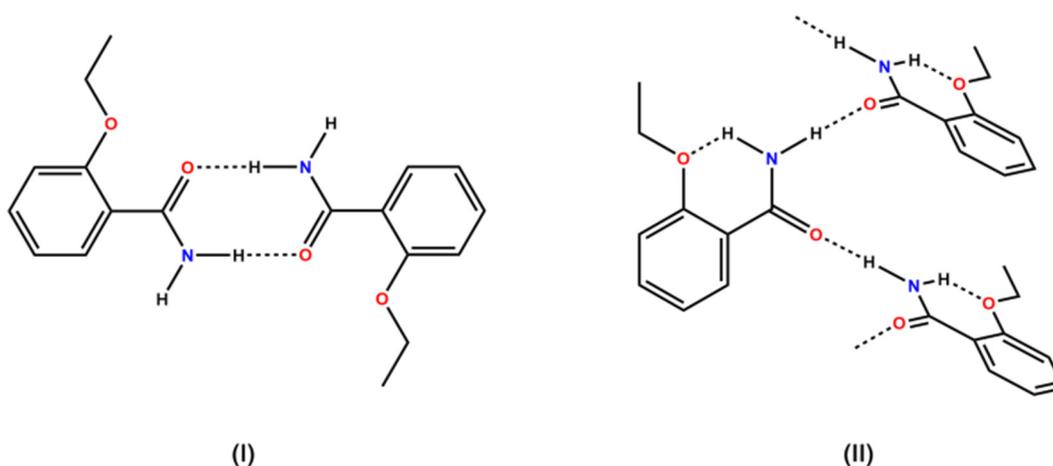


Figura 4.1.1. Asociación supramolecular entre moléculas de ETZ. (I) dímeros de ETZ, (II) asociación en cadenas infinitas de moléculas de ETZ.

Así pues, el uso de moléculas polifenólicas como cofomadores en este estudio está en concordancia con los resultados reportados en la bibliografía. Adicionalmente, el software COSMOQuick ha sido utilizado para estimar la tendencia de formación de cocrystal basada en cálculos termodinámicos. Esta herramienta calcula el exceso de entalpía de formación (H_{ex}) entre ETZ y el cofomador correspondiente, en relación con los componentes puros en una fase líquida sobreenfriada.^{311,312} Se estudió una lista de candidatos para la formación de MMF de ETZ, incluyendo nuestras moléculas polifenólicas y otras moléculas cofomadoras. Los compuestos con valores negativos de H_{ex} tienen una probabilidad mayor de formar cocrystal ya que es una aproximación de la energía libre de formación de cocrystal, $\Delta G_{cocrystal}$. La **Figura 4.1.2.** presenta el valor H_{ex} de los cofomadores reportados en la bibliografía, incluyendo los polifenoles utilizados en el estudio, catecol (CAT), resorcinol (RES), hidroquinona (HQ) y fluoroglucinol (PHL).

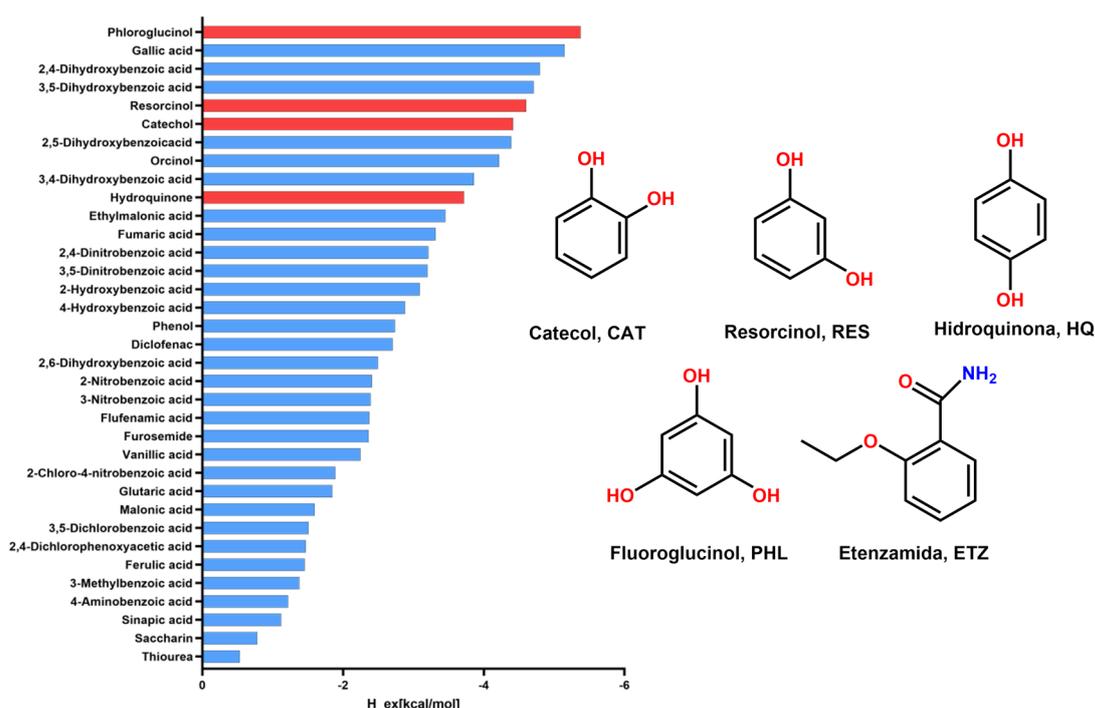


Figura 4.1.2. Valor H_{ex} de los cofomadores obtenido mediante el programa COSMOQuick. Diagrama de los polifenoles isoméricos utilizados para la obtención de cocrystal de ETZ.

4.1.2.2. Síntesis mecanoquímica en estado sólido

La síntesis mecanoquímica de los cocristales se realizó mediante LAG en un molino de bolas Retsch MM2000, con una frecuencia de trabajo de 25 Hz. Los reactivos se introdujeron en jarras de acero inoxidable junto a dos bolas de 7 mm de diámetro, también de acero inoxidable. Todas las operaciones de molienda se realizaron a temperatura ambiente, durante 10 minutos, excepto en el caso del cocrystal ETZ–PHL cuya síntesis tomó 20 minutos. Todas las operaciones se han repetido en varias ocasiones para asegurar la reproducibilidad de la reacción. A su vez, todos los productos obtenidos, se han analizado mediante PXRD y FTIR para determinar la formación de un nuevo MMF.

- ETZ–CAT se obtuvo mediante LAG de una mezcla de ETZ (1 mmol, 165.18 mg) y CAT (0.5 mmol, 55.05 mg), en una relación estequiométrica de 2:1, utilizando 100 μ L de hexano como aditivo líquido.
- ETZ–RES y ETZ–HQ se obtuvieron mediante LAG de una mezcla de ETZ (1 mmol, 165.18 mg) y el respectivo coformador (0.5 mmol, 55.05 mg), en una relación estequiométrica de 2:1, utilizando 100 μ L de etanol como aditivo líquido.
- ETZ–PHL se obtuvo mediante LAG de una mezcla de ETZ (1 mmol, 165.18 mg) y PHL (0.5 mmol, 63.076 mg), en una relación estequiométrica de 2:1, utilizando 100 μ L de acetonitrilo como aditivo líquido.

4.1.2.3. Síntesis en solución

La obtención de cristales de los nuevos cocristales permiten el estudio de la estructura cristalina mediante SCXRD. Los cristales de las fases se obtuvieron mediante evaporación lenta de soluciones saturadas del producto obtenido del LAG, utilizando etanol para preparar las soluciones de ETZ–CAT, ETZ–RES y ETZ–HQ, y acetonitrilo para ETZ–PHL. La evaporación se realizó a temperatura ambiente y los cristales se separaron de las soluciones a los 2 días.

4.1.3. Resultados y discusión

4.1.3.1. Evaluación de la formación de cocristales de ETZ

Durante la primera etapa del estudio, es decir, durante la selección de los coformadores, se han llevado a cabo reacciones de molienda en seco de mezclas de ETZ con los respectivos coformadores usando relaciones estequiométricas de 1:1, 1:2 y 2:1 (**Figura 4.1.3**). Sin embargo, estos ensayos han resultado en la formación de mezclas físicas. Sólo la estequiometría 2:1 resulta en la formación de nuevos materiales, pero con una cristalinidad y rendimientos relativamente bajos.

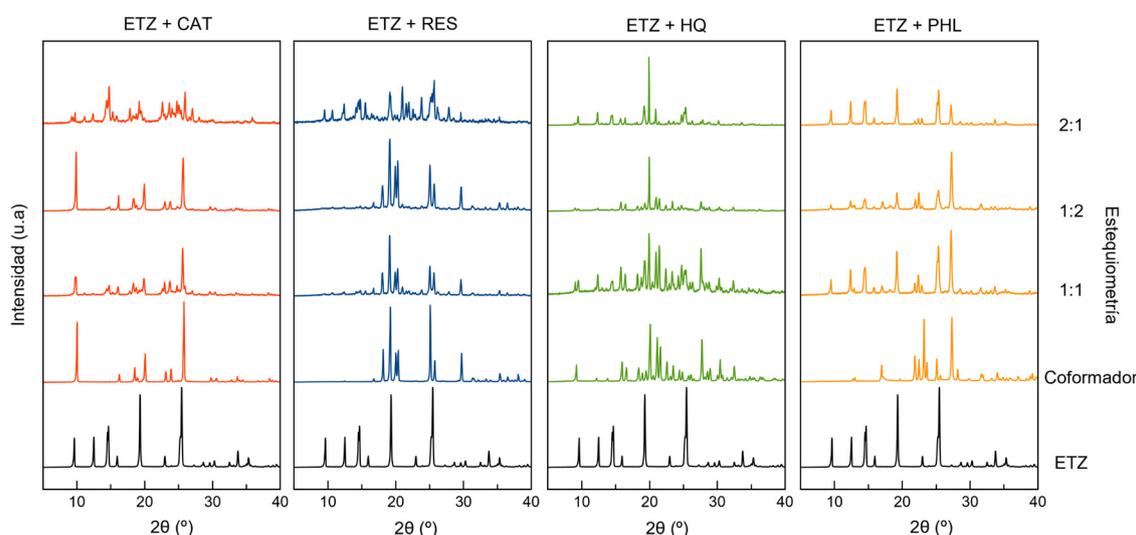


Figura 4.1.3. Difractogramas de PXRD de los productos obtenidos mediante NG en estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1.

Como ya se ha mencionado en la introducción, un paso adicional que permite inducir la formación de cocristales con un mayor rendimiento, es la utilización de aditivos líquidos. Se han realizado experimentos de LAG, también en diferentes estequiometrías, para descartar la formación de MMFs con diferentes estequiometrías. Una comparación de los patrones de PXRD de los productos obtenidos por LAG con los de los componentes de la reacción (**Figura 4.1.4**), demuestra la formación de los cuatro MMFs observados inicialmente en la molienda en seco. En el LAG, para un mismo coformador, en todas las estequiometrías aparece la misma fase, sin embargo, en todas ellas, a excepción de la 2:1, aparecen reflexiones de los componentes, indicando un exceso, y por lo tanto, una estequiometría de partida incorrecta. En la estequiometría 2:1, no se observan reflexiones

de los componentes y se presupone una nueva fase pura, por lo que será utilizada para los procesos de caracterización y obtención de cristales en solución.

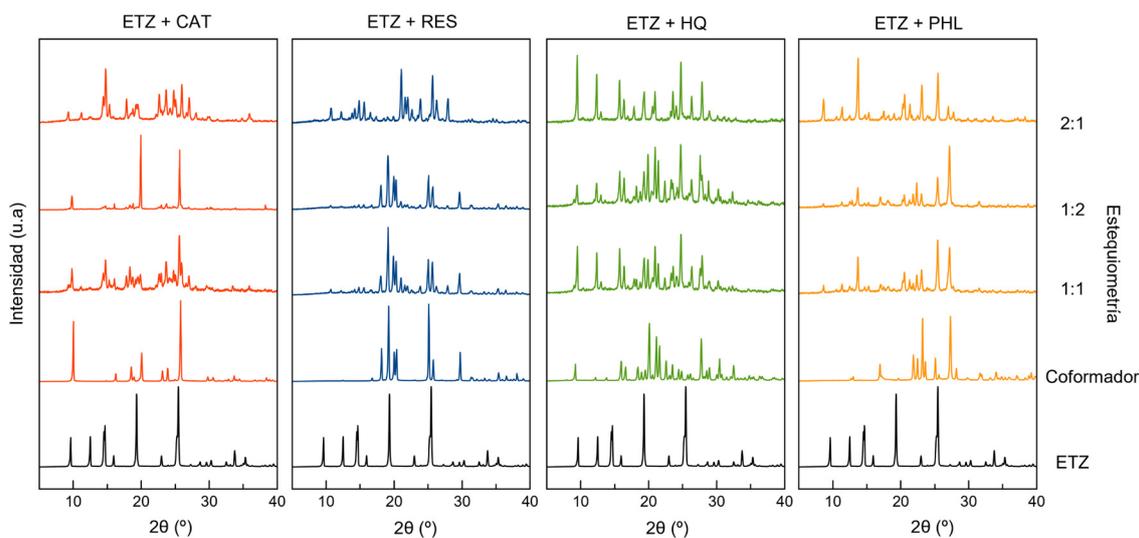


Figura 4.1.3. Difractogramas de PXRD de los productos obtenidos mediante LAG.

Una vez obtenidas nuevas fases sólidas, cristalinas y puras (presuntamente), se debe evaluar qué tipo de MMF se ha formado, ya sea un cocrystal, una sal, solvatos o incluso polimorfos de los componentes. La espectroscopía FTIR se utilizó como técnica complementaria para evaluar la presencia de interacciones entre los grupos funcionales de las moléculas utilizadas en la síntesis, lo que permite estimar qué tipo de material se ha formado. En esta técnica, el desplazamiento y el cambio de las intensidades de las señales correspondiente a los grupos funcionales en comparación con los componentes, permite estudiar el tipo de interacciones que se están presentando.³¹³ La **Figura 4.1.5** muestra los espectros FTIR de ETZ y los sólidos obtenidos del LAG en una estequiometría 2:1. Las bandas más representativas de ETZ involucradas en la formación de MMFs se encuentran en 1626 cm^{-1} correspondiente a las tensiones del grupo carbonilo (C=O) y las bandas en 3165 y 3366 cm^{-1} , atribuidas a las tensiones simétricas y asimétricas del grupo N-H. Los desplazamientos observados en estas bandas confirman la participación de estos grupos en interacciones intermoleculares indicando a su vez la formación de cocrystal, en buen acuerdo con los resultados estructurales que se presentan a continuación.

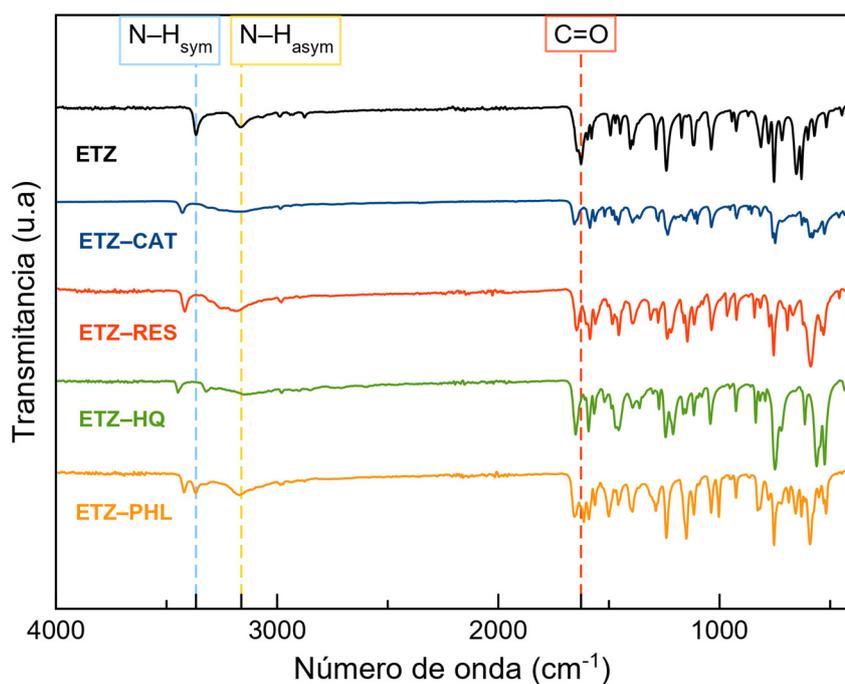


Figura 4.1.5. Espectro FTIR de los cocristales de ETZ obtenidos.

4.1.3.2. Análisis estructural de los cocristales obtenidos con ETZ

Los resultados obtenidos hasta el momento, deben confirmarse mediante el análisis y el estudio de la estructura cristalina de las nuevas fases. La evaporación de soluciones saturadas durante dos días a temperatura ambiente, ha permitido obtener cristales de buena calidad para su análisis mediante SCXRD. Los datos cristalográficos obtenidos para los cocristales de ETZ se recogen en la **tabla 4.1.1**, mientras que la información sobre los enlaces de hidrógeno se recogen en la **tabla 4.1.2**. Estas tablas se presentan al final de la sección de análisis estructural.

La determinación estructural también permite confirmar la pureza del producto obtenido mediante las reacciones LAG, debido a la buena concordancia entre el patrón de PXRD del producto de LAG y el patrón de PXRD calculado a partir de la estructura cristalina, como se muestra en la **Figura 4.1.6**.

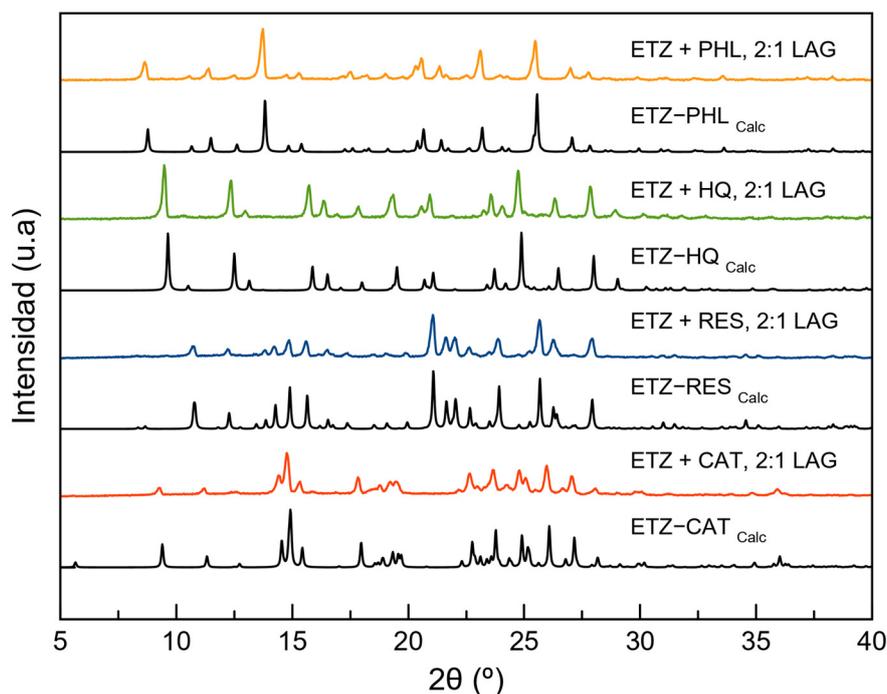


Figura 4.1.6. Difractogramas de PXRD de las fases obtenidas del LAG en estequiometría 2:1 y difractogramas calculados a partir de las estructuras cristalinas de cada cocrystal.

4.1.3.2.1. ETZ–CAT

ETZ–CAT cristaliza en el grupo espacial triclinico P-1 con dos moléculas de ETZ (ETZ1 y ETZ2) y una molécula de CAT (en conformación *anti-anti*) en la unidad asimétrica, dando como resultado un cocrystal con una relación estequiométrica de 2:1 (**Figura 4.1.7a**), donde CAT une dos moléculas de ETZ a través de puentes de hidrógeno, formando el heterosintón fenol-amida (O–H···O). Las moléculas de ETZ por su parte interactúan mediante enlaces de hidrógeno, formando un homosintón amida:amida $R_2^2(8)$, que da lugar a dímeros compactos de ETZ:ETZ, similar a lo observado en la estructura original del API.^{294,295} La asociación de CAT con dímeros de ETZ genera una estructura en forma de cinta, que se ve reforzada por interacciones C–H··· π entre el grupo metilo terminal de ETZ2 y el anillo aromático de CAT (**Figura 4.1.7b**). La estructura supramolecular del cristal resulta de las interacciones no covalentes que involucran las moléculas de ETZ1 y ETZ2 (**Figura 4.1.7c,d**). Por un lado, los pares de moléculas de ETZ1 forman un dímero centrosimétrico mediante interacciones de apilamiento π ··· π , que están además conectadas por interacciones C=O··· π , generando una columna infinita. Las moléculas de ETZ2, por su parte, generan una columna centrosimétrica a través de

interacciones C-H $\cdots\pi$. Por lo tanto, la estructura 3D se obtiene conectando estas columnas mediante enlaces de hidrógeno e interacciones C-H \cdots O con moléculas de CAT.

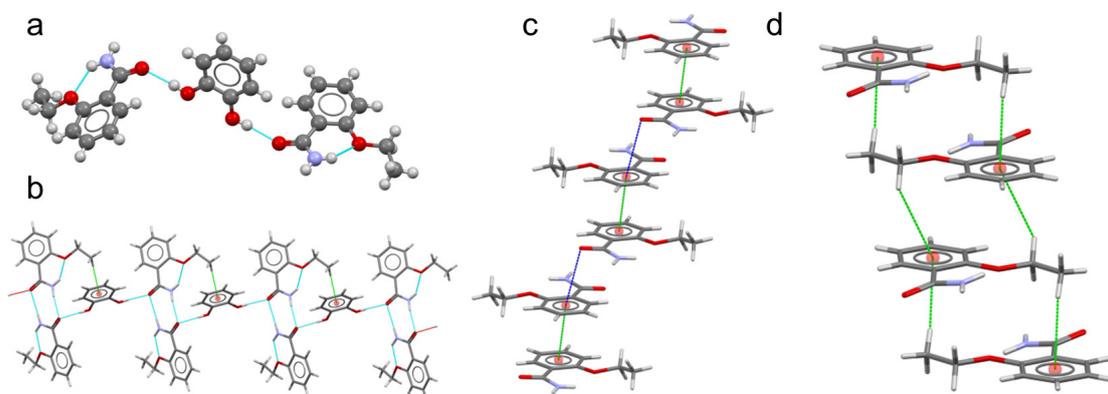


Figura 4.1.7. (a) Unidad asimétrica en el cocrystal ETZ–CAT. (b) Fragmento de la estructura en forma de cinta en ETZ–CAT. (c) Detalles de las interacciones de apilamiento $\pi\cdots\pi$ entre las moléculas de ETZ1. (d) Detalles de las interacciones C-H $\cdots\pi$ entre las moléculas de ETZ2.

4.1.3.2.2. ETZ–RES

La estructura cristalina de ETZ–RES presenta un grupo espacial monoclinico P21/c. Al igual que en el caso anterior, la unidad asimétrica consiste en dos moléculas de ETZ (ETZ1 y ETZ2) y una molécula de RES (**Figura 4.1.8a**). Los grupos hidroxilo de la molécula de RES adoptan una conformación *sin-anti* y conectan las moléculas de ETZ a través de heterosintones fenol:amida $D_1^1(2)$. Al igual que en ETZ–CAT, esta estructura también presenta dímeros de ETZ:ETZ conectados por enlaces de hidrógeno amida:amida $R_2^2(8)$. Los dímeros se conectan por moléculas de RES, generando estructuras en cadena que se extienden a lo largo de los ejes 2_1 de la cadena (**Figura 4.1.8b**). Interacciones de apilamiento $\pi\cdots\pi$ entre los anillos aromáticos de las moléculas de ETZ1 y ETZ2 de diferentes cadenas generan una estructura de capas intercaladas que se extiende paralela al plano *bc* (**Figura 4.1.8c**). Por último, estas capas se asocian mediante interacciones C-H \cdots O generando la estructura 3D del cocrystal.

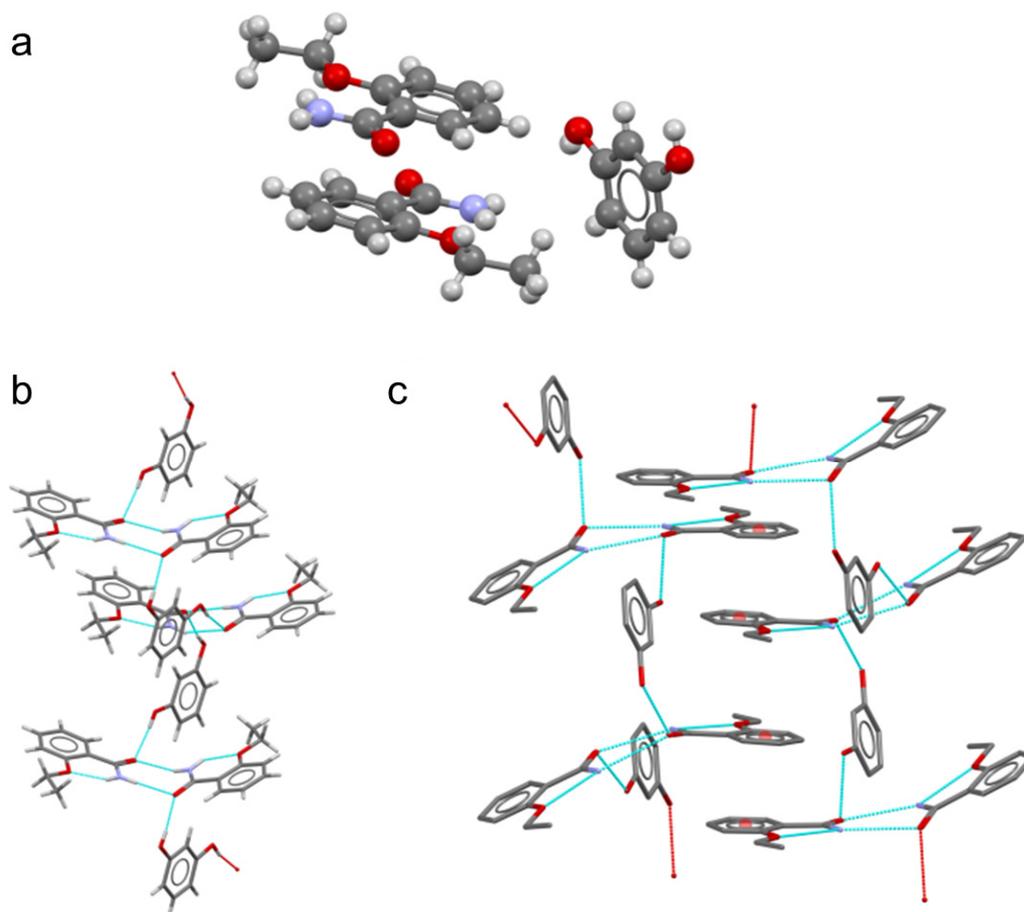


Figura 4.1.8. (a) Unidad asimétrica en el cocrystal ETZ–RES. (b) Estructura en cadena en ETZ–RES. (c) Fragmento de la estructura en capas 2D generada por interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$.

4.1.3.2.3. ETZ–HQ

ETZ–HQ cristaliza en el grupo espacial triclinico P-1. La unidad asimétrica consiste en una molécula de ETZ y la mitad de una molécula de HQ ubicada en un centro de inversión, lo que conduce a una relación estequiométrica de 2:1, donde cada molécula de HQ conecta dos moléculas de ETZ a través de heterosintones fenol-amida $D_1^1(2)$. (**Figura 4.1.9a**). Cada unidad ETZ:HQ:ETZ está además conectada por un enlace de hidrógeno N-H(amida) \cdots O(fenol) a otras unidades, lo que resulta en una estructura de cinta que se extiende a lo largo del eje c (**Figura 4.1.9b**). En la estructura del cocrystal, el dímero homosintón amida:amida $R_2^2(8)$ que se da en la estructura nativa de ETZ y en los cocristales anteriores, se interrumpe por la inserción de moléculas de HQ. Las estructuras de cinta se conectan por interacciones C-H \cdots O y amida $\cdots\pi$, generando una estructura de capas 2D que se extiende paralela al plano *bc*. Estas capas se mantienen apiladas a lo

largo del eje a , mediante interacciones apilamiento, lo que resulta en el empaquetamiento cristalino 3D.

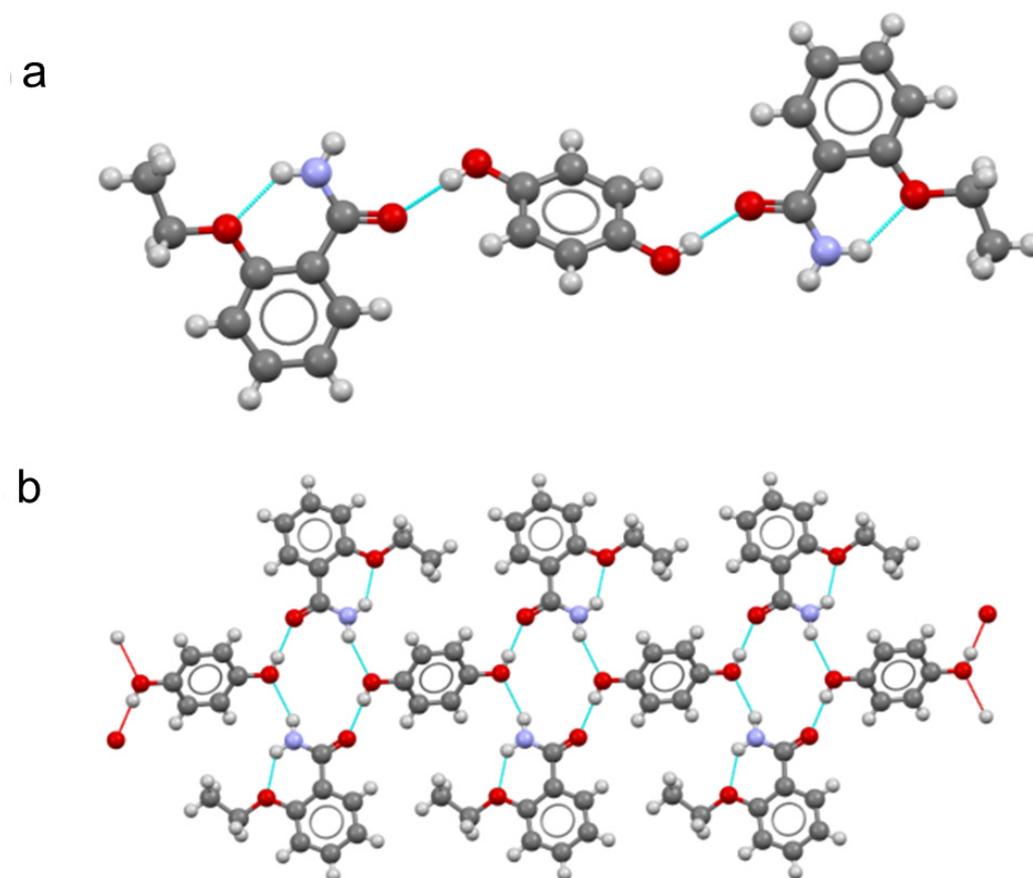


Figura 4.1.9. (a) Unidad asimétrica en el cocrystal ETZ–HQ. (b) Fragmento de la estructura en forma de cinta construida por interacciones de enlace de hidrógeno.

4.1.3.2.4. ETZ–PHL

Por último, el cocrystal ETZ–PHL cristaliza en el sistema monoclinico con grupo espacial Pn. La unidad asimétrica está formada por 2 moléculas de ETZ y una molécula de PHL dando una estequiometría 2:1 (**Figura 4.1.10a**). Al igual que en el caso de los cocrystalos con CAT y RES, se observa un dímero ETZ:ETZ conectados por el homosintón amida:amida $R_2^2(8)$. Las moléculas de PHL conectan estos dímeros a través de dos de sus grupos -OH (posiciones 1 y 3), similar a RES en posición *sin-anti*, generando una estructura de cinta (**Figura 4.1.10b**). El tercer -OH del PHL se utiliza para conectar las moléculas de PHL adyacentes mediante interacciones de enlace de hidrógeno -OH \cdots O, dando como resultado una estructura de tipo rejilla 2D, como se ilustra en la **figura 4.1.10c**. Estas estructuras se asocian mediante interacciones de apilamiento $\pi\cdots\pi$

que implican dos moléculas de ETZ independientes para construir una estructura 3D intercalada y reforzada por enlaces de hidrógeno N-H...O.

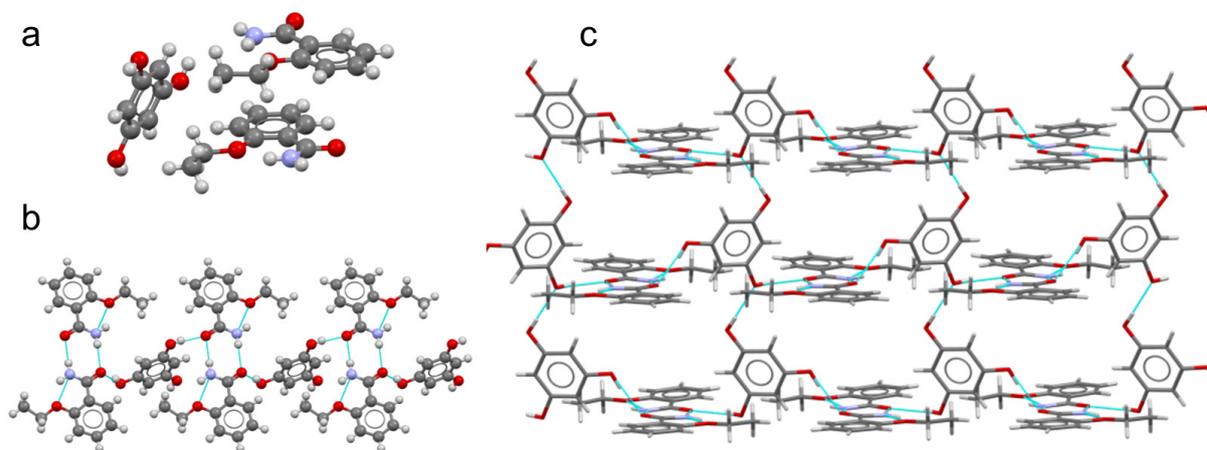


Figura 4.1.10. (a) Unidad asimétrica en el cocrystal ETZ–PHL. (b) Vista detallada de la estructura en forma de cinta en ETZ–PHL. (c) Fragmento de la estructura de tipo rejilla 2D en el cocrystal ETZ–PHL.

Tabla 4.1.1. Datos cristalográficos y detalles del refinamiento de las estructuras de los cocrystal de ETZ.

Compuesto	ETZ–CAT	ETZ–RES	ETZ–HQ	ETZ–PHL
Fórmula	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆	C ₁₂ H ₁₄ NO ₃	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₇
Peso molecular	440.48	440.48	220.24	456.48
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P21/c	P-1	Pn
a/Å	7.7814(12)	10.2189(6)	7.2548(5)	9.9310(7)
b/Å	10.0144(12)	13.8655(10)	9.0844(6)	10.0681(6)
c/Å	15.979(2)	16.3778(10)	9.5457(5)	12.1027(8)
α/°	87.193(7)	90	99.864(3)	90
β/°	77.808(7)	93.473(3)	99.082(3)	99.780(4)
γ/°	69.864(7)	90	107.888(3)	90
V/Å³	1142.3(3)	2316.3(3)	574.80(6)	1192.52(14)
Z	2	4	2	2
Dc/g cm⁻³	1.281	1.263	1.273	1.271
F(000)	468	936	234	484
Reflexiones tomadas	12456	31842	9342	16420
Reflexiones únicas	3966 [R(int) = 0.0261]	4058 [R(int) = 0.0538]	1958 [R(int) = 0.0641]	3793 [R(int) = 0.0556]
Datos / restricciones / parámetros	3966 / 0 / 293	4058 / 0 / 294	1958 / 0 / 148	3793 / 2 / 304
Goodness-of-fit on F²	1.043	1.065	1.065	1.040
R₁ (I > 2σ(I))	0.0593, 0.1876	0.0395, 0.1139	0.0443, 0.1235	0.0404, 0.1043
wR₂ (I > 2σ(I))	0.0686, 0.1971	0.0447, 0.1208	0.0465, 0.1264	0.0472, 0.1108

Tabla 4.3.3. Enlaces de hidrógeno presentes en los cocristales de ETZ.

ETZ-CAT	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
	N(1)-H(1A)···O(3) ^{#1}	0.86	2.23	3.084(3)	171.3
	N(1)-H(1B)···O(2)	0.86	1.99	2.649(3)	133.2
	N(2)-H(2A)···O(1) ^{#2}	0.86	2.03	2.879(3)	168.1
	N(2)-H(2B)···O(4)	0.86	1.98	2.622(3)	131.0
	O(5)-H(5A)···O(3)	0.82	1.90	2.715(2)	172.1
	O(6)-H(6A)···O(1)	0.82	1.87	2.687(2)	173.0
	Operaciones de simetría: #1 x-1,y+1,z #2 x+1,y-1,z				
ETZ-RES	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
	N(1)-H(1A)···O(3) ^{#1}	0.86	2.12	2.9807(15)	176.5
	N(1)-H(1B)···O(2)	0.86	1.97	2.6369(14)	134.0
	N(2)-H(2A)···O(1) ^{#2}	0.86	2.17	2.9603(16)	152.8
	N(2)-H(2B)···O(4)	0.86	1.97	2.6418(14)	134.0
	O(5)-H(5A)···O(1) ^{#2}	0.82	1.89	2.6886(15)	165.9
	O(6)-H(6A)···O(3) ^{#3}	0.82	1.94	2.7550(14)	171.8
	Operaciones de simetría: #1 x,-y+3/2,z-1/2 #2 x,-y+3/2,z+1/2 #3 -x+2,y-1/2,-z+3/2				
ETZ-HQ	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
	N(1)-H(1A)···O(3) ^{#1}	0.86	2.18	2.9861(15)	156.2
	N(1)-H(1B)···O(2)	0.86	1.97	2.6488(14)	134.4
	O(3)-H(3A)···O(1)	0.82	1.84	2.6642(13)	178.0
	Operaciones de simetría: #1 -x,-y+1,-z				
ETZ-PHL	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
	N(1)-H(1A)···O(3) ^{#1}	0.86	2.08	2.919(4)	165.9
	N(1)-H(1B)···O(2)	0.86	1.94	2.611(4)	134.2
	N(2)-H(2A)···O(1) ^{#2}	0.86	2.07	2.933(4)	177.3
	N(2)-H(2B)···O(4)	0.86	1.95	2.623(4)	134.0
	O(5)-H(5A)···O(1) ^{#3}	0.82	1.85	2.653(3)	167.7
	O(6)-H(6A)···O(3) ^{#1}	0.82	1.86	2.664(3)	168.5
	O(7)-H(7)···O(5) ^{#4}	0.82	2.02	2.833(3)	169.4
	Operaciones de simetría: #1 x+1/2,-y+1,z-1/2 #2 x-1/2,-y+1,z+1/2 #3 x,y-1,z #4 x+1/2,-y,z+1/2				

4.1.3.3. Estudio teórico de los cocrisales de ETZ

El estudio teórico, se centra en evaluar las interacciones que mantienen la estructura cristalina, así como su direccionalidad y fortaleza. Uno de los propósitos de este estudio, es evaluar el impacto en la estabilidad de la estructura, de la formación de dímeros autoensamblados de ETZ:ETZ en ETZ-CAT, ETZ-RES, ETZ-PHL, y la ausencia de estos en ETZ-HQ, tal y como se representa en la **figura 4.1.11**.

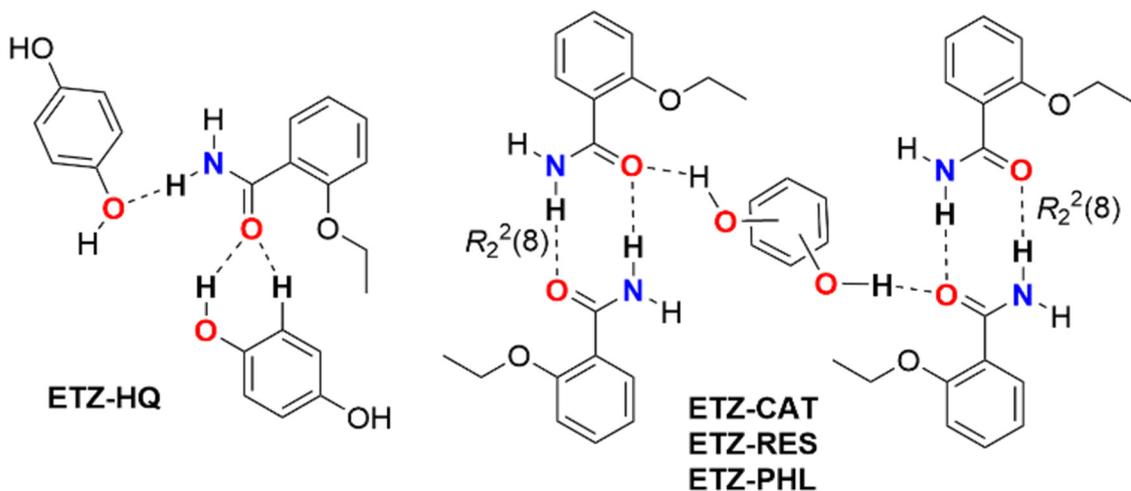


Figura 4.1.11. Esquema de los enlaces de hidrógeno reportados en los cocrisales con ETZ.

Para comenzar el estudio, se han calculado las superficies de los potenciales electrostáticos moleculares (MEP) de ETZ y los coformadores. Estos datos, representados en la **figura 4.1.12**, evidencian que ETZ es el mejor receptor de enlaces de hidrógeno con el valor mínimo de MEP ubicado en los átomos de O-amídicos (-48 kcal/mol), mientras que el valor máximo de MEP está ubicado en el átomo de H-amídico (+32 kcal/mol). Los valores de MEP sobre el anillo aromático de ETZ son negativos (-12 kcal/mol) y positivos en los átomos de H del grupo etilo (+20 kcal/mol). El cálculo de MEP en los polifenoles, se ha realizado utilizando la misma conformación observada en las estructuras cristalinas de los cocrisales. Las superficies de MEP de los polifenoles también muestran que son excelentes dadores de enlaces de hidrógeno, con valores que van desde +48 hasta +51 kcal/mol en los átomos de H fenólicos. Sin embargo, son peores aceptores de enlaces de hidrógeno que ETZ, con valores de MEP que van desde -21 kcal/mol hasta -39 kcal/mol, tal y como se esperaba.

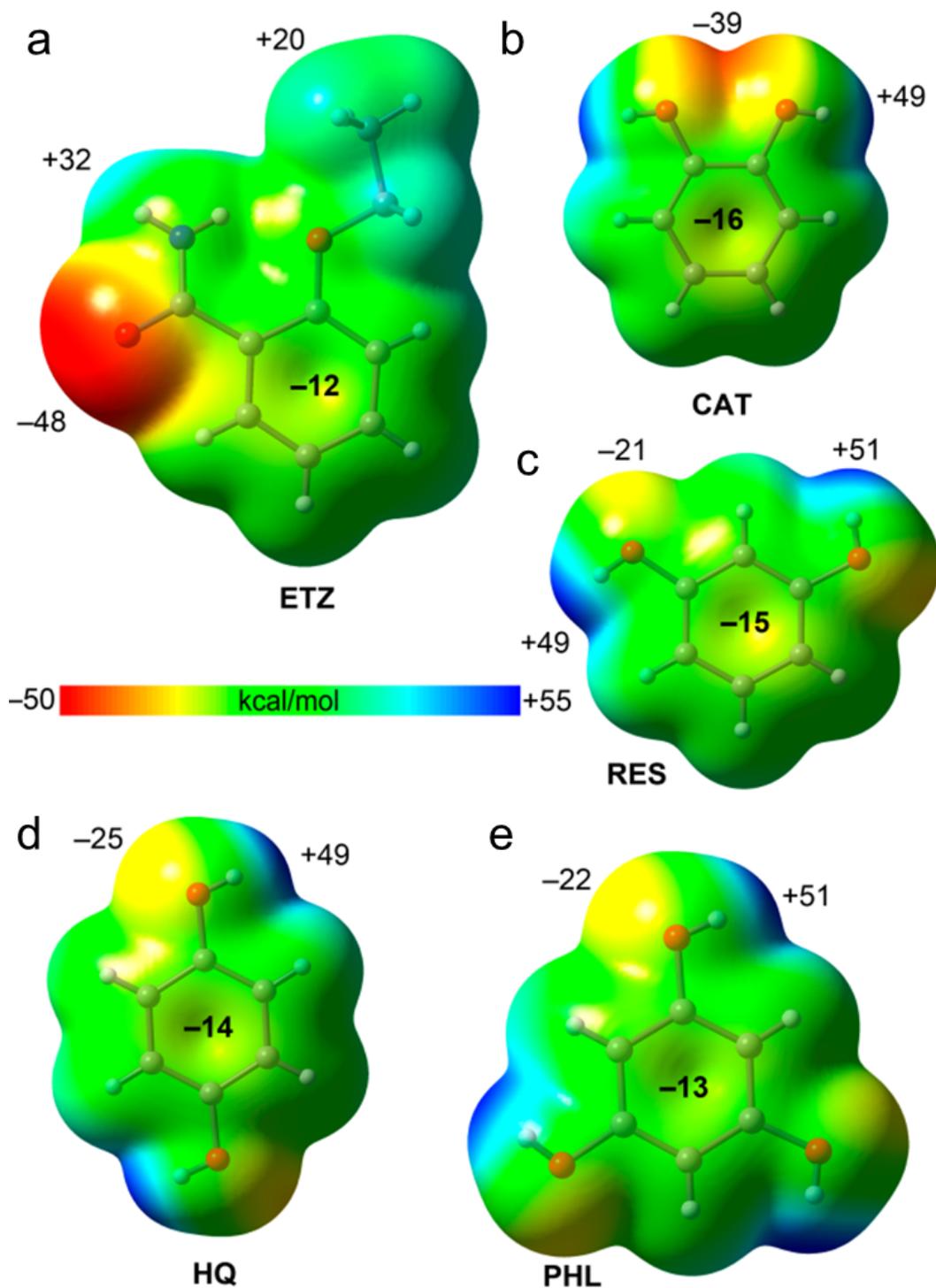


Figura 4.1.12. Superficies MEP de (a) ETZ, (b) CAT, (c) RES, (d) HQ y (e) PHL con nivel de cálculo PBE0-D3/def2-TZVP. Isosuperficie 0.001 a.u. Los valores de MEP se dan en kcal/mol.

En segundo lugar, se ha realizado el análisis QTAIM y NCIPLOT de los enlaces de hidrógeno observados en los cocristales. La **figura 4.1.13** muestra el análisis combinado QTAIM/NCIPLOT de los cocristales ETZ–CAT, ETZ–RES y ETZ–PHL, que tienen en común la formación de dímeros autoensamblados de ETZ mediante enlaces de hidrógeno

amida: amida $R_2^2(8)$. Estos dímeros, se conectan mediante moléculas del coformador, tal y como se ha descrito en el apartado estructural. De hecho, se puede estimar la energía del enlace de hidrógeno (resaltado en naranja) utilizando la densidad de energía potencial en los puntos críticos de unión (CP) mediante la fórmula propuesta por Espinosa *et al.* ($E_{dis} = 0.5 * V_r$). Los valores obtenidos para este estudio se recogen en la **tabla 4.1.2**. Los resultados demuestran una energía formación de enlace de -6.43 kcal/mol en ETZ-RES, -7.06 ETZ-CAT y -8.10 kcal/mol en ETZ-PHL.

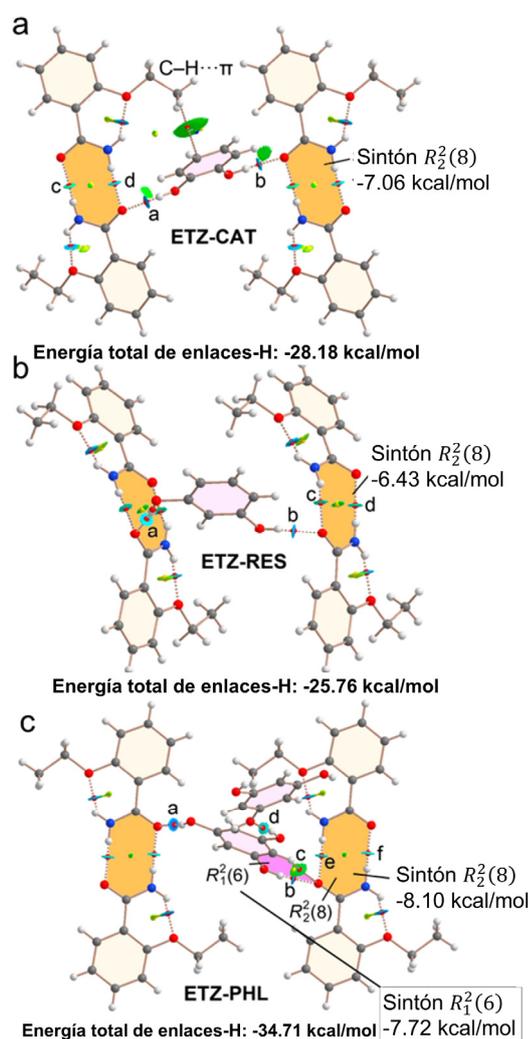


Tabla 4.1.2. Parámetros QTAIM en el CP y las energías de disociación de los CP representados en la figura 4.1.13 y 4.1.14.

CP	ρ	V_r	E_{dis}
ETZ-CAT (a)	0.0264	-0.0240	7.53
ETZ-CAT (b)	0.0237	-0.0208	6.53
ETZ-CAT (c)	0.0127	-0.0035	1.10
ETZ-CAT (d)	0.0205	-0.0152	4.77
ETZ-RES (a)	0.0217	-0.0179	5.62
ETZ-RES (b)	0.0258	-0.0232	7.28
ETZ-RES (c)	0.0154	-0.0101	3.17
ETZ-RES (d)	0.0161	-0.0104	3.26
ETZ-PHL (a)	0.0280	-0.0260	6.46
ETZ-PHL (b)	0.0274	-0.0260	6.46
ETZ-PHL (c)	0.0066	-0.0040	1.26
ETZ-PHL (d)	0.0184	-0.0138	4.33
ETZ-PHL (e)	0.0185	-0.0129	4.05
ETZ-PHL (f)	0.0185	-0.0129	4.05
ETZ-HQ (a)	0.0280	-0.0263	8.25
ETZ-HQ (b)	0.0140	-0.0091	2.85
ETZ-HQ (c)	0.0057	-0.0035	1.10

Figura 4.1.13. Distribución de enlaces de hidrógeno y CP en (a) ETZ-CAT (b) ETZ-RES y (c) ETZ-PHL. El análisis NCIPLOT se representa como una superficie verde RDG isosuperficie 0.5 a.u., límite de densidad = 0.04 a.u., Rango de color: $-0.04 \text{ a.u.} \leq \text{señal}(\lambda_2) * \rho \leq 0.04 \text{ a.u.}$ Sólo las interacciones no covalentes se representan en el análisis QTAIM y NCIPLOT.

Los dímeros, interaccionan con los polifenoles mediante enlaces O–H···O(ETZ) que son más fuertes que los N–H···O, esto se debe a la mayor capacidad del grupo fenol para donar enlaces de hidrógeno en comparación con el grupo –NH₂ de ETZ. En el compuesto ETZ–PHL (**Figura 4.1.13c**), donde el coformador presenta tres grupos OH, dos de ellos se utilizan para interconectar los dímeros de ETZ mediante enlaces O–H···O(ETZ) y el tercero forma un enlace de hidrógeno con una molécula de PHL adyacente $R_1^2(6)$, resaltado en rosa. El mayor número de interacciones en esta disposición provoca que la energía total de la red de enlaces de hidrógenos sea mayor en el caso de ETZ–PHL (-34.71 kcal/mol), cuando se compara con ETZ–CAT y ETZ–RES (-28.18 kcal/mol y -25.76 kcal/mol, respectivamente). La sutil diferencia energética que se observa entre ETZ–CAT y ETZ–RES, se debe a la formación de una interacción C–H··· π que conecta un átomo de H del grupo etilo con el anillo aromático de CAT, dando una mayor estabilidad a la red

Por su parte el cocrystal ETZ–HQ no forma dímeros ETZ:ETZ, sino que cada molécula de ETZ interacciona con 2 moléculas de HQ, mediante un enlace de hidrógeno O–H···O (-8.25 kcal/mol) y un enlace de hidrógeno N–H···O significativamente más débil (-2.85 kcal/mol) (**Figura 4.1.14**). Además, se observa una tercera interacción C–H···O débil (-1.10 kcal/mol) que acompaña al enlace O–H···O, en la formación del sintón $R_1^2(6)$ (resaltado en rosa). La energía total de este sintón (-9.35 kcal/mol) es curiosamente mayor a la observada en los homosintones $R_2^2(8)$, que se dan entre los dímeros de ETZ:ETZ en el resto de los cocristales. Sin embargo, la energía total de la red de enlaces de hidrógeno en ETZ–HQ es mucho menor que en el resto de cocristales (-12.20 kcal/mol), lo cual lo hace más inestables y puede repercutir negativamente en la estabilidad del material.

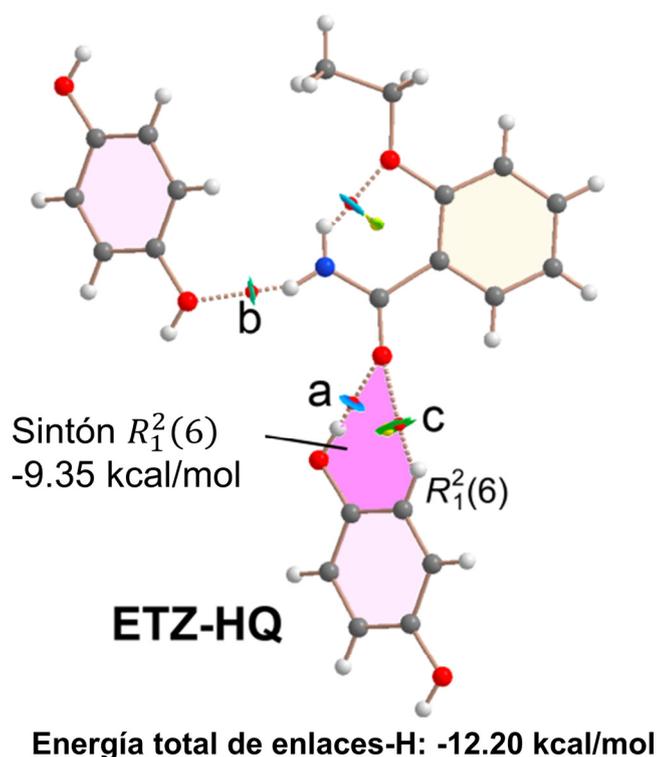


Figura 4.1.14. Distribución de, enlaces de hidrógeno y CP en ETZ–HQ. El análisis NCIPLOT se representa como una superficie verde RDG isosurface 0.5 a.u., límite de densidad = 0.04 a.u., Rango de color: $-0.04 \text{ a.u.} \leq \text{señal } (\lambda_2) * \rho \leq 0.04 \text{ a.u.}$ Sólo las interacciones no covalentes se representan en el análisis QTAIM y NCIPLOT.

Por último, se ha realizado el análisis QTAIM y NCIPLOT para evaluar las interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ presentes en moléculas de ETZ (**Figura 4.1.15**). En tres de los cocristales (ETZ–RES, ETZ–HQ y ETZ–PHL) el apilamiento interconecta el anillo aromático y el anillo de seis miembros que se forma gracias a un enlace de hidrógeno intramolecular en la molécula de ETZ (resaltado en color fucsia). Estas conexiones se dan en varios CP representados por esferas rojas, amarillas y azules. El apilamiento que se observa en los tres casos es antiparalelo, de forma que el anillo aromático de una molécula de ETZ se ubica sobre el anillo de seis miembros de la otra y viceversa. Estas interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ también se confirma mediante el análisis del índice NCIPLOT, que muestra una isosuperficie atractiva entre los anillos (representada en verde). La energía de dimerización calculada, para estas interacciones son, -12.8 kcal/mol para ETZ–HQ y -10.1 kcal/mol para los cocristales de ETZ–RES y ETZ–PHL. La energía de interacción es mayor en ETZ–HQ, probablemente debido a la formación de dos interacciones C–H \cdots O auxiliares que involucran el grupo etilo y el átomo de O-amídico, aumentando el número de CP y la superficie atractiva.

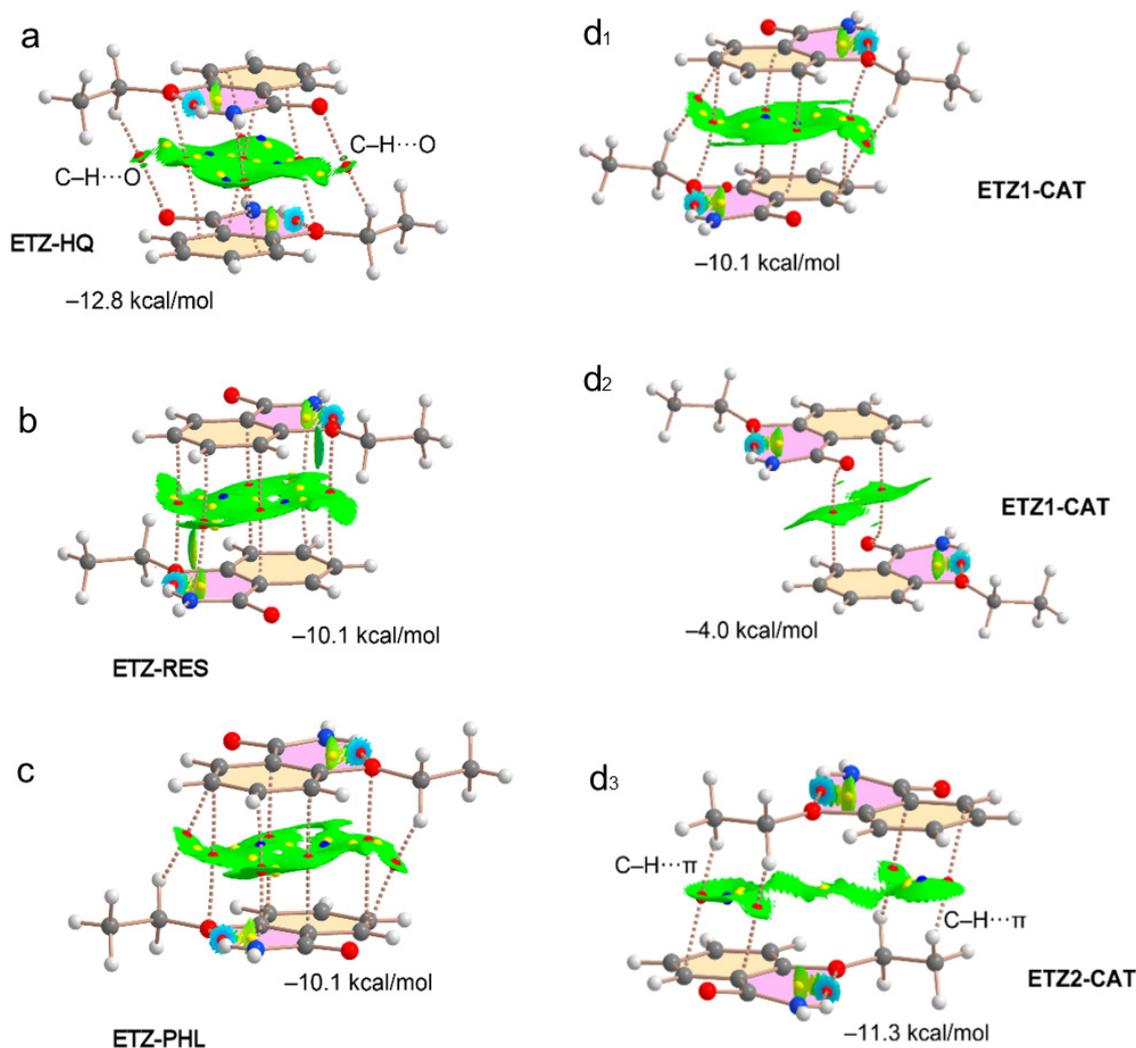


Figura 4.1.15. Distribución y disposición de los anillos aromáticos, enlaces y puntos críticos de unión en las interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$, en los cocristales ETZ-RES, ETZ-HQ, ETZ-PHL y ETZ-CAT. El análisis NCIPLOT se representa como una superficie verde RDG isosuperficie 0.5 a.u., límite de densidad = 0.04 a.u., Rango de color: $-0.04 \text{ a.u.} \leq \text{señal } (\lambda_2) * \rho \leq 0.04 \text{ a.u.}$ Sólo las interacciones no covalentes se representan en el análisis QTAIM y NCIPLOT.

Por su parte, ETZ-CAT, presenta un comportamiento diferente. En este sistema, se observan dos moléculas de ETZ independientes que se disponen de forma simétrica, a saber, ETZ1 (anillo C1-C6) y ETZ2 (anillo C11-C16). Se han encontrado tres modos de apilamiento diferentes. Uno de ellos es similar a las interacciones descritas para los cocristales ETZ-RES y ETZ-PHL, con una disposición antiparalela de los anillos y una energía de unión idéntica (-10.1 kcal/mol) (se excluye ETZ-HQ en esta comparación por su enlace adicional C-H···O, que da lugar a una energía de dimerización mayor, -12.8 kcal/mol). En el segundo modo de apilamiento $\pi \cdots \pi$ ambas moléculas de ETZ están significativamente desplazadas, por lo que la interacción se caracteriza sólo por dos CP

que conectan los átomos de carbono aromáticos con los átomos de oxígeno carbonílico, dando lugar a una superficie de atracción y una energía de dimerización mucho más débil (-4.0 kcal/mol). El último modo de apilamiento observado para ETZ–CAT se caracteriza por la interacción de dos átomos de hidrógeno del grupo etilo con dos átomos de carbono de los anillos aromáticos, estableciendo así dos conjuntos de interacciones CH $\cdots\pi$ simétricos y equivalentes. A pesar del menor número de CP, este modo de unión es ligeramente más fuerte que los anteriores, con una energía de dimerización de -11.3 kcal/mol.

4.1.3.4. Estudio de las propiedades de los cocristales de ETZ

La evaluación de las propiedades físico-químicas de los nuevos materiales debe hacerse una vez se realizado el estudio de la estructura cristalina y sus interacciones, ya que esta información nos permitirá establecer una relación directa entre el comportamiento de cada material y su estructura. En este apartado, nos centraremos en las propiedades básicas de los materiales, como son su estabilidad térmica, estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado (alta humedad y temperatura) y en solución acuosa, así como la solubilidad y la velocidad de disolución.

4.1.3.4.1. Análisis térmico

La estabilidad térmica se refiere a la capacidad de una fase para mantener su integridad frente a cambios de temperatura por debajo del punto de fusión del material. Para evaluar la estabilidad y el comportamiento térmico de los cocristales, se analizaron sus puntos de fusión y pérdidas de peso utilizando análisis simultáneos de DSC y TGA. La **figura 4.1.16a** muestra los resultados obtenidos. En cada muestra se observa un único evento principal y endotérmico que se corresponde con el punto de fusión del cocrystal. En este tipo de materiales, es común que el punto de fusión se encuentre en un valor intermedio al punto de fusión de los componentes.³¹⁴ En el caso de ETZ–PHL se observa este comportamiento, sin embargo el resto de cocristales presentan un punto de fusión inferior al de sus respectivos componentes, lo cual se traduce en una menor estabilidad térmica. Se debe destacar la correlación positiva entre el punto de fusión del cocrystal y el coformador. De este modo, los cocristales pueden ordenarse de menor a mayor estabilidad térmica en ETZ–CAT (65 °C) < ETZ–RES (91 °C) < ETZ–HQ (102 °C) < ETZ–PHL (127 °C), para coformadores con un punto de fusión ordenado HQ (72 °C) <

CAT (105 °C) < RES (110 °C) < PHL (116 °C). Únicamente ETZ–HQ no cumple esta correlación ya que su energía de dimerización es mayor que la del resto de cocristales, lo que permite que, a pesar de contener el coformador con menor punto de fusión (72 °C), la sal resultante presenta el segundo punto de fusión más alto (102 °C), solo superada por ETZ–PHL cuya estabilidad térmica se debe a la mayor energía de su red de enlaces, tal y como se ha estudiado en el apartado anterior.

Los eventos endotérmicos observados por debajo del punto de fusión en los cocristales ETZ–PHL y ETZ–HQ se deben a eventos de fusión-recristalización-fusión, los cuales son una consecuencia de la transición entre dos/tres fases no identificadas, probablemente polimorfos de los cocristales, estables a altas temperaturas. El DSC además nos permite confirmar la pureza de las fases estudiadas, ya que no existen eventos endotérmicos asociados al punto de fusión de alguno de los componentes, corroborando los datos obtenidos mediante PXRD.

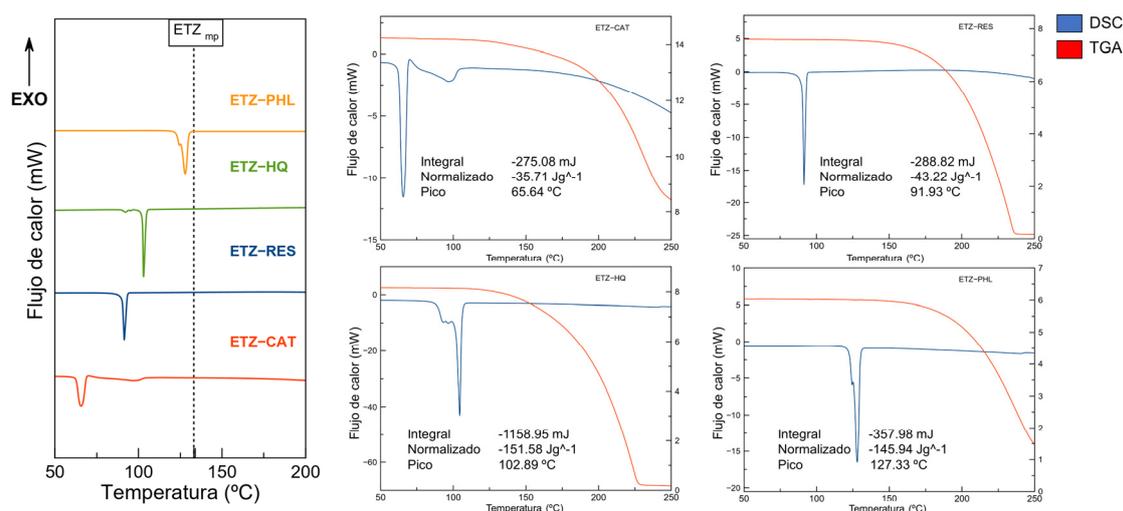


Figura 4.1.16. Curvas de DSC y TGA, obtenidas a 10 °C/min en atmósfera de N₂.

Por su parte, el análisis TGA demostró la integridad de las fases dado que no se observa ninguna pérdida de peso por debajo del punto de fusión, las cuales suelen estar asociadas a humedad, solvatación y descomposición del material. Únicamente, después del punto de fusión, se observa una pérdida de peso asociada a la descomposición de las fases.

4.1.3.4.2. Estudios de estabilidad termodinámica

La estabilidad de los cocrystalos en condiciones de envejecimiento acelerado (40 °C y 75% de humedad relativa) se evaluó durante 4 meses (**Figura 4.1.17a**), mientras que la estabilidad y el perfil de disociación en soluciones acuosas (buffer PBS pH 6.8 a 25 °C) se evaluó durante 24 h (**Figura 4.1.17b**). En todos los ensayos, se utilizó PXRD para evaluar la estabilidad y la cristalinidad de las fases bajo estas condiciones.

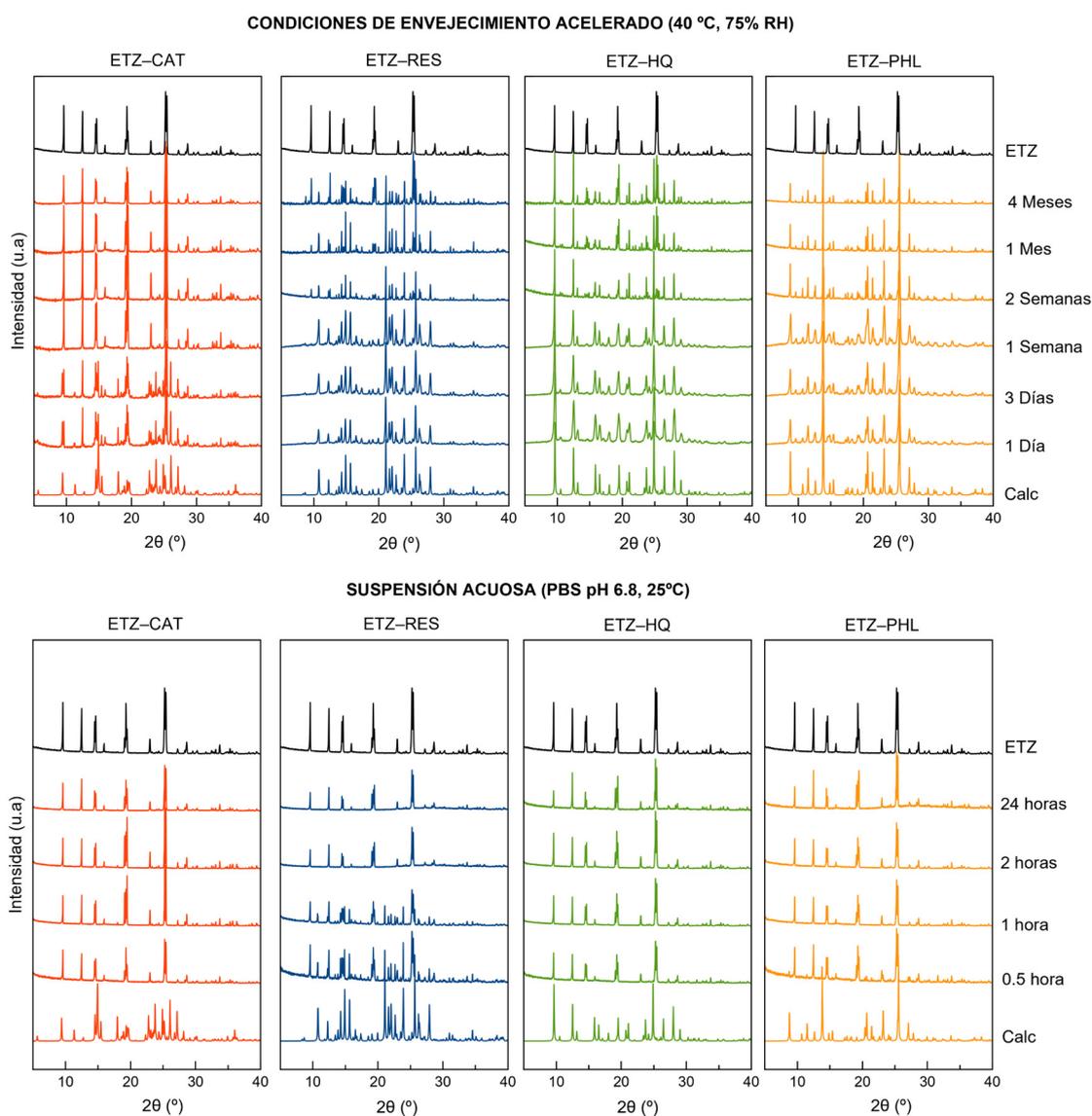


Figura 4.1.18. Estabilidad de los cocrystalos de ETZ en condiciones de envejecimiento acelerado y en solución acuosa buffer PBS pH 6.8 a 25 °C.

Las gráficas demuestran una baja estabilidad general de los materiales cuando se comparan con ETZ. Expuestos a alta humedad y temperatura, a pesar de que no se observan cambios de color o textura, solo ETZ–PHL permanece estable durante los 4 meses de estudio, mientras que ETZ–RES y ETZ–HQ se disocian parcialmente transcurrido 1 mes. Por su parte, ETZ–CAT se disocia en las primeras 24 horas. En todos los casos, la disociación se hace evidente por la presencia de ETZ en el patrón PXRD. Los coformadores, no aparecen en el patrón, debido a procesos de amorfización/licuación por las altas temperaturas y humedades. En solución, también se observa una baja estabilidad, ya que ninguno de los cocrisales es estable por más de 1 hora. Esta baja estabilidad se explica por la intercalación de la molécula de coformador entre los dímeros y moléculas de ETZ. La disrupción y separación de dichos dímeros, hace que la estructura sea menos estable que en su estado nativo. Al igual que lo observado en el análisis térmico, dentro de la baja estabilidad de las fases, ETZ–PHL es el cocrystal con mayor estabilidad, gracias su mayor energía de red de enlaces.

4.1.3.4.3. Solubilidad y perfil de disolución

Una baja estabilidad del cocrystal, aunque sea un inconveniente, puede afectar positivamente a la solubilidad del material. La disrupción y separación de los dímeros ETZ:ETZ con moléculas altamente solubles como los polifenoles, hacen mucho más accesible la liberación y disolución de moléculas de ETZ, lo cual permite aumentar su solubilidad y velocidad de disolución. Para monitorizar la evolución de la concentración de ETZ en una solución acuosa que simule las condiciones fisiológicas del ambiente intestinal (buffer PBS pH 6.8 y 25 °C) se ha utilizado la espectrofotometría UV-Vis, junto con una serie de rectas de calibrado previamente elaboradas. La **figura 4.1.19** muestra el perfil de disolución de ETZ y los cocrisales durante 120 minutos, ya que se ha observado que ningún cocrystal es estable en solución durante un tiempo superior.

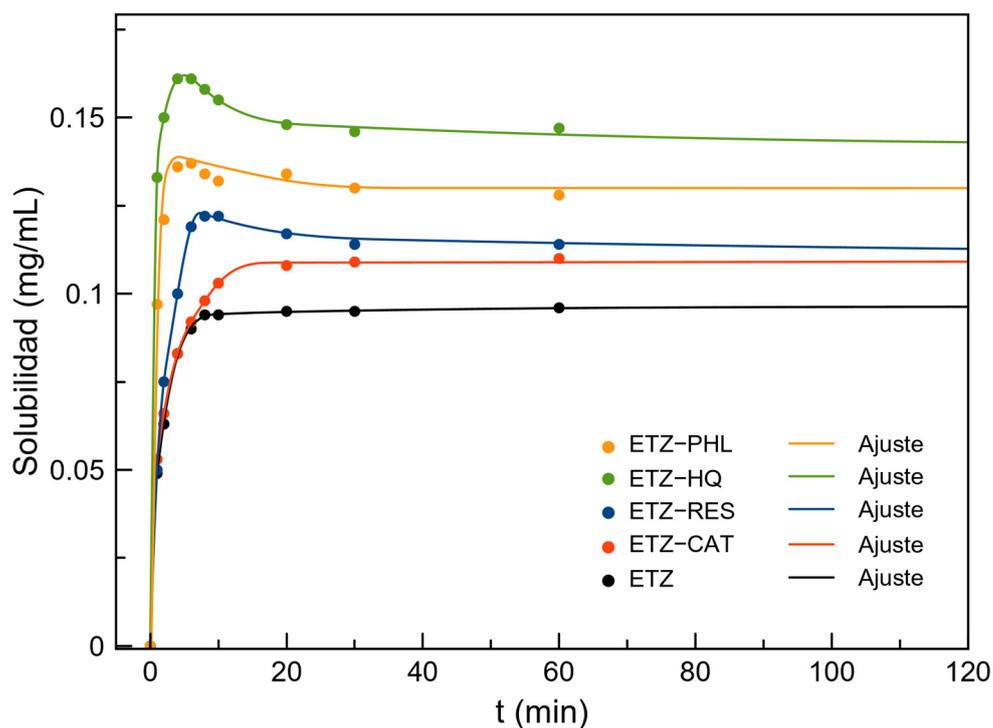


Figura 4.1.19. Perfil de disolución de los cocrystalos en PBS pH 6.8 y 25 °C.

La solubilidad en equilibrio de ETZ obtenida experimentalmente en PBS pH 6.8 es de 0.09 mg/mL, lo cual está en concordancia con los datos reportados en la literatura, mientras que la solubilidad de ETZ obtenida para en los cocrystalos aumenta en todos los casos, en el orden de ETZ-CAT (0.111 mg/mL) < ETZ-RES (0.113 mg/mL) < ETZ-PHL (0.131 mg/mL) < ETZ-HQ (0.141 mg/mL). La separación de dímeros de ETZ:ETZ intercalando moléculas de polifenol, permiten mejorar la solubilidad del API, pero, cuando se produce una disrupción total de este dímero, como en el cocrystal ETZ-HQ, se observa un impacto aún mayor en la solubilidad. Con respecto a la velocidad de disolución, se observa un efecto de "*spring parachute*" en todos los cocrystalos, excepto en ETZ-CAT. Este efecto, como ya se ha descrito en la introducción de la tesis doctoral, es habitual en los MMFs, permitiendo la sobresaturación y la liberación rápida del API en las etapas iniciales del proceso de disolución.

En resumen, el estudio de los MMF de ETZ aquí reportados, ha permitido seleccionar a los polifenoles como coformadores para la obtención de nuevos cocrisales farmacéuticos de ETZ. Como era de esperar, el heterosintón amida-carboxílico guía el reconocimiento molecular entre ETZ y los polifenoles. En las estructuras cristalinas de ETZ-CAT, ETZ-RES y ETZ-PHL, los enlaces recíprocos N-H \cdots O(ETZ) construyen dímeros de ETZ mediante el homosintón amida:amida $R_2^2(8)$, el cual también se observa en la estructura cristalina de ETZ pura. Sin embargo, en los cocrisales, se observa una mayor distancia entre cada dímero ETZ:ETZ debido a la introducción de una molécula del coformador. En el caso de ETZ-HQ, este patrón de reconocimiento no se produce ya que dos moléculas de HQ impiden la formación del dímero ETZ:ETZ y dan lugar a un sintón $R_1^2(6)$ de mayor energía (-9.35 kcal/mol) cuando se compara con la energía del sintón $R_2^2(8)$ observado en los otros cocrisales (ETZ-RES -6.43 kcal/mol < ETZ-CAT -7.06 kcal/mol < ETZ-PHL -8.10 kcal/mol). Además del sintón de reconocimiento molecular, se deben evaluar todas las interacciones presentes, lo que da lugar a una energía de red de ETZ-HQ (-12.20 Kcal/mol) < ETZ-RES (-25.76 Kcal/mol) < ETZ-CAT (-28.18 Kcal/mol) < ETZ-PHL (-34.71 Kcal/mol).

Estas energías permiten establecer relaciones estructura-propiedades. Por ejemplo, la solubilidad de los nuevos cocrisales mejora cuando se compara con ETZ en el orden ETZ-CAT (x1.2) < ETZ-RES (x1.3) < ETZ-PHL (x1.5) < ETZ-HQ (x1.6). Así, la estructura más débil energéticamente (ETZ-HQ) muestra la mayor solubilidad aparente, lo cual se debe a la facilidad para ser disociada/hidratada. Lo mismo ocurre en la velocidad de disolución y el fenómeno de "*spring-parachute*" observado, el cual suele ser interesante en formulación enfocadas para una liberación inmediata del fármaco. Desafortunadamente, los nuevos cocrisales farmacéuticos no muestran una mejora de estabilidad térmica ni termodinámica en comparación con sus respectivos componentes, ya que, todos los cocrisales sufren disociación bajo condiciones fisiológicas.

Los resultados obtenidos en este capítulo, han derivado en la **publicación N°3** de esta tesis doctoral "**Evaluation of synthon influence on ethenzamide-polyphenol pharmaceutical cocrystals**" (CrystEngComm, 2023, 25, 3150-3163).

4.1.4. Referencias

- (281) Li, M.; Liu, Q.; Jia, Z.; Xu, X.; Cheng, Y.; Zheng, Y.; Xi, T.; Wei, S. Graphene Oxide/Hydroxyapatite Composite Coatings Fabricated by Electrophoretic Nanotechnology for Biological Applications. *Carbon* N. Y. 2014, 67, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.080>.
- (282) Kawano, O.; Sawabe, T.; Misaki, N.; Fukawa, K. Studies on Combination Dosing. III. Aspirin and Ethenzamide. *Jpn. J. Pharmacol.* 1978, 28 (6), 829–835. <https://doi.org/10.1254/jjp.28.829>.
- (283) Uehara, H.; Otsuka, H.; Izumi, K. Modifying Effects of a Mixture of Acetaminophen, Aspirin, Dipyrrone and Ethenzamide on a Multiorgan Initiation Model and Its Carcinogenicity in Male F344 Rats. *Cancer Lett.* 1998, 135 (1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00273-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00273-0).
- (284) Aoki, S.; Mizutani, T.; Danjo, K. Studies on the Number of Contacts between Ibuprofen and Ethenzamide Using Thermal Analysis Fig. 1. Schematic Diagram of Sample A and Sample G. *Notes Chem. Pharm. Bull* 2000, 48 (1), 140–141.
- (285) Pekoe, G.; Van Dyke, K.; Peden, D.; Mengoli, H.; English, D. Antioxidation Theory of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Based upon the Inhibition of Luminol-Enhanced Chemiluminescence from the Myeloperoxidase Reaction. *Agents Actions* 1982, 12 (3), 371–376. <https://doi.org/10.1007/BF01965406>.
- (286) Wan, M.; Fang, J.; Xue, J.; Liu, J.; Qin, J.; Hong, Z.; Li, J.; Du, Y. Pharmaceutical Cocrystals of Ethenzamide: Molecular Structure Analysis Based on Vibrational Spectra and DFT Calculations. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23 (15), 8550. <https://doi.org/10.3390/ijms23158550>.
- (287) Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: Antioxidants and Beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81 (1), 215S–217S. <https://doi.org/10.1093/AJCN/81.1.215S>.
- (288) Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységú, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2011, 50 (3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201000044>.
- (289) Abbas, M.; Saeed, F.; Anjum, F. M.; Afzaal, M.; Tufail, T.; Bashir, M. S.; Ishtiaq, A.; Hussain, S.; Suleria, H. A. R. Natural Polyphenols: An Overview. *International Journal of Food Properties*. Taylor & Francis August 3, 2017, pp 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
- (290) Magaña-Vergara, N. E.; De La Cruz-Cruz, P.; Peraza-Campos, A. L.; Martínez-Martínez, F. J.; González-González, J. S. Mechanochemical Synthesis and Crystal Structure of the Lidocaine-Phloroglucinol Hydrate 1:1:1 Complex. *Crystals* 2018, 8 (3), 130. <https://doi.org/10.3390/cryst8030130>.
- (291) González-González, J. S.; Martínez-Santiago, A. M. M.; Martínez-Martínez, F. J.; Emparán-Legaspi, M. J.; Pineda-Contreras, A.; Flores-Alamo, M.; García-Ortega, H. Cocrystals of Isoniazid

- with Polyphenols: Mechanochemical Synthesis and Molecular Structure. *Crystals* 2020, 10 (7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cryst10070569>.
- (292) Xiao, Y.; Zhou, L.; Hao, H.; Bao, Y.; Yin, Q.; Xie, C. Cocrystals of Propylthiouracil and Nutraceuticals toward Sustained-Release: Design, Structure Analysis, and Solid-State Characterization. *Cryst. Growth Des.* 2021, 21 (2), 1202–1217. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01519>.
- (293) Verdugo-Escamilla, C.; Alarcón-Payer, C.; Acebedo-Martínez, F. J.; Fernández-Penas, R.; Domínguez-Martín, A.; Choquesillo-Lazarte, D. Lidocaine Pharmaceutical Multicomponent Forms: A Story about the Role of Chloride Ions on Their Stability. *Crystals* 2022, 12 (6), 798. <https://doi.org/10.3390/cryst12060798>.
- (294) Back, K. R.; Davey, R. J.; Grecu, T.; Hunter, C. A.; Taylor, L. S. Molecular Conformation and Crystallization: The Case of Ethenzamide. *Cryst. Growth Des.* 2012, 12 (12), 6110–6117. <https://doi.org/10.1021/cg301244x>.
- (295) Pagola, S.; Stephens, P. W. Herringbone Array of Hydrogen-Bonded Ribbons in 2-Ethoxy-Benzamide from High-Resolution X-Ray Powder Diffraction. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 2009, 65 (11), o583–o586. <https://doi.org/10.1107/S0108270109040803>.
- (296) Khatioda, R.; Bora, P.; Sarma, B. Trimorphic Ethenzamide Cocrystal: In Vitro Solubility and Membrane Efflux Studies. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18 (8), 4637–4645. https://doi.org/10.1021/ACS.CGD.8B00603/ASSET/IMAGES/LARGE/CG-2018-006038_0008.JPEG.
- (297) Allen, F. H. The Cambridge Structural Database: A Quarter of a Million Crystal Structures and Rising. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 2002, 58 (3 PART 1), 380–388. <https://doi.org/10.1107/S0108768102003890>.
- (298) Khatioda, R.; Saikia, B.; Das, P. J.; Sarma, B. Solubility and: In Vitro Drug Permeation Behavior of Ethenzamide Cocrystals Regulated in Physiological PH Environments. *CrystEngComm* 2017, 19 (46), 6992–7000. <https://doi.org/10.1039/c7ce01626c>.
- (299) Kozak, A.; Marek, P. H.; Pindelska, E. Structural Characterization and Pharmaceutical Properties of Three Novel Cocrystals of Ethenzamide With Aliphatic Dicarboxylic Acids. *J. Pharm. Sci.* 2019, 108 (4), 1476–1485. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2018.10.060>.
- (300) Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H. Conformational and Enantiotropic Polymorphism of a 1:1 Cocrystal Involving Ethenzamide and Ethylmalonic Acid. *CrystEngComm* 2010, 12 (11), 3691–3697. <https://doi.org/10.1039/c004491a>.
- (301) Acebedo-Martínez, F. J.; Alarcón-Payer, C.; Rodríguez-Domingo, L.; Domínguez-Martín, A.; Gómez-Morales, J.; Choquesillo-Lazarte, D. Furosemide/Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug–Drug Pharmaceutical Solids: Novel Opportunities in Drug Formulation. *Crystals* 2021, 11 (11),

1339. <https://doi.org/10.3390/cryst11111339>.
- (302) Nechipadappu, S. K.; Trivedi, D. R. Cocrystal of Nutraceutical Sinapic Acid with Active Pharmaceutical Ingredients Ethenzamide and 2-Chloro-4-Nitrobenzoic Acid: Equilibrium Solubility and Stability Study. *J. Mol. Struct.* 2018, 1171, 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.06.074>.
- (303) Nechipadappu, S. K.; Tekuri, V.; Trivedi, D. R. Pharmaceutical Co-Crystal of Flufenamic Acid: Synthesis and Characterization of Two Novel Drug-Drug Co-Crystal. *J. Pharm. Sci.* 2017, 106 (5), 1384–1390. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.01.033>.
- (304) Moribe, K.; Tsuchiya, M.; Tozuka, Y.; Yamaguchi, K.; Oguchi, T.; Yamamoto, K. Grinding-Induced Equimolar Complex Formation between Thiourea and Ethenzamide. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, 52 (5), 524–529. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.524>.
- (305) Hariprasad, V. M.; Nechipadappu, S. K.; Trivedi, D. R. Cocrystals of Ethenzamide: Study of Structural and Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (8), 4473–4481. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00606>.
- (306) Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H. Polymorphs and Solvates of a Cocrystal Involving an Analgesic Drug, Ethenzamide, and 3,5-Dinitrobenzoic Acid. *Cryst. Growth Des.* 2010, 10 (5), 2229–2238. https://doi.org/10.1021/CG9015178/SUPPL_FILE/CG9015178_SI_002.PDF.
- (307) Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H. Ethenzamide-Gentisic Acid-Acetic Acid (2/1/1). *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* 2010, 66 (5), o1045–o1046. <https://doi.org/10.1107/S1600536810012407/FB2192ISUP2.HKL>.
- (308) Sarmah, K. K.; Boro, K.; Arhangelskis, M.; Thakuria, R. Crystal Structure Landscape of Ethenzamide: A Physicochemical Property Study. *CrystEngComm* 2017, 19 (5), 826–833. <https://doi.org/10.1039/c6ce02057g>.
- (309) Khatioda, R.; Saikia, B.; Das, P. J.; Sarma, B. Solubility and in Vitro Drug Permeation Behavior of Ethenzamide Cocrystals Regulated in Physiological PH Environments. *CrystEngComm* 2017, 19 (46), 6992–7000. <https://doi.org/10.1039/C7CE01626C>.
- (310) Potticary, J.; Hall, C.; Hamilton, V.; McCabe, J. F.; Hall, S. R. Crystallization from Volatile Deep Eutectic Solvents. *Cryst. Growth Des.* 2020, 20 (5), 2877–2884. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00399>.
- (311) Loschen, C.; Klamt, A. Solubility Prediction, Solvate and Cocrystal Screening as Tools for Rational Crystal Engineering. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015, 67 (6), 803–811. <https://doi.org/10.1111/JPHP.12376>.
- (312) Abramov, Y. A.; Loschen, C.; Klamt, A. Rational Coformer or Solvent Selection for Pharmaceutical Cocrystallization or Desolvation. *J. Pharm. Sci.* 2012, 101 (10), 3687–3697. <https://doi.org/10.1002/JPS.23227>.

- (313) Heinz, A.; Strachan, C. J.; Gordon, K. C.; Rades, T. Analysis of Solid-State Transformations of Pharmaceutical Compounds Using Vibrational Spectroscopy. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010, 61 (8), 971–988. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.08.0001>.
- (314) Perlovich, G. Melting Points of One- and Two-Component Molecular Crystals as Effective Characteristics for Rational Design of Pharmaceutical Systems. *Acta Crystallogr. B. Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 2020, 76 (4), 696–706. <https://doi.org/10.1107/S2052520620007362>.

4.2. Mejora de la solubilidad de fármacos AINEs mediante la formación de materiales multicomponente tipo fármaco-fármaco con ciprofloxacino

4.2.1. Introducción

En esta tesis doctoral se ha reiterado el impacto de la solubilidad sobre la biodisponibilidad de un fármaco.³¹⁵ Además, el capítulo anterior ha puesto de manifiesto el potencial de la ingeniería cristalina para modular las propiedades de un AINE (ETZ), a través de la cocrystalización con moléculas orgánicas sencillas como los polifenoles.¹¹² Sin embargo, las sales y los cocrisales también tienen la capacidad de modular las propiedades de dos o más fármacos simultáneamente, cuando la molécula coformadora es un API con actividad terapéutica intrínseca. Con este enfoque se obtienen MMFs tipo fármaco-fármaco que, además de mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los APIs que lo componen, también buscan promover efectos sinérgicos.^{112,127}

Los AINEs, se utilizan para aliviar el dolor, bajar la fiebre y reducir la inflamación, sin embargo, estos síntomas son, por lo general, consecuencia de una afección o enfermedad de grado mayor. Por este motivo, los AINEs suelen administrarse junto con otros fármacos dando una actividad combinada que permita reducir la inflamación, mientras se ataca el origen de la misma. Los antibióticos son uno de los principales fármacos utilizados en estas combinaciones, ya que la mayoría de infecciones están vinculadas a procesos inflamatorios, fiebre y dolor. A su vez, gran cantidad de enfermedades y traumatismos en los que se prescriben AINEs tienen riesgos de sufrir complicaciones severas debido a infecciones, como las que suelen darse en traumatismos y enfermedades óseas.

La buena sinergia farmacéutica entre los AINEs y los fármacos antibacterianos, así como los problemas de solubilidad y biodisponibilidad de estos, nos lleva al desarrollo de este capítulo 4.2 en el que se aborda la síntesis y caracterización de seis sales fármaco-fármaco formadas por ciprofloxacino (CIP) y diferentes AINEs que actuarán como molécula coformadora (Ver Clasificación de los AINEs, Capítulo 1.5.1): ácido mefenámico (MEF) y tolfenámico (TLF), ketoprofeno (KET), dexketoprofeno (DKT), diclofenaco (DIC) y sulindac (SLD) (**Figura 4.2.1**).

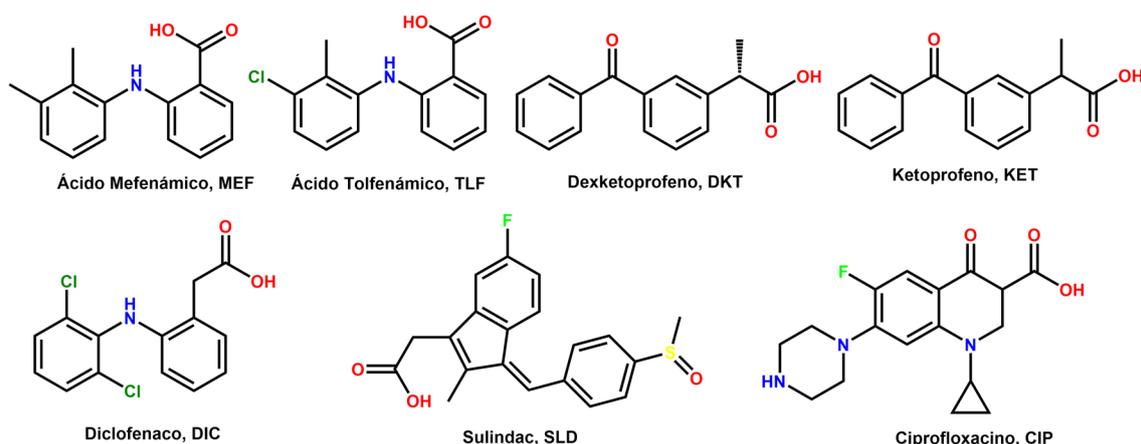


Figura 4.2.1. APIs utilizados para la obtención de las sales CIP–AINEs.

CIP es un antibacteriano de amplio espectro definido como una fluoroquinolona de segunda generación. Su mecanismo de acción se centra en inhibir la replicación del ADN bacteriano a través de la inhibición de la topoisomerasa y la ADN-girasa. Este antibiótico sintético presenta gran efectividad frente a la mayoría de bacterias *Gram negativas* y *Gram positivas*, aunque estas últimas suelen ofrecer mayor resistencia. Su amplio espectro de actividad, ha permitido que CIP sea uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas con resistencia a penicilinas y macrólidos.³¹⁶ Farmacéuticamente, CIP se clasifica como un fármaco de clase IV en el SCB, mostrando baja solubilidad y baja permeabilidad.³¹⁵

Esta baja solubilidad se atribuye a la naturaleza zwitteriónica y las fuertes interacciones que se producen en el empaquetamiento cristalino.³¹⁷ Por ello, diversos estudios han demostrado que la formación de sales es el mejor enfoque para aumentar con éxito la solubilidad de CIP, ya que permite eliminar el dipolo en los zwitteriones, disminuyendo la energía de su red cristalina.^{318–320} Así pues, el objetivo de este capítulo se centra en explorar nuevas formas sólidas que permitan la administración combinada de CIP–AINEs, evaluando diferentes propiedades como son la solubilidad, la estabilidad y la actividad antibacteriana.

4.2.2. Preparación de las sales de CIP–AINEs

4.2.2.1. Diseño de sales moleculares

Una búsqueda bibliográfica de los diferentes sólidos cristalinos de CIP, en la base de datos CSD (versión 5.43, actualización 4 de noviembre de 2022) ha dado como resultado 67 compuestos, de los cuales 35 son sales moleculares (52%).^{318–321} El resto se corresponden con hidratos, solvatos, polimorfos y complejos metálicos de CIP (en su mayoría hidratados). El alto número de sales moleculares reportadas se debe a la naturaleza anfotérica de CIP, que contiene grupos básicos –NH piperazina y grupos ácidos carboxílicos, fácilmente ionizables. La "regla del pK_a", basada en datos cristalográficos empíricos,^{322–324} establece que la formación de sales ocurre generalmente cuando la diferencia de pK_a entre grupos ionizables (ácido-base) es mayor que 3. En este caso, el valor pK_a del grupo carboxílico de los AINEs es menor, que el pK_a del grupo carboxílico de CIP, lo que promueve la formación de sales mediante el grupo –NH de CIP, cuyo pK_a es de 8.74 (**Tabla 4.2.1**). En la bibliografía, solo se han reportado dos sales moleculares de CIP y un AINE como contraión: CIP–indoprofeno·H₂O y CIP–diflunisal.³¹⁸

Tabla 4.2.1. Valores de pK_a reportados y calculados, así como los valores H_{ex} obtenidos del análisis COSMOQuick de los AINEs utilizados en este capítulo.

API	Valores pK _a Reportados	Ref.	*Valores pK _a Calculados *	ΔpK _a	H _{ex} (kcal/mol)
Ciprofloxacino	8.74 (–NH)	[³²⁵]	8.77	--	
Dexketoprofeno	3.88; 4.55; 5.02	[^{326–328}]	3.88	4.86	–1.530325
Ácido Mefenámico	3.93; 4.64	[³²⁹]	3.89	4.81	–2.540215
Ácido Tolfenámico	4.3; 5.11	[^{330,331}]	3.88	4.44	–2.718395
Ketoprofeno	3.8; 3.7; 4; 4.30	[^{329,331–333}]	3.88	4.94	–1.530325
Diclofenaco	4.15; 4.2	[^{331,334}]	4.00	4.59	–3.069495
Sulindac	4.7	[^{328,335}]	4.09	4.04	–0.260615
Diflunisal		Reportado en la bibliografía			–1.520345
Indoprofeno		Reportado en la bibliografía			–3.80753

* Valores calculados usando el software MarvinSketch software.³³⁶

COSMOQuick se ha utilizado para evaluar la tendencia de CIP a formar sales con nuestra selección de AINEs, apoyando así el estudio bibliográfico (**Tabla 4.2.1**). Como ya se ha descrito en el capítulo 4.1, esta herramienta se basa en cálculos termodinámicos que permiten estimar el H_{ex} de un MMF,³¹¹ por lo que valores negativos de H_{ex} se traducen en una tendencia a la formación de MMFs.

4.2.2.2. Síntesis mecanoquímica

La síntesis mecanoquímica de las sales CIP–AINEs se realizó mediante LAG en un molino de bolas Retsch MM2000, con una frecuencia de trabajo de 25 Hz. Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente, durante 30 minutos, repitiendo la operativa en varias ocasiones para asegurar la reproducibilidad. A su vez, todos los productos obtenidos, se han analizado mediante PXRD para determinar la formación de un nuevo MMF.

- CIP–MEF·H₂O, CIP–TLF, CIP–SLD, CIP–KET y CIP–DKT, se obtuvieron mediante LAG de una mezcla de CIP (0.2 mmol, 66.27 mg) y el AINE correspondiente (0.2 mmol) en una relación estequiométrica 1:1, utilizando y 50 µL de metanol como aditivo líquido.
- CIP–MEF se obtuvo mediante deshidratación de la sal CIP–MEF·H₂O. Para ello, el producto obtenido del LAG de CIP–MEF en metanol, se calentó en una estufa a 120 °C durante 2 días.
- CIP–DIC se obtuvo mediante LAG de una mezcla de CIP (0.2 mmol, 66.27 mg) y DIC (0.4 mmol, 118.46 mg) en una relación estequiométrica 1:2, usando 50 µL de metanol como aditivo líquido.

4.2.2.3. Síntesis en solución

La obtención de monocristales es fundamental para el estudio de la estructura cristalina de las nuevas sales mediante SCXRD. A continuación, se detalla el procedimiento para la obtención de los cristales de las sales reportadas.

- Los cristales de CIP–MEF·H₂O y CIP–TLF se han obtenido disolviendo 0.05 mmol (16.56 mg) de CIP y 0.05 mmol de MEF (12.06 mg) y TLF (13.08 mg), en una mezcla 1:1 (v/v) de acetonitrilo/metanol. Tras 2 días de lenta evaporación a temperatura ambiente, se observaron cristales apropiados para estudios de SCXRD.
- Los cristales de CIP–MEF se han obtenido a partir de una solución saturada del producto de la deshidratación de CIP–MEF·H₂O, usando acetona como disolvente. Los cristales aparecieron después de 2 días de lenta evaporación a temperatura ambiente.

- Los cristales de CIP–KET y CIP–DIC se han obtenido a partir de una solución saturada del producto del LAG en metanol. Los cristales aparecieron después de 1 día de lenta evaporación del solvente a temperatura ambiente.
- Los cristales de CIP–SLD se han obtenido mediante síntesis hidrotermal. Se colocó una mezcla de CIP (0.1 mmol, 33.10 mg) y SLD (0.1 mmol, 35.64 mg) en una relación estequiométrica 1:1 en un reactor hidrotermal con 3 mL de agua miliQ. El reactor se selló herméticamente y se calentó a 110 °C durante 24 h. Antes de abrirlo, el reactor se dejó enfriar lentamente durante 5 horas, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los cristales de CIP–SLD se separaron directamente de la solución.

4.2.3. Resultados y discusión

4.2.3.1. Evaluación de la formación de sales moleculares

Las ventajas del LAG frente a la molienda convencional para la síntesis de MMFs, han sido demostradas en el capítulo anterior. Por ello, la síntesis de las nuevas sales de CIP se ha realizado directamente mediante LAG, evitando el sobreconsumo de recursos y tiempo. Los difractogramas de PXRD de los productos del LAG, muestran picos característicos que difieren de ambos APIs, indicando así la formación de nuevas fases cristalinas. En el caso de CIP y DIC, la reacción en estequiometría 1:1 resultó en la formación de una nueva fase con exceso de CIP, sugiriendo la formación de una fase con una relación estequiométrica diferente a la propuesta. La repetición del LAG de CIP y DIC en una proporción estequiométrica 1:2, resulta en la obtención de una fase pura.

En este punto podemos confirmar la formación de nuevas fases cristalinas, pero no podemos asegurar la formación de sales, cocristales, solvatos o polimorfos. Para determinar el tipo de material obtenido, se debe realizar un análisis de la estructura cristalina mediante SCXRD. Estos estudios, no sólo han confirmado la formación de sales moleculares de CIP–AINEs, sino que han demostrado la formación de una sal hidratada en el caso del LAG de CIP y MEF. Esto ha permitido realizar los ensayos de deshidratación, para obtener la sal anhidra CIP–MEF (La estructura anhidra de la sal también debe confirmarse mediante SCXRD). Por último, los difractogramas de PXRD calculados a partir de las estructuras cristalinas, han permitido confirmar la pureza de las fases obtenidas durante las operaciones de síntesis, tal y como muestra la **figura 4.2.2**.

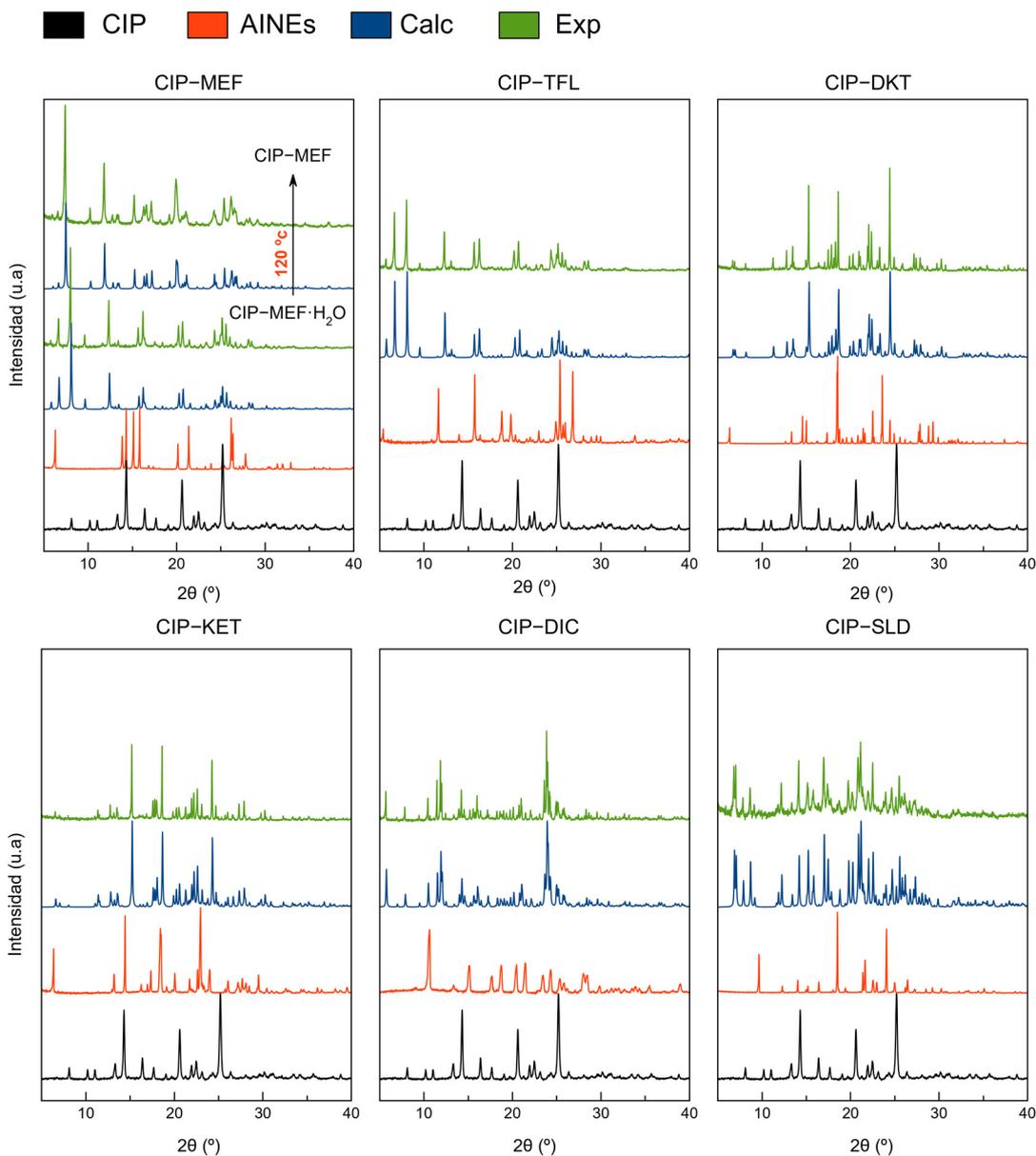


Figura 4.2.2. Difractogramas de PXRD de los APIs, de los productos de las reacciones de síntesis y los calculados a partir de las estructuras cristalinas.

4.2.3.2. Análisis estructural de las sales de ciprofloxacino con AINEs

La formación de sales se produce mediante la transferencia de protones de los grupos ácidos de los AINEs al anillo de piperazina de CIP. Este hecho se evidencia en el mapa experimental de densidad electrónica y se confirma mediante el análisis de las distancias de enlace C–O para el grupo carboxilato de los AINEs, con valores ΔD_{C-O} similares a los observados en sales (típicamente inferiores a 0.03 Å).³³⁷ Los datos cristalográficos obtenidos para todas las muestras se resumen en la **tabla 4.2.2**, así como

la información sobre los enlaces de hidrógeno se recogen en la **tabla 4.2.3** al final de la sección de análisis estructural.

Las estructuras cristalinas de las sales de CIP presentan motivos estructurales comunes, como es la formación del sintón $R_2NH_2^+ \cdots ^-OOC$, que establece un enlace de hidrógeno iónico entre el grupo nitrógeno de piperazina de CIP (protonado) y el oxígeno carboxilato (desprotonado) del AINE. Otro motivo estructural común, a excepción de CIP–SLD, es la formación de unidades tetraméricas supramoleculares centrosimétricas $R_4^4(12)$.^{137,143}

Además, las estructuras de muchas fluoroquinolonas como CIP se caracterizan por la formación de columnas infinitas, unidas entre sí por fuerzas de apilamiento $\pi \cdots \pi$ (**Figura 4.2.3a**).³²¹ Esta disposición también se ha observado en las sales CIP–MEF, CIP–TLF y CIP–DIC. En el caso de CIP–DKT, CIP–KET y CIP–SLD se produce la ruptura de estas columnas lo cual tendrá repercusiones en las propiedades del material (**Figura 4.2.3b**).

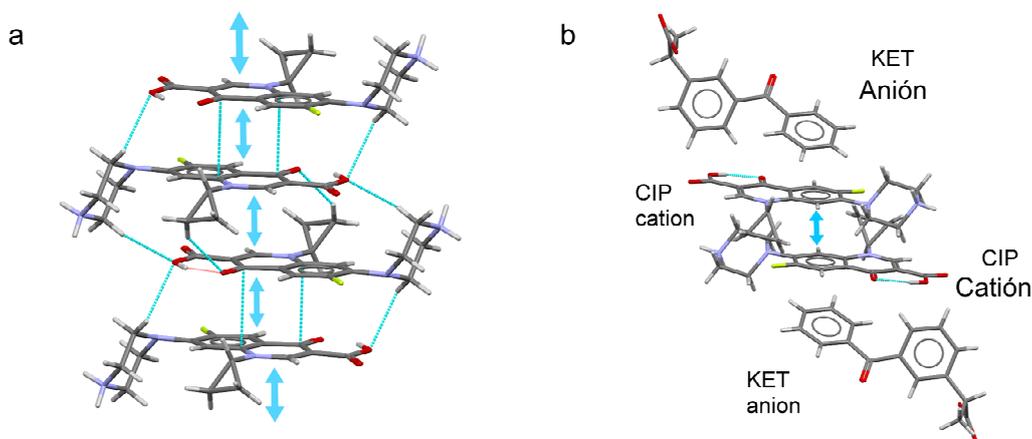


Figura 4.2.3. (a) Fragmento de las columnas infinitas de CIP apiladas mediante interacciones $\pi \cdots \pi$. (b) Dos moléculas de CIP–CIP apiladas por fuerzas $\pi \cdots \pi$, rodeadas por moléculas de KET, que rompen la estructura columnar de CIP.

A pesar de compartir características comunes, el estudio individual de cada una de las sales obtenidas es fundamental para poder comprender y establecer relaciones entre la estructura y las propiedades de cada material.

4.2.3.2.1. CIP-MEF

CIP-MEF cristaliza como una sal en el sistema triclinico con grupo espacial P-1. La unidad asimétrica contiene un catión de CIP⁺ y un anión de MEF⁻ (**Figura 4.2.4a**). Dos enlaces de hidrógeno iónicos N⁺-H···O⁻ conectan los iones de CIP⁺ y MEF⁻ para formar una unidad tetramérica centrosimétrica (**Figura 4.2.4b**). Los cationes de CIP⁺ forman columnas infinitas a través de interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$. En la estructura cristalina las columnas se rodean por iones de MEF⁻ y la arquitectura supramolecular se construye mediante interacciones adicionales de C-H··· π entre el anillo ciclopropilo de CIP⁺ y el anillo aromático sustituido de MEF⁻ (**Figura 4.2.4c**).

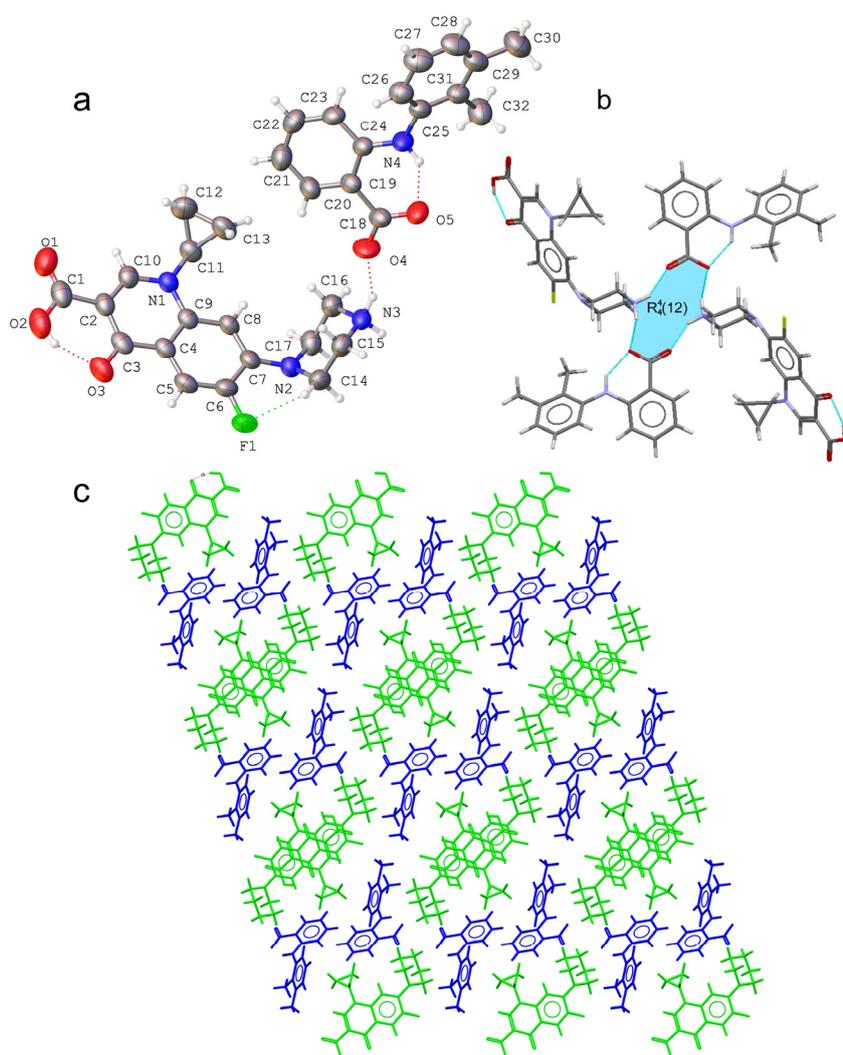


Figura 4.2.4. (a) Unidad asimétrica de CIP-MEF. (b) Formación tetramérica en CIP-MEF. (c) Vista detallada del empaquetamiento de los cationes de CIP⁺ (verde) y los aniones de MEF⁻ (azul) en CIP-MEF.

4.2.3.2.2. CIP-MEF·H₂O

CIP-MEF·H₂O también cristaliza en el sistema triclinico con el grupo espacial P-1, pero en este caso la unidad asimétrica contiene un catión de CIP⁺, un anión de MEF⁻ y una molécula de agua, lo que resulta en la formación de una sal hidratada (**Figura 4.2.5a**). Sorprendentemente, la estructura cristalina del hidrato tiene una gran similitud a la estructura de la sal anhidra, ya que se observa la formación de unidades tetraméricas e interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ para dar columnas infinitas de CIP⁺ rodeadas por moléculas de MEF⁻ (**Figura 4.2.5b**). Sin embargo, en este caso la estructura cristalina presenta canales infinitos que se extienden a lo largo del eje *a*, donde se alojan las moléculas de agua (**Figura 4.2.5c,d**). Estos canales, corresponden al 7.7% del volumen de la celda unidad y permiten explicar, cómo la deshidratación de CIP-MEF·H₂O da lugar a la formación de la fase anhidra CIP-MEF, sin producir un reordenamiento severo en la estructura cristalina. Por último, las interacciones C-H \cdots π entre el anillo ciclopropilo de CIP⁺ y el anillo aromático sustituido de MEF⁻ refuerzan la estructura supramolecular.

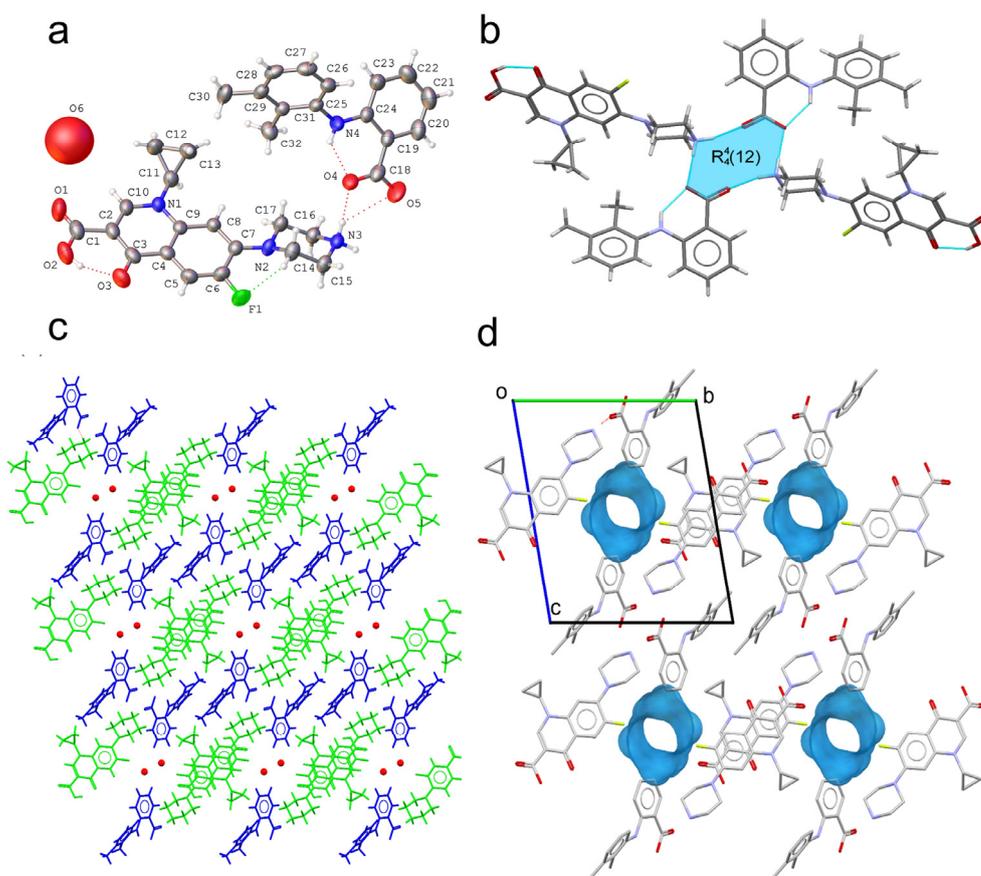


Figura 4.2.5. (a) Unidad asimétrica y (b) formación tetramérica en CIP-MEF·H₂O. (c) Vista detallada del empaquetamiento de los cationes de CIP⁺ (verde) y los aniones de MEF⁻ (azul) y H₂O (rojo) en CIP-MEF·H₂O. (d) Canales en la estructura cristalina vistos a lo largo del eje *a*.

4.2.3.2.3. CIP-TLF

Por la similitud del AINE, CIP-TLF presenta una estructura cristalina similar a CIP-MEF. CIP-TLF cristaliza en el sistema triclínico con el grupo espacial P-1. La unidad asimétrica contiene un catión de CIP⁺ y un anión de TLF⁻ (**Figura 4.2.6a**). Como se observa en las sales moleculares de CIP-fenamato, dos enlaces de hidrógeno iónicos N⁺-H···O⁻ conectan los iones de CIP⁺ y TLF⁻ para formar una unidad tetramérica centrosimétrica. La formación de columnas de iones de CIP⁺ se produce por fuerzas de apilamiento $\pi\cdots\pi$ (**Figura 4.2.6b,c**). Las interacciones C-H··· π que involucran el anillo ciclopropilo de CIP⁺ y el anillo aromático sustituido de TLF⁻ refuerzan la estructura.

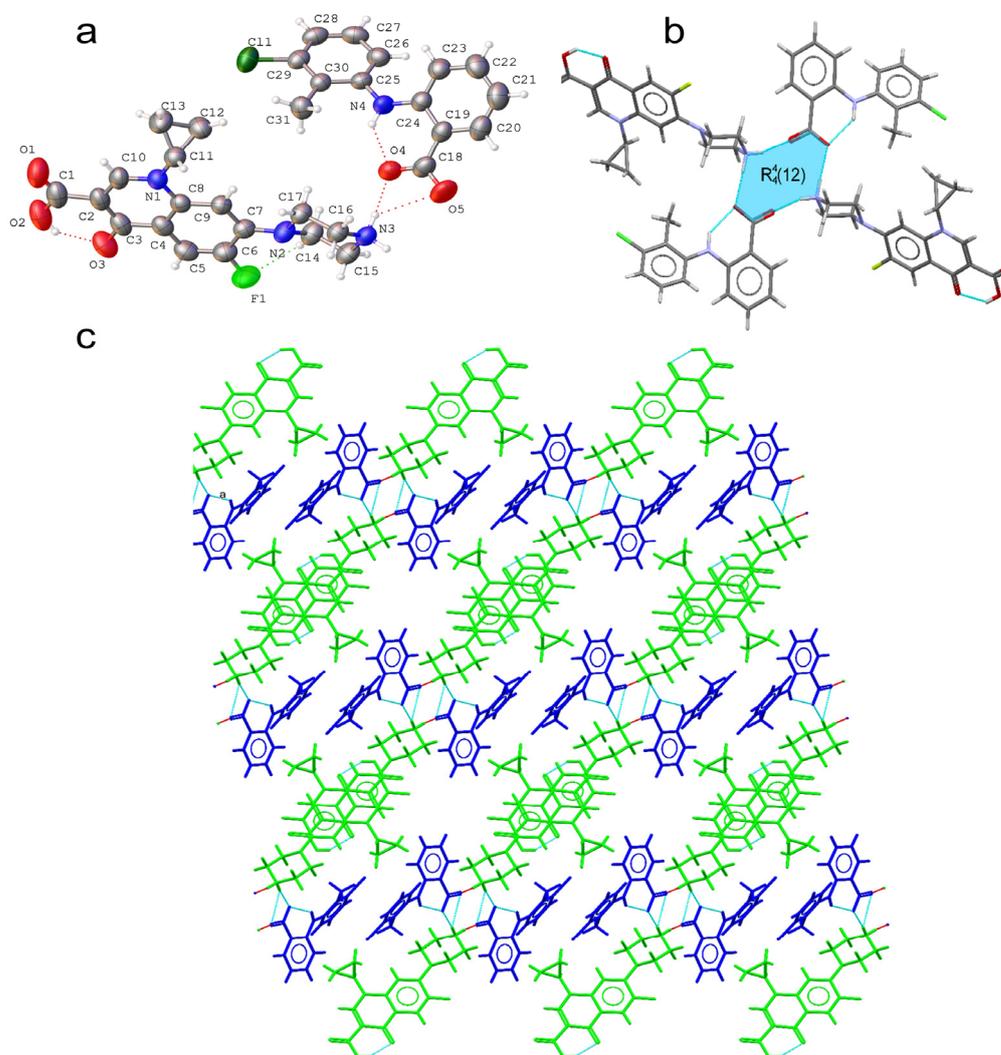


Figura 4.2.6. (a) Unidad asimétrica de CIP-TLF. (b) Formación tetramérica en CIP-TLF. (c) Vista detallada del empaquetamiento de los cationes de CIP⁺ (verde) y los aniones de TLF⁻ (azul) en CIP-TLF.

4.2.3.2.4. CIP–SLD

La sal molecular CIP–SLD cristaliza en el sistema monoclinico con el grupo espacial $P2_1/n$. La unidad asimétrica de CIP–SLD contiene un catión de CIP^+ y un anión de SLD^- (**Figura 4.2.7a**). A diferencia de las otras estructuras descritas, CIP–SLD no forma unidades tetraméricas ni columnas apiladas de CIP^+ ya que la asociación entre CIP^+ y SLD^- mediante enlaces de hidrógeno, genera una estructura en forma de cinta, con iones de CIP^+ y SLD^- ubicados en ambos extremos (**Figura 4.2.7b**). Estas estructuras se refuerzan mediante interacciones $CH\cdots O$ que se dan entre las moléculas de CIP^+ . Finalmente, la estructura supramolecular tridimensional se forma mediante la unión de cintas, gracias a interacciones $C-H\cdots \pi$ que involucran el anillo de piperazina protonado de CIP^+ y el anillo aromático de SLD^- (**Figura 4.2.7c**).

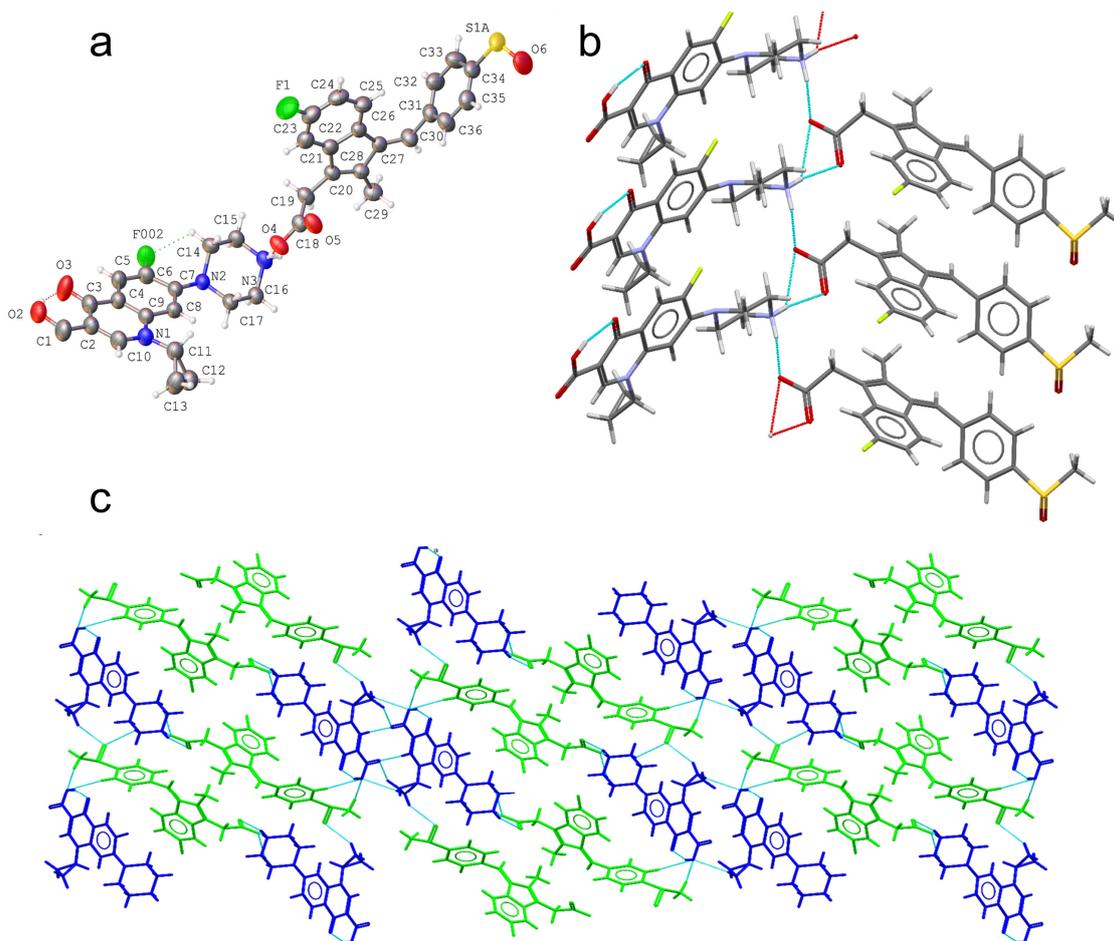


Figura 4.2.7. (a) Unidad asimétrica de CIP–SLD. (b) Formación en cinta de la estructura de CIP–SLD. (c) Vista detallada del empaquetamiento de los cationes de CIP^+ (verde) y los aniones de SLD^- (azul) en CIP–TLF.

4.2.3.2.5. CIP–DIC

CIP–DIC cristaliza en el sistema triclinico con grupo espacial P-1, cuya unidad asimétrica contiene un catión de CIP⁺, un anión de DIC⁻ y una molécula neutra de DIC (relación estequiométrica 1:2) lo que da lugar a un cocrystal de una sal también denominado cocrystal iónico³³⁸ (**Figura 4.2.8a**). En este cocrystal iónico se observa una estructura tetramérica como en los demás casos, pero con la presencia de dos moléculas neutras adicionales de DIC, que se asocian mediante enlaces de hidrógeno con el anión DIC⁻, a su vez asociado con CIP⁺ (**Figura 4.2.8b**). Esta nueva unidad supramolecular se ve reforzada por interacciones C-H··· π y C-H···O(carbonilo) entre el anillo ciclopropilo de CIP⁺ y DIC⁻. Como ya se describió para las sales de CIP–fenamato, los iones de CIP⁺ se asocian entre sí mediante interacciones π ··· π para generar columnas infinitas. La estructura supramolecular tridimensional se produce en forma de rejilla, en la que los iones de CIP⁺ y DIC⁻ construyen la red y las moléculas neutras de DIC se disponen en los huecos (**Figura 4.2.8c**).

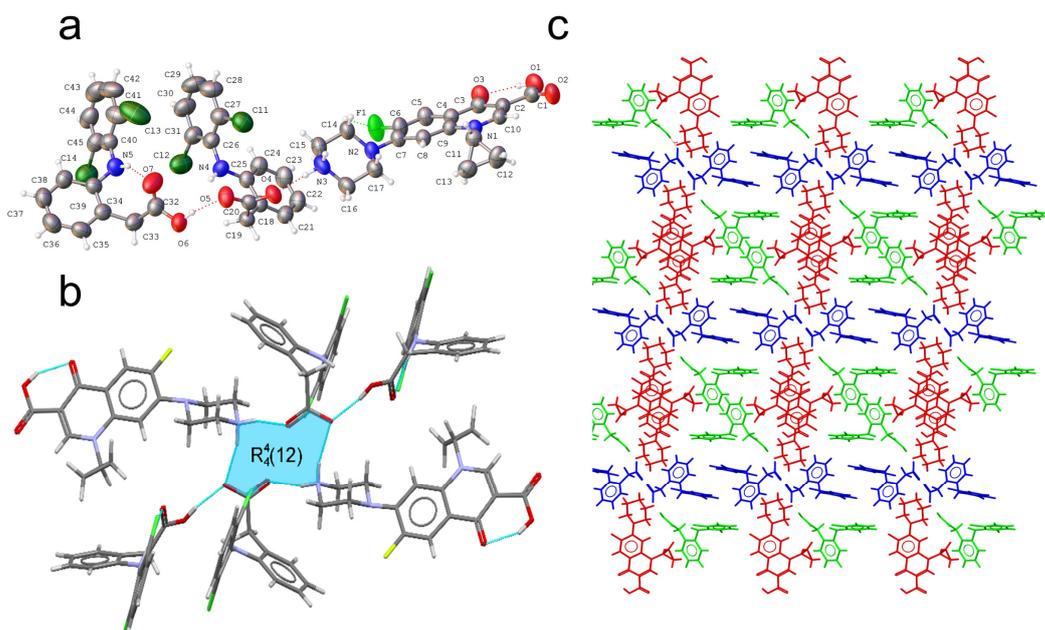


Figura 4.2.8. (a) Unidad asimétrica de CIP–DIC. (b) Estructura tetramérica de CIP–DIC, reforzada por dos moléculas neutras de DIC. (c) Vista detallada del empaquetamiento en forma de rejilla de CIP–DIC, los cationes de CIP⁺ (rojo) y los aniones de DIC⁻ (azul) y las moléculas neutras de DIC (verde).

4.2.3.2.6. CIP–KET

CIP–KET cristaliza en el sistema triclinico, grupo espacial P-1. La unidad asimétrica de CIP–KET contiene un catión de CIP⁺ y un anión de KET⁻ (**Figura 4.2.9a**). Aunque los enlaces de hidrógeno producen la formación de unidades tetraméricas, no se produce la formación de columnas de iones CIP⁺, ya que estos se asocian en pares a través de interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ (**Figura 4.2.9b,c**). Los aniones de KET⁻ interrumpen la formación de las columnas apiladas, ocupando el espacio entre los pares de CIP⁺. Las interacciones C–H \cdots O (carbonilo) que involucran pares de CIP–CIP y KET–KET refuerzan la estructura tridimensional (**Figura 4.2.9d**).

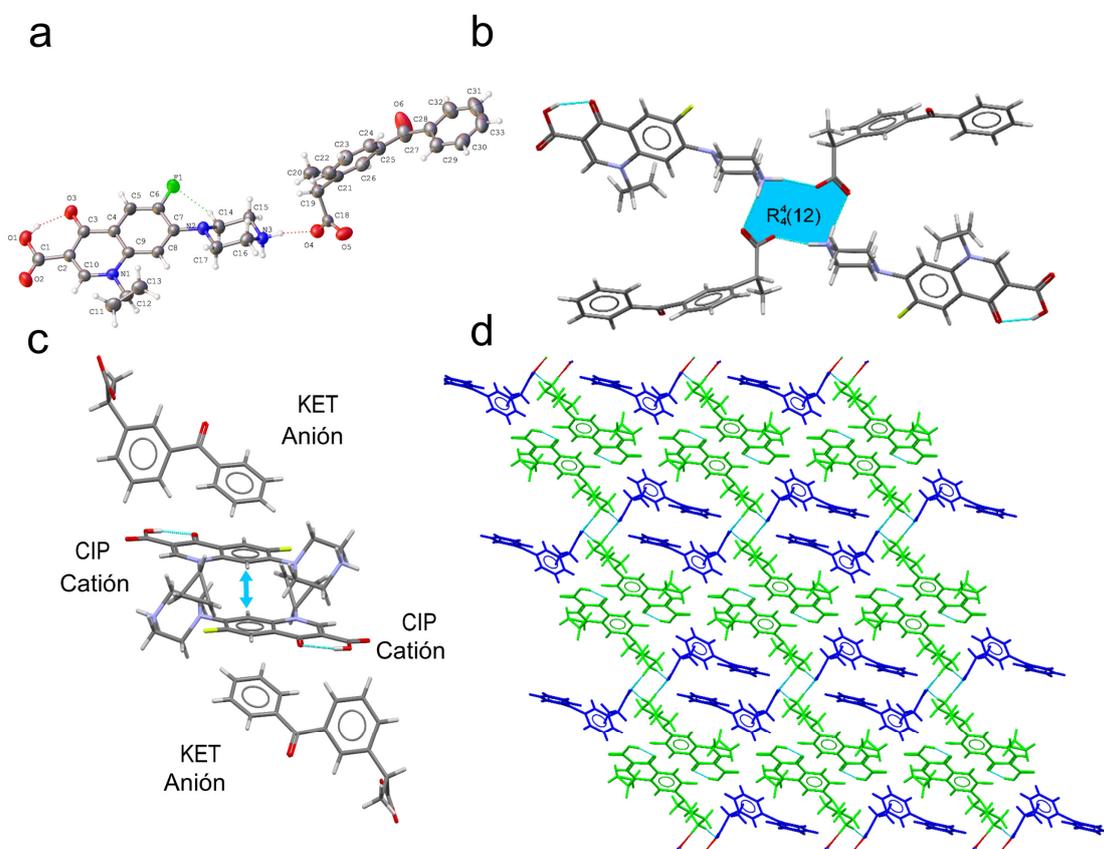


Figura 4.2.9. (a) Unidad asimétrica de CIP–KET. (b) Estructura tetramérica de CIP–KET. (c) Disrupción de las cadenas infinitas de CIP por la intercalación de aniones de KET⁻. (d) Vista detallada del empaquetamiento CIP–KET, los cationes de CIP⁺ (verde) y los aniones de KET⁻ (azul).

4.2.3.2.7. CIP-DKT

Por último, CIP-DKT cristaliza en el sistema triclinico con el grupo espacial P-1. La unidad asimétrica se compone de dos pares independientes de cationes de CIP⁺ y aniones de DKT⁻ dando una relación estequiométrica 2:2 (**Figura 4.2.9a**). Por este motivo, los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de CIP y DKT da lugar a la formación de dos estructuras tetraméricas centrosimétricas conectadas por fuerzas de apilamiento $\pi \cdots \pi$ entre los grupos quinolona de los pares de CIP (**Figura 4.2.10b**). Estos pares se rodean por iones de DKT⁻, evitando la formación de columnas apiladas (**Figura 4.2.10c**). Interacciones adicionales C-H \cdots O(carbonilo) entre pares de CIP-CIP y DKT-DKT contribuyen a la cohesión de la estructura cristalina tridimensional.

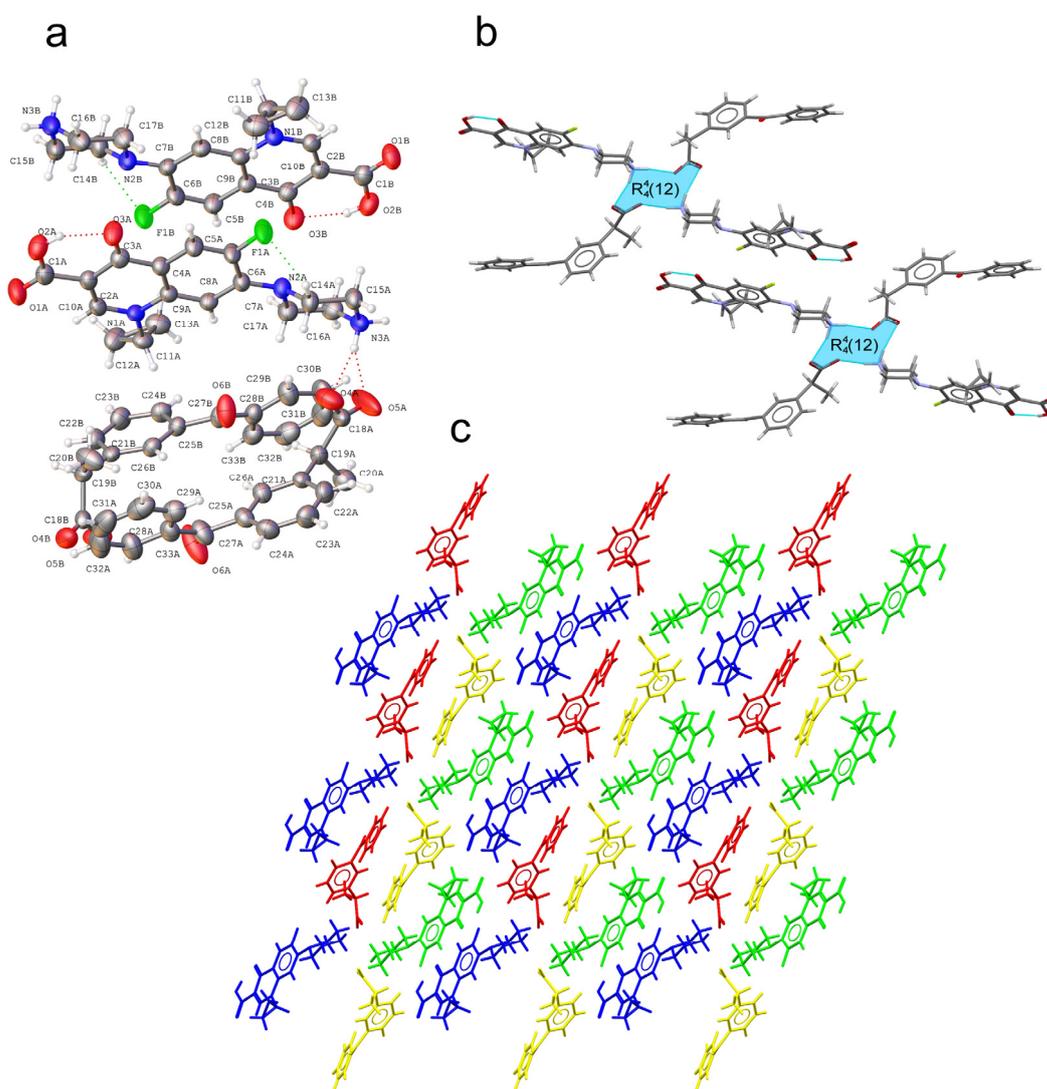


Figura 4.2.10. (a) Unidad asimétrica de CIP-DKT. (b) Estructura doble tetramérica de CIP-DKT. (c) Vista detallada del empaquetamiento CIP-DKT, los cationes de CIP⁺ (verde y azul) y los aniones de DKT⁻ (amarillo y rojo).

Tabla 4.2.2. Datos cristalográficos de las sales de CIP–AINEs.

Compuesto	CIP–MEF	CIP–MEF·H ₂ O	CIP–TLF	CIP–SLD	CIP–DIC	CIP–KET	CIP–DKT
Fórmula	C ₃₂ H ₃₃ FN ₄ O ₅	C ₃₂ H ₃₅ FN ₄ O ₆	C ₃₁ H ₃₀ ClFN ₄ O ₅	C ₃₇ H ₃₅ F ₂ N ₃ O ₆ S	C ₄₅ H ₄₀ Cl ₄ FN ₅ O ₇	C ₃₃ H ₃₂ FN ₃ O ₆	C ₃₃ H ₃₂ FN ₃ O ₆
Peso molecular	572.62	590.64	593.04	687.74	923.62	585.61	585.61
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Triclínico
Grupo espacial	P-1	P-1	P-1	P2 ₁ /n	P-1	P-1	P-1
a/Å	7.0100(3)	7.35750(10)	7.3321(12)	13.2001(12)	7.6759(4)	8.1012(8)	8.2206(2)
b/Å	14.2507(6)	13.7396(2)	13.685(3)	5.5503(5)	15.7770(8)	13.7214(11)	13.6705(4)
c/Å	15.7609(6)	15.4988(3)	15.653(3)	44.790(5)	18.9103(9)	14.0550(13)	13.8361(4)
α/°	70.117(3)	78.3990(10)	78.895(13)	90	95.174(3)	72.384(4)	105.3040(10)
β/°	77.493(3)	82.6850(10)	82.640(14)	93.030(4)	98.141(3)	88.519(5)	106.9440(10)
γ/°	78.337(3)	76.2090(10)	76.679(13)	90	101.593(2)	73.552(5)	91.7470(10)
V/Å³	1431.25(11)	1485.31(4)	1494.0(5)	3276.9(5)	2204.08(19)	1425.1(2)	1424.90(7)
Z	2	2	2	4	2	2	2
Dc/g cm⁻³	1.329	1.321	1.318	1.394	1.39	1.365	1.365
F(000)	604	624	620	1440	956	616	616
Reflexiones tomadas	19699	22333	25965	30549	38733	20166	36525
Reflexiones únicas	5015	4916	5274	5780	7748	4949	9527
Datos / restricciones / parámetros	5015 / 0 / 383	4916 / 0 / 386	5274 / 0 / 382	5780 / 0 / 455	7748 / 0 / 562	4949 / 0 / 390	9527 / 3 / 779
Ajuste del parámetro F²	0.982	1.095	1.068	0.948	1.063	1.023	1.055
R₁ (I > 2σ(I))	0.0583	0.0593	0.0730	0.0600	0.053	0.0495	0.0504
wR₂ (I > 2σ(I))	0.1439	0.1847	0.2424	0.1254	0.1522	0.1296	0.1355

Tabla 4.2.3. Enlaces de hidrógeno presentes en las sales de CIP–AINEs.

CIP—MEF	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	O(2)-H(2)···O(3)	0.82	1.76	2.528(3)	154.3
	N(3)-H(3A)···O(5) ^{#1}	0.89	1.85	2.710(3)	162.0
	N(3)-H(3B)···O(4)	0.89	1.82	2.631(3)	149.8
	C(14)-H(14B)···F(1)	0.97	2.21	2.855(4)	123.2
	N(4)-H(4)···O(5)	0.86	1.93	2.627(3)	137.6
	Operaciones de simetría: #1 -x+2,-y,-z+1				
CIP—MEF·H ₂ O	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	C(14)-H(14A)···F(1)	0.97	2.21	2.870(3)	124.3
	N(3)-H(3A)···O(4)	0.89	1.80	2.682(2)	171.2
	N(3)-H(3A)···O(5)	0.89	2.60	3.172(3)	122.8
	N(3)-H(3B)···O(5) ^{#1}	0.89	1.84	2.680(2)	156.4
	O(2)-H(2)···O(3)	0.82	1.77	2.533(3)	153.8
	N(4)-H(4)···O(4)	0.86	1.93	2.608(2)	134.8
	Operaciones de simetría: #1 -x,-y+1,-z				
CIP—TLF	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(4)-H(4)···O(4)	0.86	1.93	2.599(4)	133.6
	O(2)-H(2)···O(3)	0.82	1.81	2.523(5)	145.1
	N(3)-H(3A)···O(5) ^{#1}	0.89	1.82	2.659(4)	156.4
	N(3)-H(3B)···O(4)	0.89	1.81	2.690(4)	172.3
	N(3)-H(3B)···O(5)	0.89	2.60	3.182(5)	124.0
	C(14)-H(14B)···F(1)	0.97	2.23	2.880(6)	123.6
	Operaciones de simetría: #1 -x,-y,-z+1				
CIP—SLD	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	O(2)-H(2)···O(3)	0.82	1.75	2.506(4)	153.3
	N(3)-H(3A)···O(4) ^{#1}	0.89	2.44	3.078(4)	129.0
	N(3)-H(3A)···O(5) ^{#1}	0.89	1.90	2.746(4)	158.9
	N(3)-H(3B)···O(4)	0.89	1.77	2.652(4)	169.1
	C(14)-H(14B)···F(002)	0.97	2.27	2.910(4)	122.4
	Operaciones de simetría: #1 x,y+1,z				

Tabla 4.2.3 (cont.). Enlaces de hidrógeno presentes en las sales de CIP–AINEs.

CIP–DIC	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	O(6)-H(6)···O(5)	0.82	1.80	2.605(3)	166.3
	N(5)-H(5A)···O(7)	0.86	2.23	3.026(4)	154.4
	O(1)-H(1)···O(3)	0.82	1.83	2.588(3)	152.9
	N(3)-H(3A)···O(4)	0.89	1.85	2.723(3)	166.2
	N(3)-H(3B)···O(4) ^{#1}	0.89	2.40	3.094(3)	135.5
	N(3)-H(3B)···O(5) ^{#1}	0.89	2.01	2.876(3)	165.1
	C(14)-H(14A)···F(1)	0.97	2.36	2.984(4)	121.2
	Operaciones de simetría: #1 -x+1,-y+1,-z+1				
CIP–KET	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	O(1)-H(1)···O(3)	0.82	1.75	2.5200(19)	154.8
	N(3)-H(3A)···O(4) ^{#1}	0.89	2.39	2.949(2)	121.4
	N(3)-H(3A)···O(5) ^{#1}	0.89	1.88	2.769(2)	175.4
	N(3)-H(3B)···O(4)	0.89	1.82	2.693(2)	166.7
	C(14)-H(14A)···F(1)	0.97	2.26	2.906(2)	123.5
	Operaciones de simetría: #1 -x+1,-y+1,-z				
CIP–DKT	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	O(2A)-H(2A)···O(3A)	0.82	1.77	2.526(4)	153.0
	N(3A)-H(3AA)···O(4B) ^{#1}	0.89	1.82	2.681(5)	162.0
	N(3A)-H(3AB)···O(4A)	0.89	1.93	2.797(5)	165.7
	N(3A)-H(3AB)···O(5A)	0.89	2.27	2.904(6)	128.0
	C(14A)-H(14B)···F(1A)	0.97	2.25	2.901(5)	123.7
	O(2B)-H(2B)···O(3B)	0.82	1.75	2.519(4)	154.4
	N(3B)-H(3BA)···O(4B) ^{#2}	0.89	2.24	2.880(6)	128.6
	N(3B)-H(3BA)···O(5B) ^{#2}	0.89	2.04	2.922(6)	168.7
	N(3B)-H(3BB)···O(5A) ^{#3}	0.89	1.76	2.623(6)	162.9
	C(14B)-H(14C)···F(1B)	0.97	2.26	2.912(6)	123.3
	Operaciones de simetría: #1 x+1,y,z+1 #2 x,y+1,z+1 #3 x-1,y+1,z				

4.2.3.3. Estudio de las propiedades de las sales moleculares

4.2.3.3.1. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica se refiere a la capacidad de una fase para mantener su integridad frente a cambios de temperatura por debajo del punto de fusión. Para el estudio de esta capacidad se ha realizado un análisis simultáneo de DSC y TGA. La **figura 4.2.11** muestra las gráficas de DSC obtenidas para cada muestra. En ella se observa un único evento endotérmico principal, que se corresponde con el punto de fusión de las sales. En todos los casos el punto de fusión se encuentra en un valor intermedio al punto de fusión de los componentes, un comportamiento habitual en este tipo de materiales.³¹⁴ Además, se aprecia una correlación positiva entre el punto de fusión de la molécula de AINE y su fase correspondiente. De este modo, los puntos de fusión de los componentes disminuyen en el orden: CIP (256 °C) > MEF (230 °C) > TLF (207 °C) > SLD (183 °C) > DIC (156–158 °C) > KET (94 °C) > DKT (75 °C) mientras que las sales siguen el mismo orden: CIP–MEF (246 °C) > CIP–TLF (230 °C) > CIP–SLD (226 °C) > CIP–DIC (214 °C) > CIP–KET (191 °C) > CIP–DKT (184 °C). Se debe resaltar la gran mejora de estabilidad térmica de KET (94 °C) y DKT (75 °C), cuyas sales presentan un punto de fusión de 191 y 184 °C respectivamente. La ausencia de otras señales en el estudio, también confirma la pureza de la fase en polvo, corroborando los datos de PXRD.

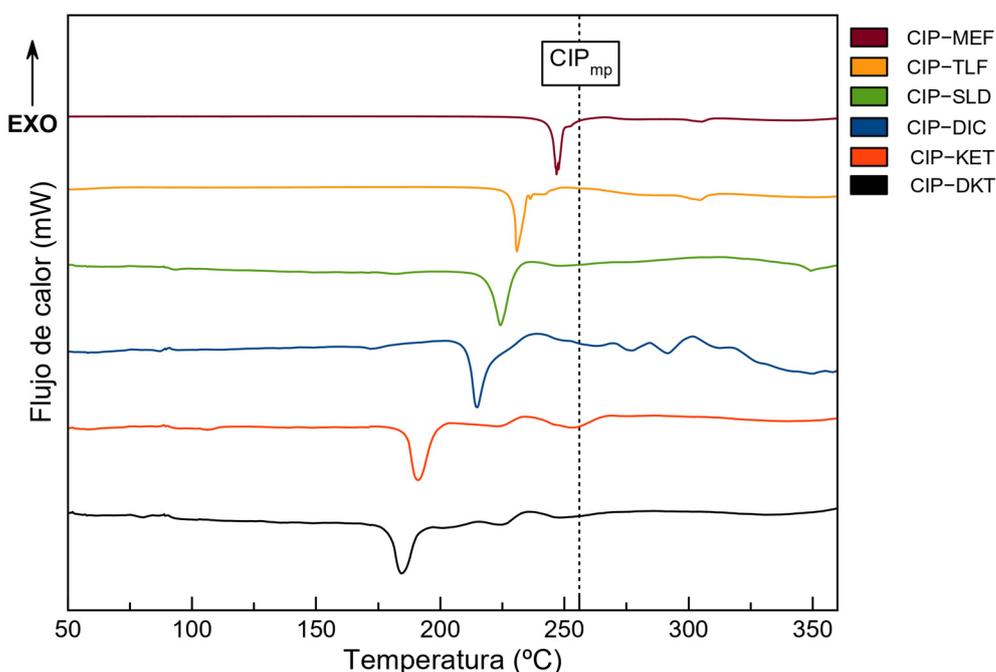


Figura 4.2.11. Curvas de DSC de las sales obtenidas. La línea punteada corresponde al punto de fusión de CIP.

Por su parte, los análisis de TGA confirman la integridad de todas las sales ya que, por debajo del punto de fusión, no se produce ninguna pérdida de peso asociada a fenómenos de descomposición. Sólo en el caso de la sal CIP-MEF·H₂O se observa una pérdida de peso inicial del 1.327 %, correspondiente a la deshidratación y la pérdida de 0.43 moléculas de H₂O (**Figura 4.2.12**).

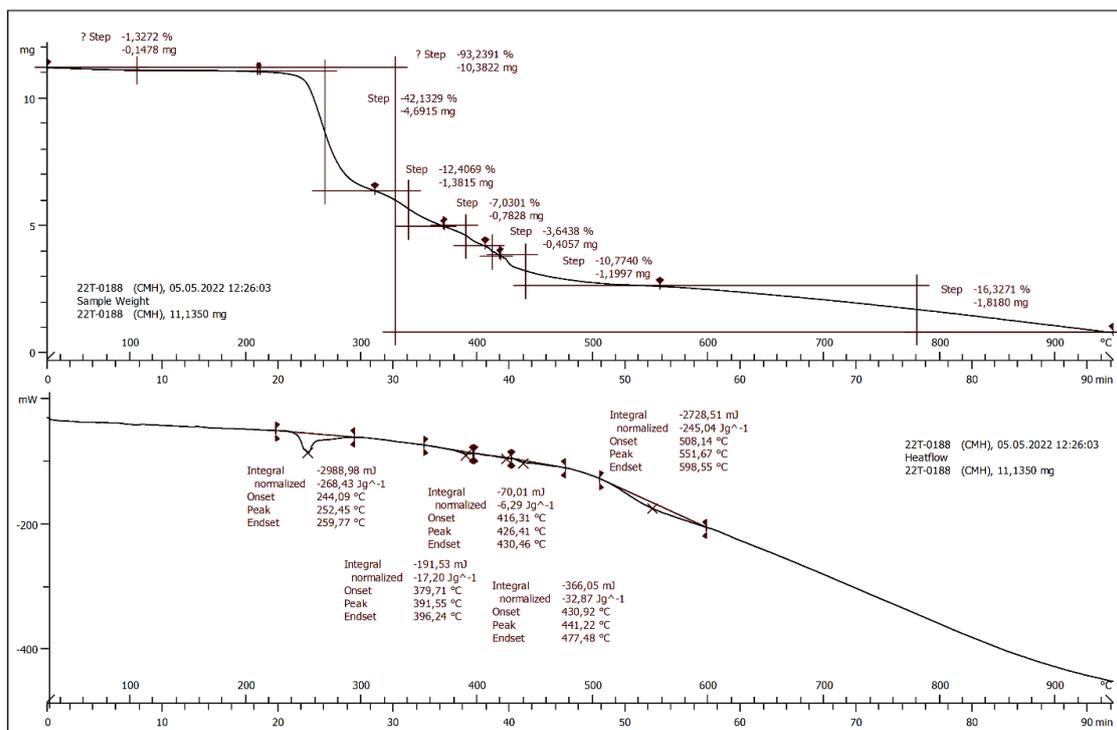


Figura 4.2.12. Análisis TGA-DSC de la sal hidratada CIP-MEF·H₂O

4.2.3.3.2. Estudio de estabilidad termodinámica

La estabilidad de las sales se ha estudiado en condiciones de envejecimiento acelerado y en suspensión acuosa, para evaluar procesos de disociación, hidratación o transición a polimorfos. En primer lugar, se han realizado experimentos en atmósfera de alta humedad relativa y temperatura (75% HR y 40 °C). Los difractogramas de PXRD obtenidos tras 2 meses de estudio se muestran en la **figura 4.2.13**. Bajo estas condiciones, no se observan transformaciones ni cambios en el grado de la cristalinidad de las sales, lo que indica la integridad de las mismas.

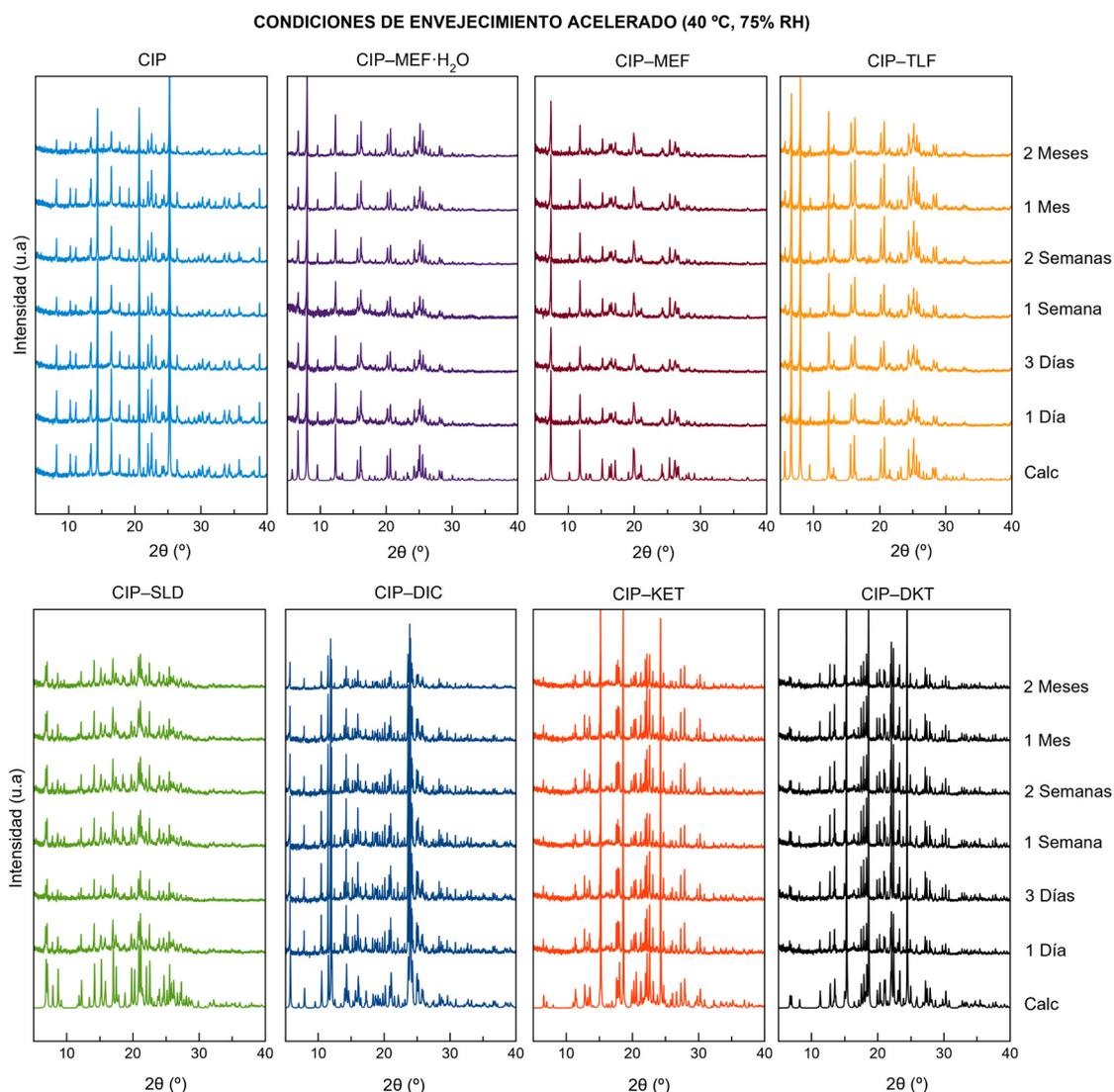


Figura 4.2.13. Difractogramas PXRD de las sales de CIP en condiciones de envejecimiento acelerado.

En segundo lugar, se han realizado experimentos de *slurry* agitando un exceso de muestra en agua miliQ a 25 °C. La **figura 4.2.14** muestra los difractogramas de PXRD para el sólido, filtrado y secado al aire, después 24 horas de agitación. Estos datos, muestran la transformación de CIP en una fase termodinámicamente más estable. Aunque no se ha conseguido determinar la estructura cristalina de esta nueva fase, la gran cantidad de hidratos de CIP reportados en la bibliografía, demuestran la tendencia de esta molécula a la hidratación, por lo que hay una alta probabilidad de que la fase de CIP obtenida sea un hidrato.^{339,340} También se observa la transformación de CIP-SLD y CIP-MEF·H₂O a fases termodinámicamente más estables. CIP-SLD se transforma en una fase desconocida, ya que, al igual que en CIP no se han podido obtener cristales para su

determinación estructural. Sin embargo, la sal hidratada CIP-MEF·H₂O se transforma en la sal anhidra CIP-MEF. Este comportamiento, aunque parezca contradictorio, ya que la fase hidratada se presupone estable en solución acuosa, puede ser una consecuencia de los canales observados en la estructura cristalina de CIP-MEF·H₂O, que explican la facilidad para evacuar las moléculas de H₂O sin alterar la estructura cristalina general (datos consistentes con los resultados del análisis de TGA expuestos en el apartado anterior).

Por otro lado, el resto de sales obtenidas en este capítulo (CIP-MEF, CIP-TLF, CIP-DIC, CIP-KET y CIP-DKT) permanecen termodinámicamente estables, presentando una ventaja farmacéutica en términos de estabilidad acuosa frente a CIP.

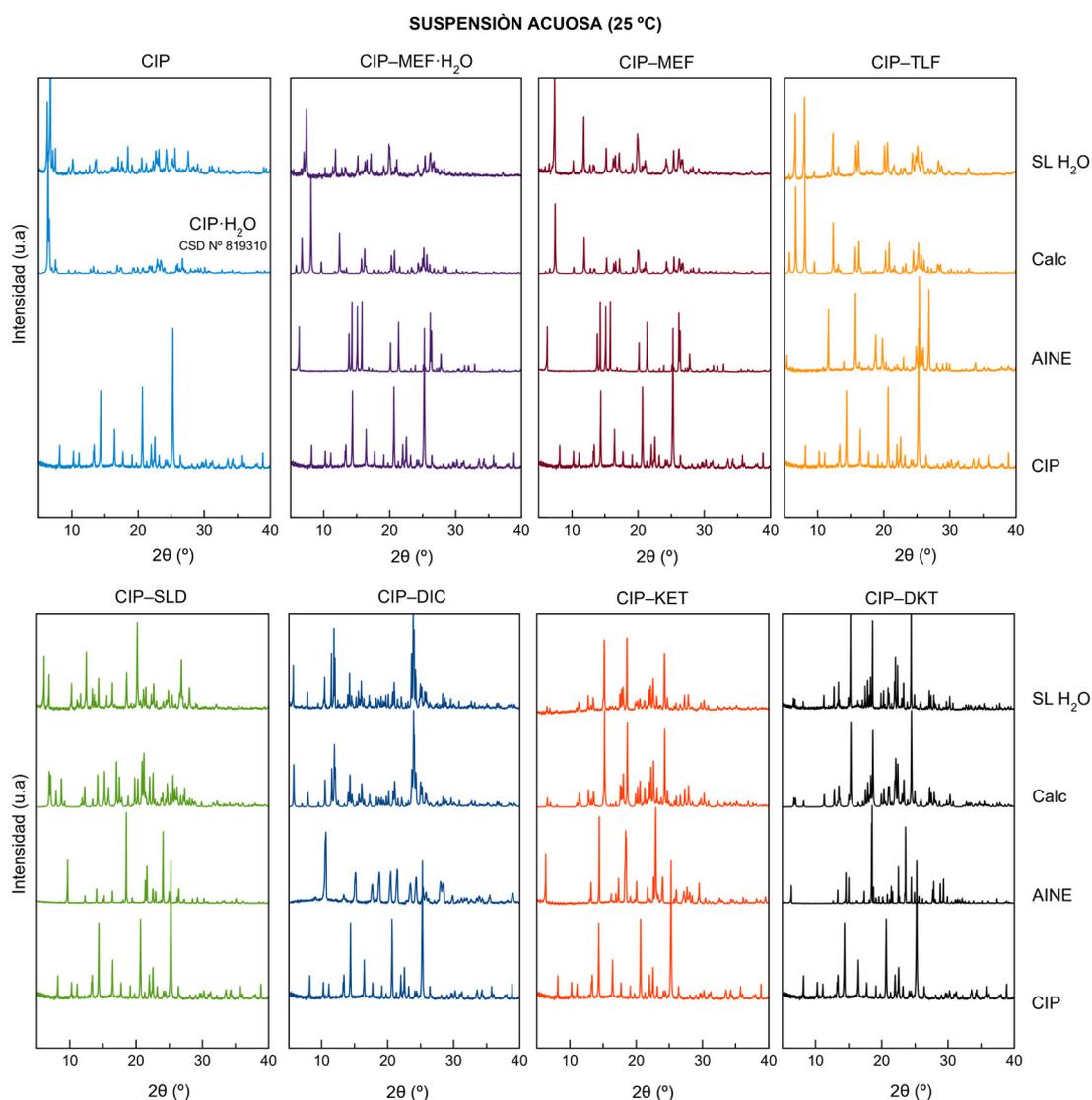


Figura 4.2.14. Difractogramas PXRD de las muestras después de 24 horas en suspensión acuosa.

4.2.3.3.3. Estudio de solubilidad

El carácter zwitteriónico de CIP provoca que su solubilidad dependa en gran medida del pH, por lo que el estudio de solubilidad debe realizarse en valores de pH farmacéuticamente relevantes para la administración oral, es decir, pH 1.2 y 6.8 para los ambientes gástrico e intestinal, respectivamente. Desafortunadamente, debido a su inestabilidad en solución, no se ha podido evaluar la solubilidad de CIP–SLD y CIP–MEF·H₂O. Por otro lado, el solapamiento de los espectros de absorción UV-Vis de los APIs no permite el uso de la espectrofotometría UV-Vis convencional para evaluar la solubilidad, sino que es necesario el uso de HPLC-UV-Vis para separar los componentes en solución y cuantificar la concentración de CIP. La mejora de la solubilidad de los AINEs también se ha evaluado mediante la normalización de los datos obtenidos para CIP, utilizando la estequiometría, y el peso molecular de las sales y los componentes. Cabe señalar que este procedimiento solo se puede aplicar a fases estables en las que se mantenga la estequiometría CIP:AINE.

Los valores de solubilidad para CIP a pH 6.8 obtenidos en este estudio son consistentes con otros valores reportados, confirmando así la validez del método.³¹⁹ La **tabla 4.2.4** recoge los valores de solubilidad en equilibrio obtenidos para CIP y las respectivas sales. A pH 6.8, CIP–DKT, CIP–KET y CIP–MEF permiten mejorar la solubilidad de CIP, hasta 5.5 veces en el caso de CIP–DKT, mientras que las sales CIP–TLF y CIP–DIC no muestran mejoras en la solubilidad con respecto a CIP. Es interesante, que aquellas sales que producen la disrupción de las cadenas infinitas de CIP en la estructura cristalina (CIP–DKT y CIP–KET) son aquellas que presentan una mayor solubilidad. Además, podemos observar una relación inversamente proporcional entre la solubilidad y el punto de fusión del AINE, un comportamiento habitual en este tipo de materiales.^{319,341} Con respecto a los AINEs, la mejora en la solubilidad también es sustancial, sobretodo en el caso de CIP–DIC, cuya solubilidad es 20.8 veces superior a DIC a pH 6.8. En este caso, la mejora de solubilidad se atribuye a la disrupción de los dímeros AINE–AINE fuertemente cohesionados en las estructuras nativas.

Tabla 4.2.4. Valores de solubilidad de las fases de CIP comparados con sus componentes.

Muestra	Solubilidad CIP pH 6.8 (mg/mL)	Solubilidad CIP pH 1.2 (mg/mL)	Mejora de solubilidad CIP/AINEs pH 6.8	Solubilidad reportada de los AINEs (mg/mL)	Refs
CIP—DKT	0.465	9.980	5.5x/-	No reportado	
CIP—KET	0.207	9.533	2.4x/0.8x	< 0.2	[³⁴²⁻³⁴⁵]
CIP—MEF	0.140	1.182	1.7x/2x	< 0.05	[^{329,346}]
CIP—TLF	0.047	6.567	0.6x/0.74x	< 0.05	[³²⁹]
CIP—DIC	0.035	5.946	0.4x/20.8x	< 0.003	[^{344,347-349}]
CIP	0.084	14.671		0.08	[³⁵⁰]

Como se esperaba, debido a su naturaleza zwitteriónica, la solubilidad de CIP aumenta significativamente a pH 1.2.³⁵¹ En este pH, la solubilidad de las sales es mucho mayor que a pH 6.8, pero menor cuando se compara con CIP. Este comportamiento se debe a que la formación de sales, limita el carácter zwitteriónico de CIP, modulando su solubilidad, en este caso a la baja. Debido a la extrema insolubilidad de los AINEs a pH 1.2, no se han encontrado valores reportados que permitan una comparación exacta, aunque la estabilidad de las sales a pH 1.2, indica que la solubilidad del AINE es proporcional a la de CIP, por lo que la solubilidad del AINE en la sal se presupone mucho mayor que los APIs de referencia. Sin embargo, la absorción de los AINEs ocurre principalmente en el intestino delgado por lo que los resultados a pH 6.8 son más relevantes para fines farmacéuticos.

4.2.3.3.4. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las sales se ha evaluado utilizando microorganismos de relevancia médica como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 9144) y *Escherichia coli* (*E. coli*, CECT 101). La **figura 4.2.15** y la **tabla 4.2.4** recogen los resultados de este experimento en el que se usan 2.5 µg de cada compuesto. CIP, como era de esperar, inhibe la proliferación bacteriana en ambos casos, pero demuestra una mayor actividad contra las bacterias *Gram-negativas* (*E. coli*) que contra las bacterias *Gram-positivas* (*S. aureus*). Por su parte, las sales muestran una actividad antibacteriana similar a la de CIP, ya que los halos de inhibición son similares. Sin embargo, mientras que CIP requiere 2.5 µg para ejercer tal inhibición, la concentración de CIP en las sales se reduce proporcionalmente a la contribución del CIP en el peso molecular de la sal. Por ejemplo, la sal CIP—DKT es capaz de exhibir el mismo efecto inhibitorio que CIP (2.5

µg), pero utilizando solo 1.41 µg de CIP. La contribución de CIP en cada sal se calcula en base al peso molecular tal y como se expone en la **tabla 4.2.5**. En este contexto, debe destacarse el caso de CIP–DIC, cuya estequiometría 1:2 provoca que el contenido de CIP sea aproximadamente tres veces menor que CIP en el control, pero sigue ejerciendo un efecto inhibitorio muy elevado.

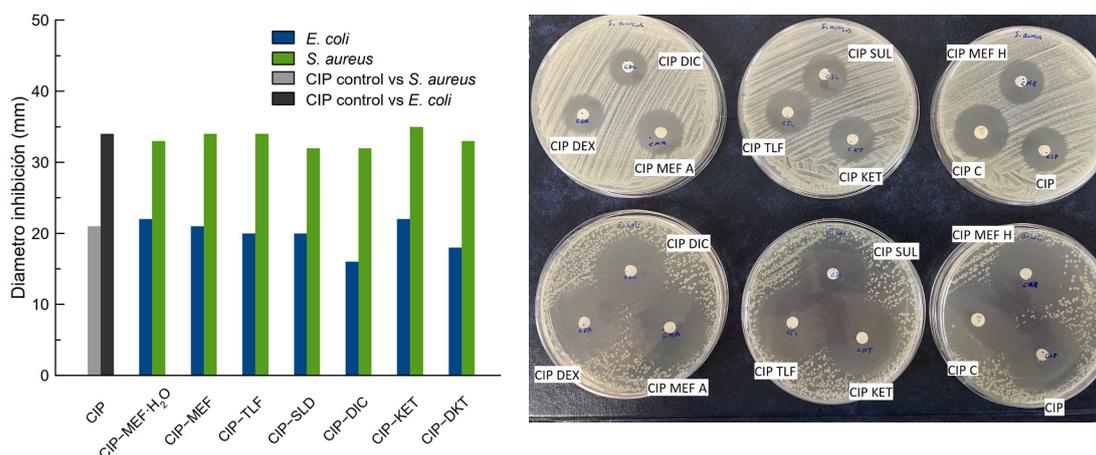


Figura 4.2.15. Experimentos de actividad antibacteriana frente *E. coli* (placas de agar superiores) y *S. aureus* (placas de agar inferiores).

Estos resultados confirman que la formación de sales con AINE no solo mantiene la actividad antibacteriana de CIP intacta, sino que también reduce la cantidad de CIP necesaria para lograr el mismo efecto inhibitorio como resultado de la mejora en la solubilidad de las sales, lo que se traduce en una mejor difusión en el cultivo.

Tabla 4.2.5. Pesos moleculares de las sales, así como los halos de inhibición frente frente *S. aureus* y *E. coli*.

Muestra	Masa molecular	% CIP en la sal	µg de CIP en el experimento (2.5 µg total)	Zona de inhibición (mm)	
				<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
CIP	331.3		2.5	21.12 ± 0.41	33.91 ± 0.36
CIP–MEF·H ₂ O	590.6	0.56	1.40	22.07 ± 0.39	33.31 ± 0.49
CIP–MEF	572.6	0.58	1.45	21.20 ± 0.44	34.01 ± 0.36
CIP–TLF	593.1	0.56	1.40	19.98 ± 0.62	33.82 ± 0.37
CIP–SLD	687.8	0.47	1.17	20.03 ± 0.40	31.69 ± 0.60
CIP–DIC	923.6	0.36	0.90	16.34 ± 0.49	32.05 ± 0.53
CIP–KET	585.6	0.57	1.41	22.12 ± 0.53	35.19 ± 0.55
CIP–DKT	585.6	0.57	1.41	18.03 ± 0.42	32.72 ± 0.47

En resumen, la formación de sales multicomponente fármaco-fármaco ha permitido mejorar la solubilidad de CIP y los AINEs en diferentes pHs, la estabilidad térmica de los AINEs, e incluso mejorar la eficiencia antibiótica de CIP, reduciendo la dosis necesaria para conseguir un efecto inhibitorio similar al observado en la forma nativa de CIP. Los resultados de CIP-DKT, CIP-KET y CIP-DIC son los más prometedores, ya que muestran una solubilidad particularmente alta (5.5 veces mayor que CIP para CIP-DKT y 20.8 veces mayor que DIC para CIP-DIC), junto con una buena estabilidad térmica y termodinámica, tanto en suspensión acuosa como en condiciones de envejecimiento acelerado. Cabe destacar que una solubilidad mejorada se asocia a una mayor biodisponibilidad oral, lo que permite reducir la dosis de administración, reduciendo los posibles efectos secundarios (dosis-dependientes) de los APIs. Sin embargo, no se han obtenido tan prometedores resultados con CIP-SLD y CIP-MEF·H₂O, principalmente, debido a su baja estabilidad en suspensión acuosa. Este comportamiento se debe principalmente a la disposición de sus estructuras cristalinas. CIP-SLD presenta una estructura en forma de cinta, expuesta a la solución, lo que la lleva a ser más inestable. Por su parte, CIP-MEF·H₂O presenta una estructura muy similar a la sal anhidra, que promueve la deshidratación.

Los resultados obtenidos en este capítulo, han derivado en la **publicación N°4** de esta tesis doctoral **“Enhanced NSAIDs Solubility in Drug-Drug Formulations with Ciprofloxacin” (International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4), 3305).**

4.2.4. Referencias

- (315) Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 1995, 12 (3), 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.
- (316) Tehler, U.; Fagerberg, J. H.; Svensson, R.; Larhed, M.; Artursson, P.; Bergström, C. A. S. Optimizing Solubility and Permeability of a Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class 4 Antibiotic Drug Using Lipophilic Fragments Disturbing the Crystal Lattice. *J. Med. Chem.* 2013, 56 (6), 2690–2694. <https://doi.org/10.1021/jm301721e>.
- (317) Mesallati, H.; Mugheirbi, N. A.; Tajber, L. Two Faces of Ciprofloxacin: Investigation of Proton Transfer in Solid State Transformations. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (11), 6574–6585. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01283>.
- (318) Bag, P. P.; Ghosh, S.; Khan, H.; Devarapalli, R.; Malla Reddy, C. Drug-Drug Salt Forms of Ciprofloxacin with Diflunisal and Indoprofen. *CrystEngComm* 2014, 16 (32), 7393–7396. <https://doi.org/10.1039/c4ce00631c>.
- (319) Surov, A. O.; Manin, A. N.; Voronin, A. P.; Drozd, K. V.; Simagina, A. A.; Churakov, A. V.; Perlovich, G. L. Pharmaceutical Salts of Ciprofloxacin with Dicarboxylic Acids. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015, 77, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.004>.
- (320) Zhang, G.; Zhang, L.; Yang, D.; Zhang, N.; He, L.; Du, G.; Lu, Y. Salt Screening and Characterization of Ciprofloxacin. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 2016, 72 (1), 20–28. <https://doi.org/10.1107/S2052520615018582/AO5007SUP6.PDF>.
- (321) Surov, A. O.; Vasilev, N. A.; Voronin, A. P.; Churakov, A. V.; Emmerling, F.; Perlovich, G. L. Ciprofloxacin Salts with Benzoic Acid Derivatives: Structural Aspects, Solid-State Properties and Solubility Performance. *CrystEngComm* 2020, 22 (25), 4238–4249. <https://doi.org/10.1039/d0ce00514b>.
- (322) Thomas, L. H.; Klapwijk, A. R.; Wales, C.; Wilson, C. C. Intermolecular Hydrogen Transfer and Solubility Tuning in Multi-Component Molecular Crystals of the API Piroxicam. *CrystEngComm* 2014, 16 (26), 5924–5932. <https://doi.org/10.1039/c4ce00246f>.
- (323) Gopi, S. P.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R. A Drug-Drug Salt Hydrate of Norfloxacin and Sulfathiazole: Enhancement of in Vitro Biological Properties via Improved Physicochemical Properties. *Mol. Pharm.* 2016, 13 (10), 3590–3594. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00320>.
- (324) Verdugo-Escamilla, C.; Alarcón-Payer, C.; Acebedo-Martínez, F. J.; Domínguez-Martín, A.; Choquesillo-Lazarte, D. New Metformin–Citric Acid Pharmaceutical Molecular Salt: Improving Metformin Physicochemical Properties. *Crystals* 2022, 12 (12), 1748.

<https://doi.org/10.3390/cryst12121748>.

- (325) Settimo, L.; Bellman, K.; Knegetel, R. M. A. Comparison of the Accuracy of Experimental and Predicted PKa Values of Basic and Acidic Compounds. *Pharm. Res.* 2014, 31 (4), 1082–1095. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1232-z>.
- (326) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; MacIejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, Di.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46 (D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.
- (327) Yuvali, D.; Yilmaz, E.; Narin, İ. A New Liquid Phase Microextraction Method-Based Reverse Micelle for Analysis of Dexketoprofen in Human Plasma by HPLC-DAD. *J. Anal. Sci. Technol.* 2020, 11 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40543-020-00251-5>.
- (328) Pérez-Merino, L.; Casajuana, M. C.; Bernal, G.; Faba, J.; Astilleros, A. E.; González, R.; Giralt, M.; Romeu, M.; Nogués, M. R. Evaluation of the Effectiveness of Three Physiotherapeutic Treatments for Subacromial Impingement Syndrome: A Randomised Clinical Trial. *Physiother. (United Kingdom)* 2016, 102 (1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.physio.2015.01.010>.
- (329) Avdeef, A. Solubility of Sparingly-Soluble Ionizable Drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59 (7), 568–590. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.05.008>.
- (330) Pentikäinen, P. J.; Tokola, O.; Alhava, E.; Penttilä, A. Pharmacokinetics of Tolfenamic Acid: Disposition in Bile, Blood and Urine after Intravenous Administration to Man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 27 (3), 349–354. <https://doi.org/10.1007/BF00542174>.
- (331) Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Yu, B.; Zaslavsky, L.; Zhang, J.; Bolton, E. E. PubChem in 2021: New Data Content and Improved Web Interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49 (D1), D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA971>.
- (332) Tsume, Y.; Langguth, P.; Garcia-Arieta, A.; Amidon, G. L. In Silico Prediction of Drug Dissolution and Absorption with Variation in Intestinal PH for BCS Class II Weak Acid Drugs: Ibuprofen and Ketoprofen. *Biopharm. Drug Dispos.* 2012, 33 (7), 366–377. <https://doi.org/10.1002/bdd.1800>.
- (333) Fillet, M.; Bechet, I.; Piette, V.; Crommen, J. Separation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs by Capillary Electrophoresis Using Nonaqueous Electrolytes. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990701\)20:9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990701)20:9).
- (334) Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. Aquatic Environmental Assessment of the Top 25 English Prescription Pharmaceuticals. *Water Res.* 2002, 36 (20), 5013–5022. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00227-0).
- (335) Lemmens, G.; Brouwers, J.; Snoeys, J.; Augustijns, P.; Vanuytsel, T. Insight into the Colonic

- Disposition of Sulindac in Humans. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110 (1), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.09.034>.
- (336) ChemAxon. ChemAxon - Software Solutions and Services for Chemistry and Biology. MarvinSketch, Version 23.10.31. 2023.
- (337) Childs, S. L.; Stahly, G. P.; Park, A. The Salt-Cocrystal Continuum: The Influence of Crystal Structure on Ionization State. *Mol. Pharm.* 2007, 4 (3), 323–338. <https://doi.org/10.1021/MP0601345>.
- (338) Shunnar, A. F.; Dhokale, B.; Karothu, D. P.; Bowskill, D. H.; Sugden, I. J.; Hernandez, H. H.; Naumov, P.; Mohamed, S. Efficient Screening for Ternary Molecular Ionic Cocrystals Using a Complementary Mechanochemistry and Computational Structure Prediction Approach. *Chem. - A Eur. J.* 2020, 26 (21), 4752–4765. <https://doi.org/10.1002/chem.201904672>.
- (339) Fabbiani, F. P. A.; Arlin, J. B.; Buth, G.; Dittrich, B.; Florence, A. J.; Herbst-Irmer, R.; Sowa, H. Inter-Molecular Interactions, Disorder and Twinning in Ciprofloxacin-2,2-Difluoroethanol (2/3) and Ciprofloxacin-Water (3/14.5). *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 2011, 67 (3), o120–o124. <https://doi.org/10.1107/S0108270111005488>.
- (340) Fabbiani, F. P. A.; Dittrich, B.; Florence, A. J.; Gelbrich, T.; Hursthouse, M. B.; Kuhs, W. F.; Shankland, N.; Sowa, H. Crystal Structures with a Challenge: High-Pressure Crystallisation of Ciprofloxacin Sodium Salts and Their Recovery to Ambient Pressure. *CrystEngComm* 2009, 11 (7), 1396–1406. <https://doi.org/10.1039/b822987b>.
- (341) Anderson, B. D.; Conradi, R. A. Predictive Relationships in the Water Solubility of Salts of a Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74 (8), 815–820. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600740803>.
- (342) Devi, S.; Kumar, A.; Kapoor, A.; Verma, V.; Yadav, S.; Bhatia, M. Ketoprofen–FA Co-Crystal: In Vitro and In Vivo Investigation for the Solubility Enhancement of Drug by Design of Expert. *AAPS PharmSciTech* 2022, 23 (4), 1–15. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02253-5>.
- (343) Avdeef, A.; Berger, C. M.; Brownell, C. PH-Metric Solubility. 2: Correlation between the Acid-Base Titration and the Saturation Shake-Flask Solubility-PH Methods. *Pharm. Res.* 2000, 17 (1), 85–89. <https://doi.org/10.1023/A:1007526826979>.
- (344) Fini, A.; Fazio, G.; Feroci, G. Solubility and Solubilization Properties of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Int. J. Pharm.* 1995, 126 (1–2), 95–102. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04102-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04102-8).
- (345) Fitriani, L.; Firdaus, W. A.; Sidadang, W.; Rosaini, H.; Putra, O. D.; Oyama, H.; Uekusa, H.; Zaini, E. Improved Solubility and Dissolution Rate of Ketoprofen by the Formation of Multicomponent Crystals with Tromethamine. *Crystals* 2022, 12 (2), 275. <https://doi.org/10.3390/cryst12020275>.
- (346) Gao, L.; Zheng, W. Y.; Yang, W. L.; Zhang, X. R. Drug-Drug Salt Forms of Vortioxetine with

- Mefenamic Acid and Tolfenamic Acid. *J. Mol. Struct.* 2022, 1268, 133725.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133725>.
- (347) Herzfeldt, C. D.; Kümmel, R. Dissociation Constants, Solubilities and Dissolution Rates of Some Selected Nonsteroidal Antiinflammatories. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9 (5), 767–793.
<https://doi.org/10.3109/03639048309039887>.
- (348) Chiarini, A.; Tartarini, A.; Fini, A. PH-Solubility Relationship and Partition Coefficients for Some Anti-Inflammatory Arylaliphatic Acids. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 1984, 317 (3), 268–273.
<https://doi.org/10.1002/ardp.19843170314>.
- (349) Ledwidge, M. T.; Corrigan, O. I. Effects of Surface Active Characteristics and Solid State Forms on the PH Solubility Profiles of Drug-Salt Systems. *Int. J. Pharm.* 1998, 174 (1–2), 187–200.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00257-9).
- (350) Nugrahani, I.; Tjengal, B.; Gusdinar, T.; Horikawa, A.; Uekusa, H. A Comprehensive Study of a New 1.75 Hydrate of Ciprofloxacin Salicylate: SCXRD Structure Determination, Solid Characterization, Water Stability, Solubility, and Dissolution Study. *Crystals* 2020, 10 (5), 349.
<https://doi.org/10.3390/cryst10050349>.
- (351) Ràfols, C.; Fael, H.; Fuguet, E.; Outhwaite, B.; Lee, S.; Ruiz, R. Dissolution Rates of Ciprofloxacin and Its Cocrystal with Resorcinol. *ADMET DMPK* 2018, 6 (1), 61–70.
<https://doi.org/10.5599/admet.6.1.497>.

4.3. Sales moleculares de Metformina-AINEs: Un camino para mejorar la biodisponibilidad oral y la estabilidad

4.3.1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes se define como una enfermedad crónica y metabólica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre.³⁵² Según la OMS existen 422 millones de pacientes adultos diagnosticados con diabetes en todo el mundo, y este número aumenta a 537 millones según la Federación Internacional de Diabetes.³⁵³ Hay dos tipos de diabetes, la tipo I ocurre cuando el páncreas no produce insulina, y la diabetes tipo II, que aparece cuando el cuerpo se vuelve resistente a la insulina y, en la mayoría de los casos, se desarrolla en adultos. Sin embargo, la creciente obesidad en jóvenes, junto con la falta actividad física y mala alimentación, ha provocado el aumento de la aparición de diabetes tipo 2 en poblaciones jóvenes.³⁵⁴

La MTF es un agente antidiabético biguanida utilizado como tratamiento de primera línea contra la diabetes tipo 2 debido a su eficacia, perfil de seguridad y bajo costo para los pacientes.^{355,356} La MTF ejerce su acción antihiper-glucémica aumentando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos y reduciendo la gluconeogénesis hepática.³⁵⁷ Generalmente, la MTF se prescribe como clorhidrato de metformina (MTF·HCl), químicamente definida como una sal, con el fin de aumentar la solubilidad y la estabilidad.¹²⁵⁻¹²⁷ Aunque la solubilidad de MTF·HCl es excelente, la baja permeabilidad MTF conduce a la aparición de trastornos gastrointestinales en aproximadamente el 20–30% de los pacientes crónicos, debido a la acumulación del fármaco en el intestino delgado.^{358,359} La inestabilidad de la molécula de MTF en su forma libre es otro problema reportado por diferentes estudios. El perfil de inestabilidad y los productos de su degradación se detallan en la Farmacopea europea (9ª edición, 2016).^{360,361}

La prescripción de MTF junto con otros medicamentos antidiabéticos no es una práctica rara en la clínica, ya que, desafortunadamente, el control glucémico con MTF en la diabetes tipo 2 sigue siendo un desafío de gran complejidad que preocupa a los médicos e investigadores. A su vez, la MTF también suele combinarse con medicamentos como los AINEs.³⁶² Un ejemplo claro del uso combinado de estos fármacos se da en el tratamiento de la neuropatía diabética, una complicación grave de la diabetes en la que se ven afectados los nervios periféricos, produciendo dolor y entumecimiento en las extremidades. Aunque los AINEs no se consideran especialmente efectivos para tratar el dolor neuropático, a menos que haya inflamación,³⁶³ su uso masivo es una realidad

clínica, probablemente debido a 1) la falta de alternativas no opioides en el tratamiento del dolor leve-moderado, 2) el carácter de venta libre de varios AINEs y 3) su perfil de seguridad.

Aunque por lo general la MTF se considera segura, los tratamientos a largo plazo han reportado una afección grave, aunque rara, conocida como acidosis láctica, relacionada con insuficiencia renal aguda.^{364,365} A su vez, los AINEs son conocidos por su nefrotoxicidad,³⁶⁶ por lo que aquellos pacientes crónicos con tratamientos combinados de MTF y AINEs son más susceptibles de desarrollar deterioro renal.³⁶⁷

El objetivo de este capítulo se centra en explorar nuevas alternativas que puedan aumentar la biodisponibilidad oral de los fármacos mencionados mediante la formación de sales tipo fármaco-fármaco, así como reducir los efectos secundarios asociados con estas terapias combinadas. Con este fin, se han sintetizado cinco sales MTF-AINEs utilizando el ácido niflúmico (NIF), diflunisal (DIF), ácido mefenámico (MEF), ácido tolfenámico (TLF) y flurbiprofeno (FLF) como moléculas coformadoras (**Figura 4.3.1**). Además, se ha realizado un estudio de la estructura cristalina para poder racionalizar los cambios observados en la solubilidad y la estabilidad de las nuevas sales.

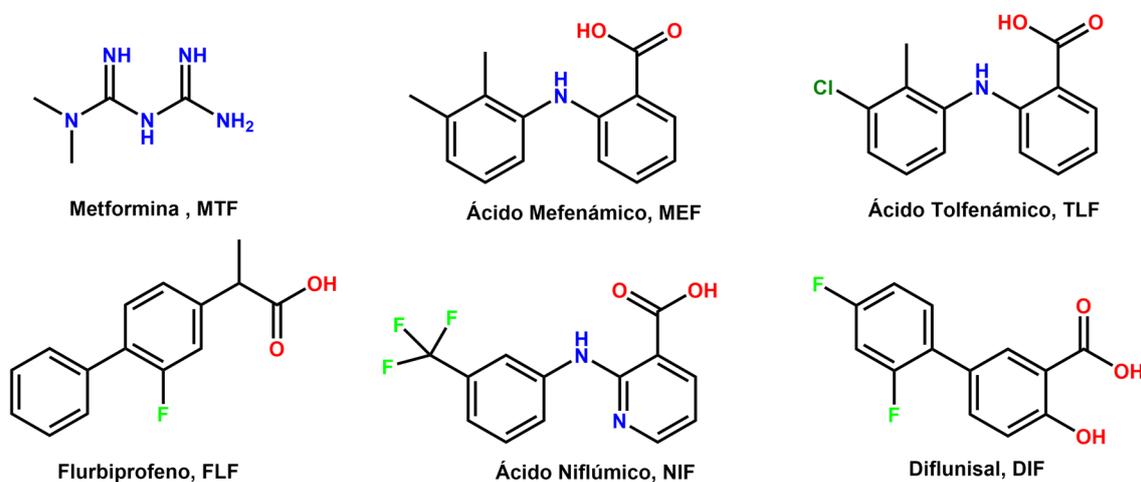


Figura 4.3.1. APIs utilizados para la obtención de sales tipo fármaco-fármaco de MTF.

4.3.2. Preparación de las sales de MTF–AINEs

4.3.2.1. Diseño de las sales moleculares

Una búsqueda bibliográfica de los diferentes sólidos cristalinos de MTF en la base de datos CSD (versión 5.43, actualización 4 de noviembre de 2022) ha dado como resultado 59 compuestos, 26 (44%) son sales moleculares de MTF, de las cuales 13 son sales tipo fármaco–fármaco con otros antidiabéticos.^{368–372} El resto se corresponden con sales inorgánicas y complejos metálicos de MTF. Solo se han reportado tres estructuras de sales que contienen MTF y un AINE como contraíón: MTF–diclofenaco,³⁷³ MTF–salicilato³⁷⁴ y MTF–aspirina.³⁷⁵ El alto número de sales moleculares observadas concuerda con la naturaleza básica fuerte de MTF. Por lo tanto, y de acuerdo con la conocida “regla del pK_a”^{376,377} se espera una transferencia de protones desde el grupo carboxílico de los AINEs hacia un grupo amina en MTF. La **tabla 4.3.1** recoge valores de pK_a de MTF y los AINE seleccionados en este capítulo.^{324,378}

Tabla 4.3.1. Valores de pK_a reportados y calculados de los APIs.

APIs	Valores pK _a Reportados	Ref.	*Valores pK _a Calculados *	ΔpK _a
Metformina	12.4	[³³⁴]	12.30	-
Ácido Mefenámico	3.93	[³²⁹]	3.89	8.41
Ácido Tolfenámico	4.3	[³³⁰]	3.88	8.42
Ácido Niflúmico	1.88	[³²⁶]	1.88	10.42
Diflunisal	2.69	[³²⁶]	2.69	9.61
Flurbiprofeno	4.2	[³⁷⁹]	4.42	7.88

* Valores calculados usando el software MarvinSketch.³³⁶

4.3.2.2. Síntesis de MTF·HCl

La MTF se comercializa como MTF·HCl, debido a su inestabilidad y gran reactividad. Por lo que es necesario un proceso de neutralización antes de realizar las operaciones de mecanoquímica. Para ello, se agitan 10 mmol de MTF·HCl (1.656 g) y 10 mmol de NaOH (0.4 g) en 60 mL de isopropanol a temperatura ambiente, en un vaso de vidrio sellado para evitar la evaporación. Después de 24 h, la solución se filtra con filtros de jeringa de 0.22 μm para eliminar el NaCl (insoluble en isopropanol). El filtrado obtenido (contiene la MTF soluble en isopropanol) se lleva a un evaporador rotatorio asistido por vacío, que se ajusta a 40 °C y 30 rpm. Tras eliminar el solvente, la MTF precipita, se recoge y se almacena en tubos sellados y opacos a la luz hasta su uso. La pureza de MTF debe confirmarse reiteradamente antes de cada uso mediante PXRD.

4.3.2.3. Síntesis mecanoquímica

La síntesis mecanoquímica de las sales de MTF se realizó mediante LAG en un molino de bolas Retsch MM2000, a una frecuencia de 25 Hz de agitación, utilizando jarras de acero inoxidable y 2 bolas de 7 mm de diámetro. Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente, durante 30 minutos, repitiendo la operativa en varias ocasiones para asegurar la reproducibilidad. A su vez, todos los productos obtenidos, se han analizado mediante PXRD para determinar la formación de un nuevo MMF.

- MTF–MEF, MTF–DIF·H₂O y MTF–NIF·H₂O se obtuvieron mediante LAG de una mezcla de MTF (0.5 mmol, 64.58 mg) y el correspondiente coformador (0.5 mmol, 130.85 mg de MEF, 125.10 mg de DIF y 141.11 mg de NIF) en una relación estequiométrica 1:1 usando 100 µL de agua miliQ como aditivo líquido.
- MTF–FLF y MTF–TLF se obtuvieron mediante LAG de una mezcla de MTF (0.5 mmol, 64.58 mg) y el correspondiente coformador (0.5 mmol, 130.85 mg de TLF, 122.13 mg de FLF) en una relación estequiométrica 1:1, junto con 100 µL de etanol como aditivo líquido.
- MTF–DIF y MTF–NIF, se obtuvieron mediante deshidratación de MTF–DIF·H₂O y MTF–NIF·H₂O respectivamente. Para ello el producto del LAG en agua se calentó a 100 °C durante 2 h.

4.3.2.4. Síntesis en solución

- Cristales de MTF–NIF·2H₂O, MTF–MEF, MTF–FLF y MTF–TLF se han obtenido a partir de una solución saturada del LAG usando etanol como disolvente. Los cristales aparecieron después de 2 días de lenta evaporación a temperatura ambiente.
- Cristales de MTF–NIF se han obtenido a partir de una solución saturada del producto del LAG usando acetato de etilo como disolvente. Los cristales aparecieron después de 2 días de lenta evaporación a temperatura ambiente.
- Cristales de MTF–DIF se han obtenido mediante síntesis hidrotermal. Se colocó una mezcla de 0.2 mmol de MTF (25.8 mg) y 0.2 mmol de DIF (50.4 mg) en una relación estequiométrica 1:1, en un reactor hidrotermal con 3 mL de agua miliQ. El reactor se selló herméticamente y se calentó a 110 °C durante 24 h. Antes de abrirlo, el reactor se dejó enfriar lentamente durante 5 horas, hasta alcanzar la temperatura ambiental. Los cristales de MTF–DIF se separaron directamente de la solución.

4.3.3. Resultados y discusión

4.3.3.1. Evaluación de la formación de sales moleculares

Las operaciones de LAG han permitido la síntesis de las nuevas sales de MTF tipo fármaco-fármaco de una manera eficiente, rápida y reproducible, evitando el sobreconsumo de tiempo y recursos.³⁸⁰ Los difractogramas de PXRD de los productos del LAG, muestran picos característicos que difieren de ambos APIs, indicando así la formación de nuevas fases cristalinas. Además, no se observan señales de los componentes, por lo que las fases se consideran puras y la estequiometría utilizada en la reacción, correcta. Estos resultados se recogen en la **figura 4.3.2** acompañados de los difractogramas de PXRD calculados a partir de las estructuras cristalinas de las sales obtenidas en este capítulo.

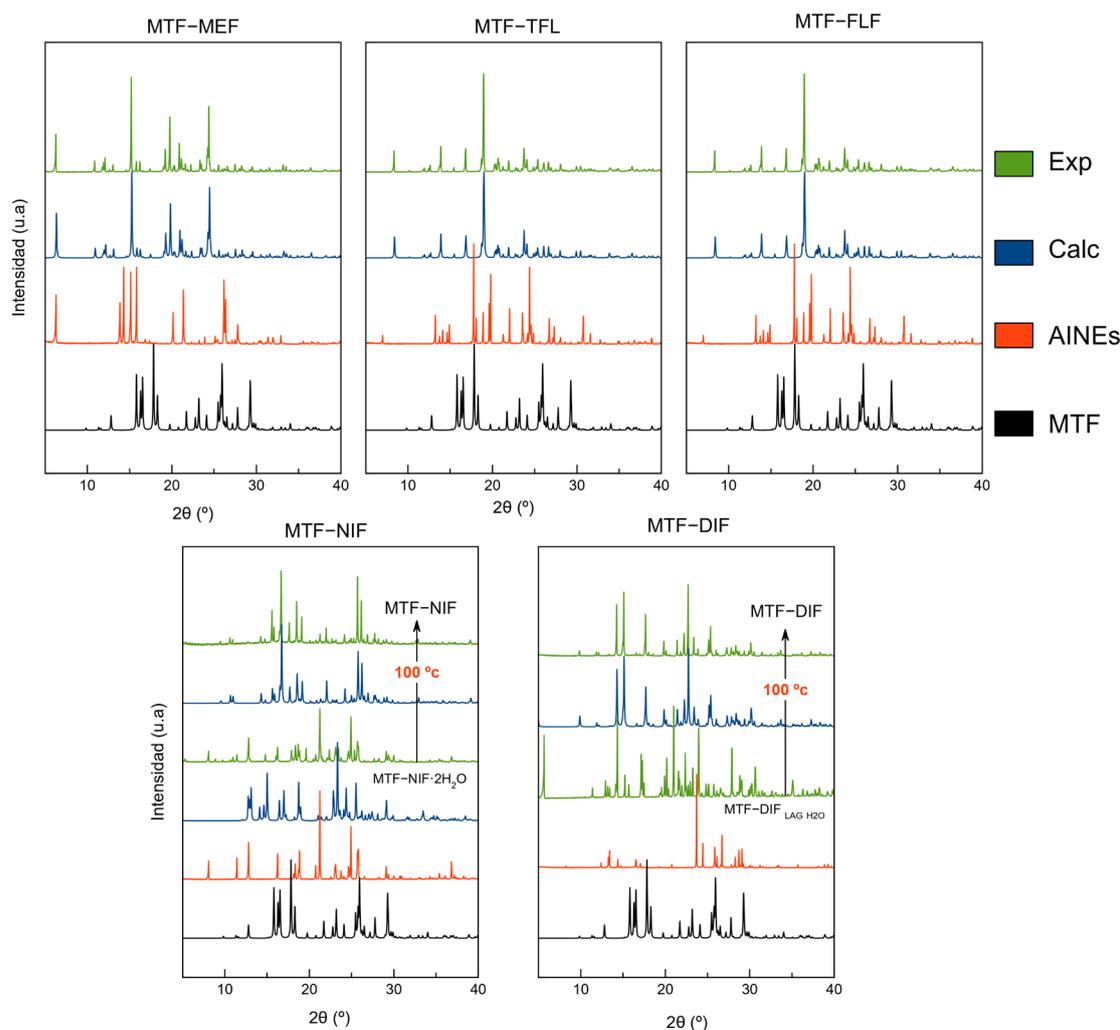


Figura 4.3.2. Difractogramas PXRD de MTF, AINes, producto de las reacciones de LAG y el difractograma calculado a partir de las estructuras cristalinas de las nuevas sales moleculares.

Para obtener más información sobre la estructura cristalina de las nuevas fases y poder confirmar la formación de sales, se han obtenido cristales de los productos de las reacciones del LAG. A su vez las estructuras cristalinas de MTF–TLF, MTF–MEF, MTF–FLF y MTF–NIF han permitido simular un difractograma de PXRD calculado para cada sal, que ha sido utilizado para confirmar las fases. En el caso de MTF–NIF y MTF–DIF, el patrón de polvo calculado no coincide con el producto obtenido de la reacción de LAG, indicando así la formación de una fase intermedia o una fase hidratada. Por esta razón, el producto del LAG de MTF, NIF y DIF, se calentó a 100 °C durante 2 h. Después del tratamiento térmico, el difractograma de PXRD coincide con el difractograma calculado para la sal anhidra MTF–NIF y MTF–DIF. Para confirmar la formación de estas fases hidratadas durante el LAG, se han obtenido cristales de MTF–NIF·2H₂O. Sin embargo, el difractograma PXRD calculado de MTF–NIF·2H₂O y el producto obtenido del LAG tampoco coinciden, lo que indica la formación de otro tipo de fase, probablemente sales con diferentes grados de hidratación. Para MTF–DIF, lamentablemente no se ha podido encontrar ninguna estructura cristalina hidratada que pueda ser comparada con la reacción del LAG.

4.3.3.2. Análisis estructural de las sales de MTF–AINEs

Las unidades asimétricas de las sales, representadas en la **figura 4.3.4**, confirman la transferencia del protón desde los grupos ácidos del AINE hasta el grupo nitrogenado básico de la MTF. El catión MTF⁺ resultante participa en heterosintones con el anión AINE, través de sintones guanidina···carboxilato $R_2^2(8)$ formando una sal molecular.^{137,143} Estos resultados se evidencian en el mapa experimental de densidad electrónica y en las distancias de enlace C–O del grupo carboxilato de los AINE, con valores de $\Delta DC-O$ similares a los observados en sales, en el rango de 0.008–0.024 Å.³³⁷ Los datos cristalográficos obtenidos para todas las sales se resumen en la **tabla 4.3.2**, así como la información sobre los enlaces de hidrógeno se recogen en la **tabla 4.3.3** al final de la sección de análisis estructural.

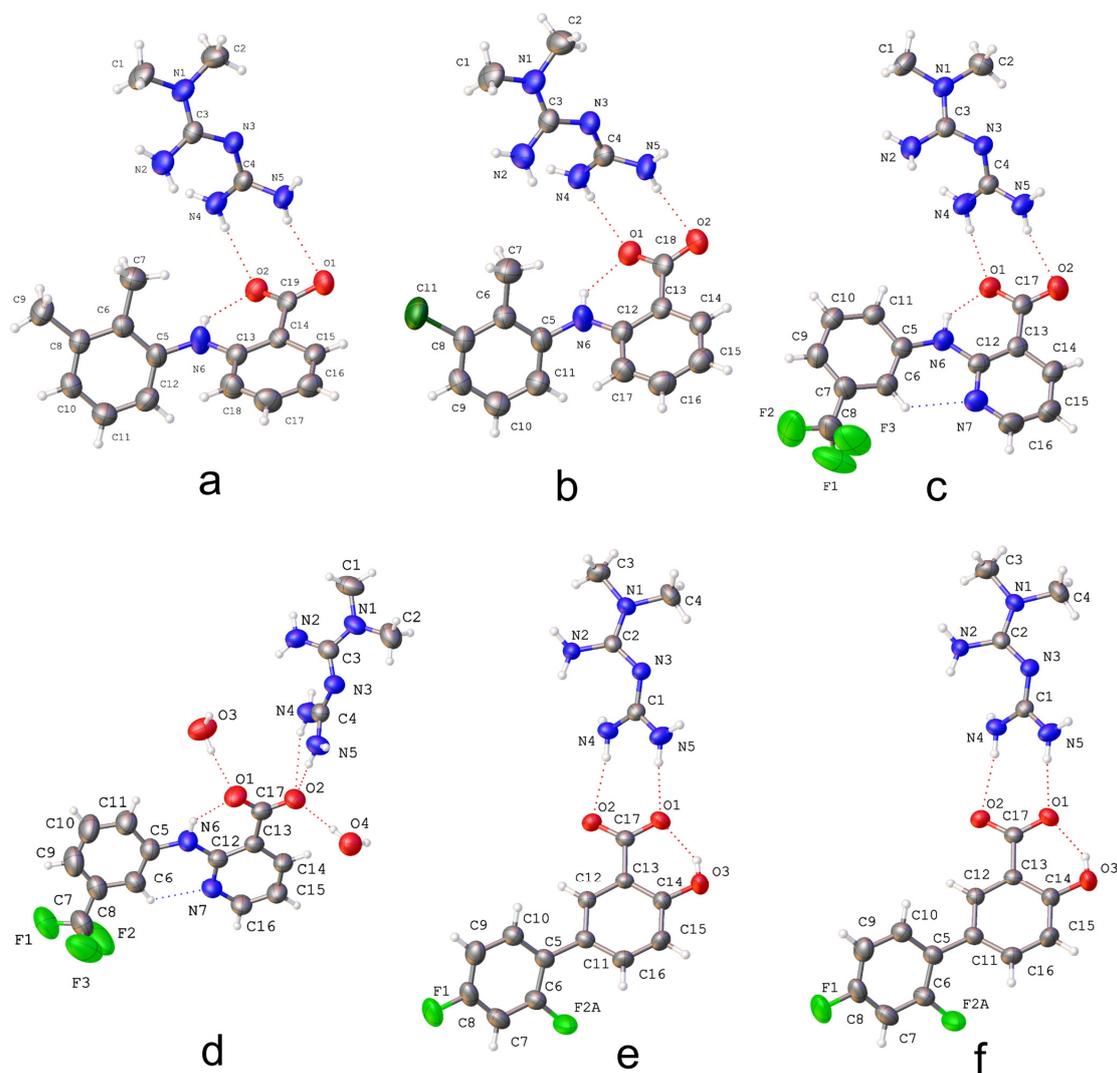


Figura 4.3.3. Unidad asimétrica de (a) MTF–MEF, (b) MTF–TLF, (c) MTF–NIF, (d) MTF–NIF·H₂O, (e) MTF–DIF y (f) MTF–FLF.

4.3.3.2.1. MTF–MEF y MTF–TLF

Las sales moleculares de MTF y los ácidos fenámicos (MEF y TLF) son isoestructurales (tienen la misma estructura cristalina) e isomorfos (tienen las mismas dimensiones de celda unidad y el mismo grupo espacial).³⁸¹ El índice de similitud de celda unidad Π (Ecuación 1) de ambas estructuras cristalinas se puede calcular mediante los parámetros de celda.³⁸² Además, los índices de similitud de PXRD para cada sal y las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) se calculan utilizando la herramienta de similitud de empaquetamiento del programa Mercury¹⁸⁴ (superposición de 20 moléculas y permitiendo diferencias moleculares).³⁸³ Los resultados obtenidos de estos cálculos muestran un valor de Π de 0.003, lo que confirma la naturaleza isomorfa de las sales.

Además, se observa como 20 de 20 moléculas coinciden en los pares de sales de fenamato (similitud de PXRD: 0.986; RMSD (Å): 0.131), lo que sugiere que estas sales moleculares tienen interacciones intermoleculares idénticas y, por lo tanto, presentan el mismo empaquetamiento cristalino.

$$\Pi = \frac{(a + b + c)}{(a' + b' + c')} - 1$$

Las sales moleculares cristalizan en el grupo espacial monoclinico $P2_1/c$, con un catión MTF^+ monoprotonado y un anión fenamato (MEF^- o TLF^-) en la unidad asimétrica. En la sal, los iones se asocian a través del sintón $R_2^2(8)$ construido por el grupo COO^- y la porción de aminas terminales del catión MTF^+ (**Figura 4.3.4**). Los pares iónicos se alinean en una cadena 1D a lo largo de la dirección (010) mediante el enlace de hidrógeno $N-H\cdots O$ ($N2-H2D\cdots O1$) formado entre el grupo NH_2 en los cationes MTF^+ y el grupo COO^- de los aniones fenamato (**Figura 4.3.4a**). A lo largo de la dirección (001), las cadenas adyacentes están unidas mediante homodímeros $R_4^2(8)$ de dos pares MTF^- fenamato, relacionados por un centro de inversión, generando una estructura en forma de cinta (**Figura 4.3.4b**). La estructura en capas 2D se genera gracias a las fuerzas de apilamiento $\pi\cdots\pi$ que se da entre los anillos sustituidos de los iones fenamato (**Figura 4.3.4c,d**). La estructura supramolecular se obtiene apilando estas capas con enlaces de hidrógeno entre los grupos amino de MTF^+ y los grupos carboxilato de los fenamatos (**Figura 4.3.4c**).

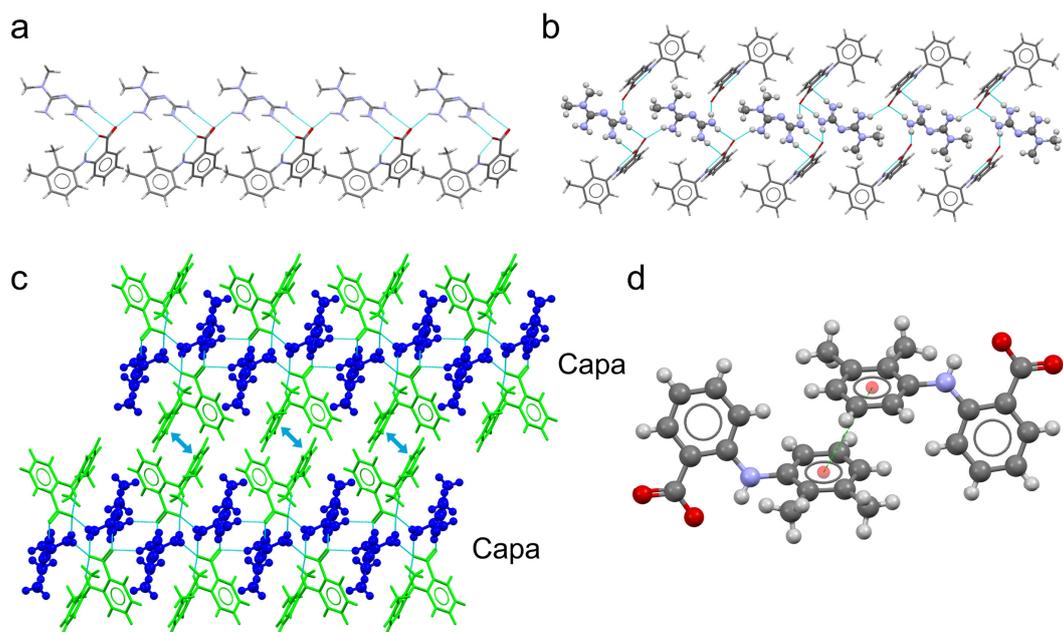


Figura 4.3.4. (a) Fragmento de la estructura en cadena 1D en MTF-MEF. (b) Vista detallada de la estructura en forma de cinta en MTF-MEF. Los cationes MTF^+ se representan como esferas y varillas. (c) Vista detallada del empaquetamiento de los cationes MTF^+ (azul) y los aniones MEF^- (verde) en MTF-MEF. (d) Par de aniones MEF-MEF apilados.

4.3.3.2.2. MTF-NIF y MTF-NIF·2H₂O

MTF-NIF cristaliza en el sistema monoclinico con el grupo espacial $P2_1/n$. La unidad asimétrica de esta fase cristalina contiene un catión MTF^+ y un anión NIF^- asociados por un enlace de hidrógeno iónico que implica las aminas terminales del catión MTF^+ y el grupo carboxilato de NIF^- . Como en las estructuras anteriores, los pares iónicos adyacentes se unen mediante enlaces de hidrógeno para formar una cadena 1D (a lo largo del eje *a*) (**Figura 4.3.5a**). Las interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ entre los anillos de NIF^- refuerzan las cadenas (**Figura 4.3.5b,c**). Posteriormente, los enlaces de hidrógeno entre los grupos amino de los cationes MTF^+ y los grupos carboxilato de los aniones NIF^- generan una estructura en capas 2D (**Figura 4.3.5d**). Finalmente, la estructura supramolecular se obtiene apilando estas capas (a lo largo del eje *b*) frente a los grupos $-\text{CF}_3$ de NIF^- (**Figura 4.3.5e**).

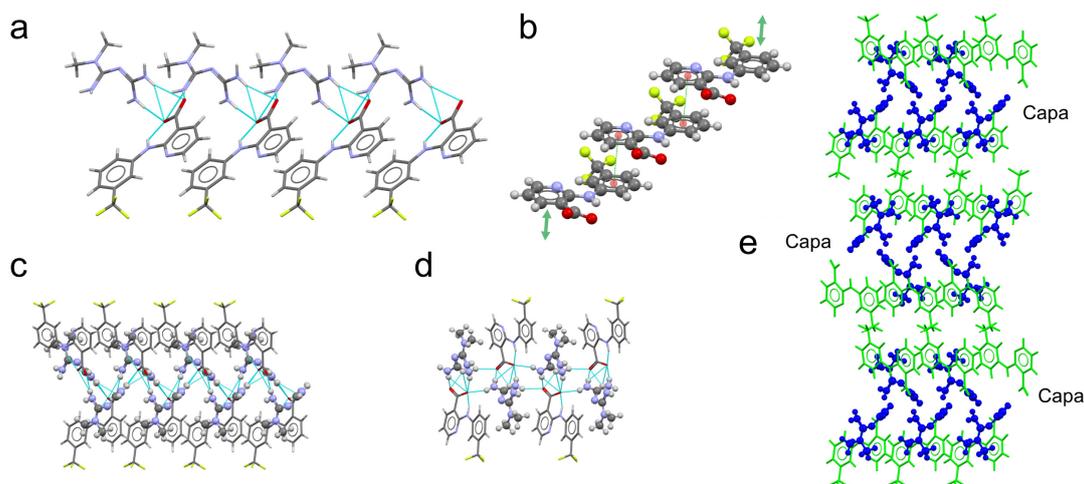


Figura 4.3.5. (a) Fragmento de la estructura en cadena 1D en la estructura cristalina de MTF–NIF. (b) Interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ entre aniones de NIF⁻. (c) Estructura en forma de cinta en MTF–NIF. Los cationes MTF⁺ se representan como esferas y varillas. (d) Fragmento de la estructura en capas 2D en MTF–NIF. (e) Empaquetamiento de los cationes MTF⁺ (azul) y los aniones NIF⁻ (verde) en MTF–NIF.

Por su parte, MTF–NIF·2H₂O cristaliza en el sistema monoclinico con el grupo espacial P2₁/c. La unidad asimétrica contiene un catión MTF⁺, un anión NIF⁻ y dos moléculas de agua, lo que resulta en una sal dihidratada. En la unidad asimétrica, los iones están conectados por enlaces de hidrógeno entre las aminas terminales del catión MTF⁺ y el grupo carboxilato de NIF⁻. A diferencia de las estructuras anteriores, esta interacción involucra solo un átomo de oxígeno del grupo carboxilato de NIF $R_2^1(6)$. Las moléculas de agua y los pares de iones están conectados por interacciones de enlace de hidrógeno construyendo una estructura en forma de cinta que se extiende a lo largo del eje *b*, ubicando los grupos –CF₃ en la periferia (**Figura 4.3.6a**). Las interacciones adicionales de enlace de hidrógeno entre el grupo amino terminal de MTF⁺ y las moléculas de agua conectan las cintas para construir una estructura en capas 2D que se extiende paralelamente al plano *bc* del cristal (**Figura 4.3.6b**). Finalmente, la estructura supramolecular 3D se genera apilando estas capas a lo largo del eje *a* frente a los grupos –CF₃ de los aniones NIF⁻ (**Figura 4.3.6c**).

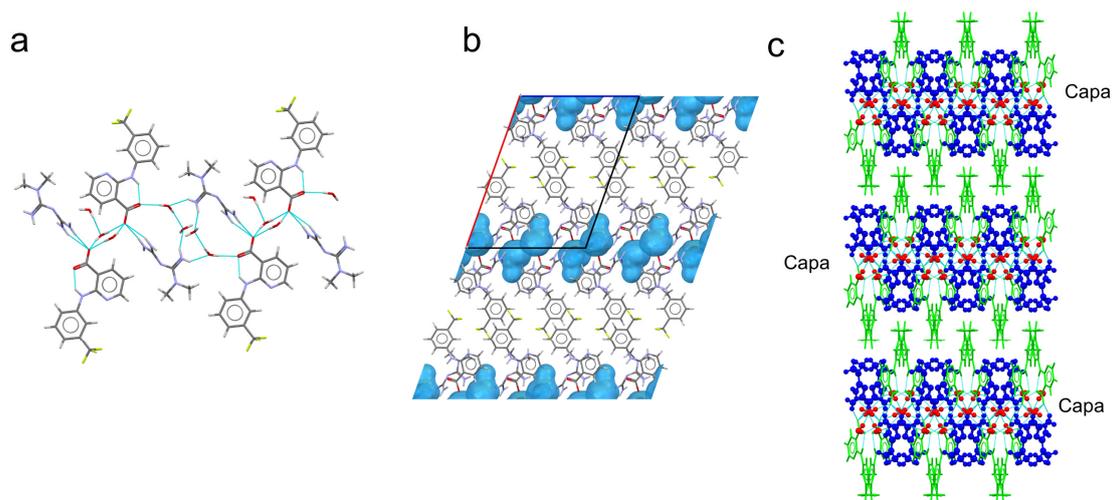


Figura 4.3.6. (a) Fragmento de la estructura en forma de cinta en MTF–NIF·2H₂O. (b) Vista detallada de los huecos donde se disponen las moléculas de agua en MTF–NIF·2H₂O. (c) Empaquetamiento de los cationes MTF⁺ (azul), las moléculas de agua (rojo) y los aniones NIF⁻ (verde) en la estructura cristalina de MTF–NIF·2H₂O. Los cationes MTF⁺ se representan como esferas y varillas.

Una posible explicación para la hidratación de la sal MTF–NIF se obtiene del estudio de la morfología cristalina de MTF–NIF (**Figura 4.3.7**). La morfología calculada de MTF–NIF mediante el método Bravais–Friedel–Donnay–Harker (BFDH) incluido en la última versión del software de visualización de estructuras Mercury,¹⁸⁴ demuestra como las caras con mayor superficie expuesta, caras $(-110\}$ $(-1-10)$, $(1\ 1\ 0)$ y $(1\ -1\ 0)$ (correspondientes al 14.4 % de la superficie total) y las caras $(1\ -1\ -1)$, $(1\ 1\ -1)$, $(-1\ -1\ 1)$ y $(-1\ 1\ 1)$ (correspondientes al 32 % de la superficie total), son aquellas que exponen los grupos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno (grupos amino de MTF⁺ y carboxilato de NIF⁻). Además, esta superficie expuesta coincide con la región de la estructura cristalina donde se forman las estructuras en forma de cinta, lo que facilita que las moléculas de agua puedan acceder y formar enlaces de hidrógeno adicionales generando la estructura hidratada.

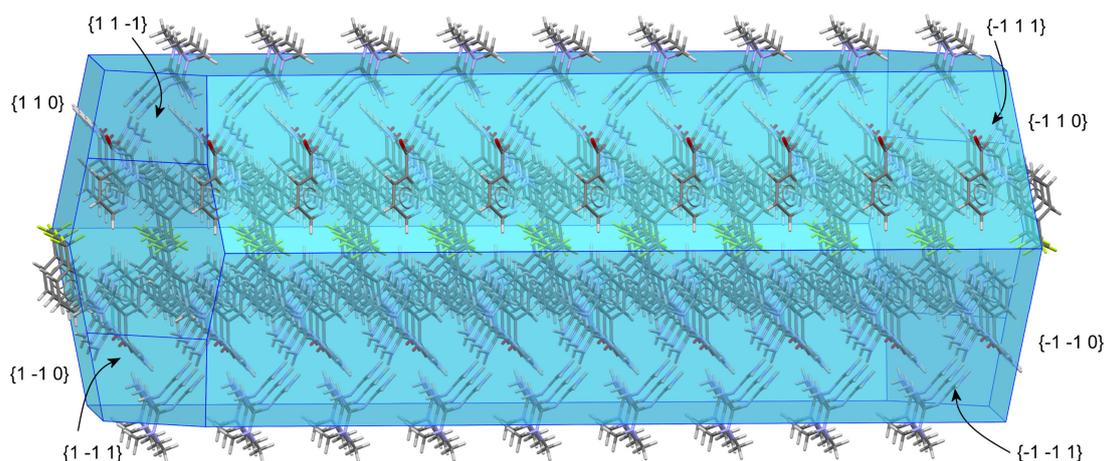


Figura 4.3.7. Morfología BFDH de MTF–DIF.

4.3.3.2.3. MTF-DIF

MTF–DIF cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial $C2/c$, con un catión MTF^+ y un anión DIF^- en la unidad asimétrica. Se observa la formación de un trímero con MTF^+ y dos iones DIF^- a través de enlaces de hidrógeno guanidina \cdots carboxilato, $N4-H4E\cdots O2$ (3.01 Å) y $N5-H5B\cdots O1$ (2.96 Å) $R_2^2(8)$ y enlaces de hidrógeno $N2-H2A\cdots O2$ (2.92 Å) (**Figura 4.3.8a**). Los trímeros se unen para construir una estructura en forma de cinta a través de enlaces de hidrógeno $N5-H5A\cdots O2$ (3.05 Å) a lo largo del eje b (**Figura 4.3.8b**). Un enlace de hidrógeno adicional entre los grupos amino de MTF^+ y los grupos carboxilato de DIF^- genera una estructura en capas 2D que se extiende paralela al plano bc del cristal. Los contactos $C-H\cdots F$ participan en la cohesión de estas estructuras. Finalmente, la estructura supramolecular se construye con apilamientos de capas mediante interacciones $\pi\cdots\pi$ de los anillos de 2,4-difluorofenil de DIF^- (**Figura 4.3.8c**).

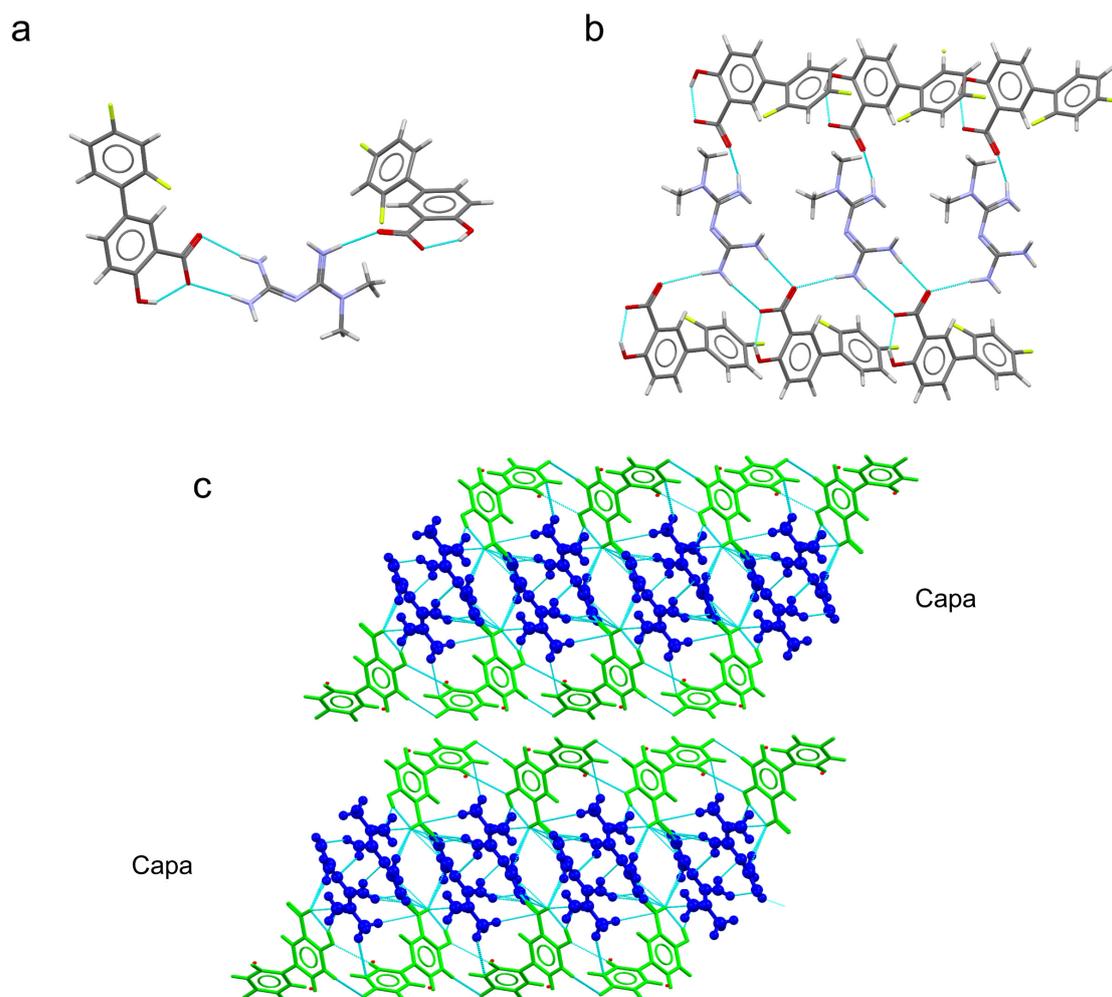


Figura 4.3.8. (a) Estructura de trímero en MTF–DIF. (b) Fragmento de la estructura en cinta en MTF–DIF. (c) Empaquetamiento de los cationes MTF⁺ (azul) y los aniones DIF⁻ (verde) en MTF–DIF. Los cationes MTF⁺ están representados como esferas y varillas.

4.3.3.2.4. MTF–FLF

Por último, MTF–FLF cristaliza en el sistema triclínico, grupo espacial P-1, con un catión MTF⁺ monoprotonado y un anión FLF⁻ en la unidad asimétrica. Ambos iones se asocian con un enlace de hidrógeno a través del grupo guanidina de MTF⁺ y el grupo carboxilato del anión FLF⁻ $R_2^2(8)$. Los pares adyacentes están conectados adicionalmente por enlaces de hidrógeno $R_4^2(8)$ para construir una estructura en forma de cinta que se extiende a lo largo del eje c, ubicando los iones FLF⁻ en el exterior (**Figura 4.3.9a**). Las estructuras en capas 2D se generan conectando cintas que involucran grupos de amina no terminales de MTF⁺ y grupos carboxilato de FLF⁻ (**Figura 4.3.9b**). La arquitectura supramolecular 3D se construye mediante interacciones de apilamiento $\pi \cdots \pi$ entre el

anillo aromático no sustituido de los aniones FLF^- que conectan capas adyacentes (**Figura 4.3.9c,d**).

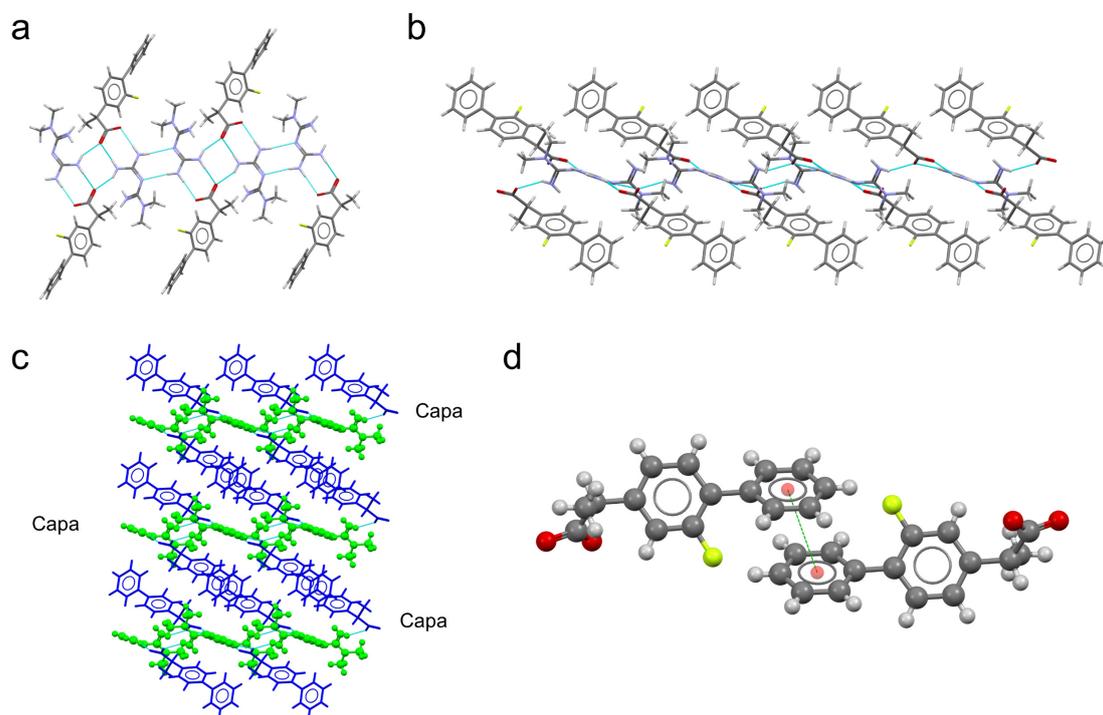


Figura 4.3.9. (a) Fragmento de la estructura en forma de cinta en la estructura cristalina de MTF-FLF. (b) Fragmento de la estructura en capas 2D en la sal molecular MTF-FLF. (c) Empaquetamiento de los cationes MTF^+ (azul) y los aniones NIF^- (verde) en la estructura cristalina de MTF-DIF. (d) Par de aniones FLF^- apilados.

Tabla 4.3.2. Datos cristalográficos de las sales de MTF–AINEs.

Compuesto	MFT–MEF	MFT–TLF	MFT–NIF	MFT–NIF·2H ₂ O	MTF–DIF	MFT–FLP
Fórmula	C ₁₉ H ₂₆ N ₆ O ₂	C ₁₈ H ₂₃ ClN ₆ O ₂	C ₁₇ H ₂₀ F ₃ N ₇ O ₂	C ₁₇ H ₂₄ F ₃ N ₇ O ₄	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₅ O ₃	C ₁₉ H ₂₄ FN ₅ O ₂
Peso molecular	370.46	390.87	411.40	447.43	379.37	373.43
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	C2/c	P-1
a/Å	15.5701(19)	15.5584(15)	6.2011(16)	19.9296(15)	36.998(2)	8.7587(5)
b/Å	8.7141(11)	8.7072(8)	32.216(8)	7.9245(6)	6.7220(5)	10.5391(7)
c/Å	16.239(2)	16.3668(16)	9.846(3)	14.6836(11)	15.0427(9)	10.5990(6)
α/°	90	90	90	90	90	90.265(2)
β/°	116.408(4)	117.919(4)	101.051(13)	109.362(4)	104.981(3)	96.217(2)
γ/°	90	90	90	90	90	94.624(2)
V/Å³	1973.4(4)	1959.2(3)	1930.6(8)	2187.9(3)	3614.0(4)	969.37(10)
Z	4	4	4	4	8	2
Dc/g cm⁻³	1.247	1.325	1.415	1.358	1.394	1.279
F(000)	792	824	856	936	1584	398
Reflexiones tomadas	20,802	19,113	19,888	17,437	18,152	14,188
Reflexiones únicas	3509	3452	3396	3853	3155	3366
Datos / restricciones / parámetros	3509/0/251	3452/0/248	3396/0/264	3853/0/288	3155/5/258	3366/0/248
Ajuste del parámetro F²	1.053	1.048	1.036	1.026	1.037	1.068
R₁ (I > 2σ(I))	0.0398	0.0477	0.0640	0.0633	0.0380	0.0551
wR₂ (I > 2σ(I))	0.1153	0.1315	0.1758	0.1673	0.1044	0.1622

Tabla 4.3.3. Enlaces de hidrógeno presentes en las sales de MTF–AINEs.

MTF–MEF	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(2)–H(2D)···O(1)	0.86	2.17	2.8455(16)	135.4
	N(4)–H(4A)···O(2) ^{#1}	0.86	2.15	2.9671(16)	157.9
	N(4)–H(4B)···O(2) ^{#2}	0.86	2.11	2.9165(16)	156.1
	N(5)–H(5A)···O(1) ^{#3}	0.86	2.11	2.9049(18)	151.8
	N(5)–H(5B)···O(1) ^{#1}	0.86	2.23	2.9794(17)	144.9
	N(6)–H(6)···O(2)	0.86	1.96	2.6496(17)	135.7
Operaciones de simetría:					
#1 x,y+1,z #2 -x+1,y+1/2,-z+3/2 #3 -x+1,-y+2,-z+1					
MTF–TLF	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(2)–H(2E)···O(2)	0.86	2.09	2.839(2)	144.9
	N(4)–H(4A)···O(1) ^{#1}	0.86	2.16	2.969(2)	157.3
	N(4)–H(4B)···O(1) ^{#2}	0.86	2.12	2.930(2)	156.9
	N(5)–H(5A)···O(2) ^{#3}	0.86	2.12	2.911(3)	152.0
	N(5)–H(5B)···O(2) ^{#1}	0.86	2.16	2.988(2)	161.5
	N(6)–H(6)···O(1)	0.86	1.95	2.637(2)	136.5
Operaciones de simetría:					
#1 x,y-1,z #2 -x+1,y-1/2,-z+3/2 #3 -x+1,-y,-z+1					
MTF–NIF	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	C(6)–H(6)···N(7)	0.93	2.29	2.883(5)	121.5
	N(2)–H(2D)···N(4) ^{#1}	0.86	2.77	3.399(4)	131.1
	N(2)–H(2E)···O(1) ^{#1}	0.86	2.60	3.236(4)	131.2
	N(2)–H(2E)···O(2) ^{#1}	0.86	2.18	3.035(4)	174.1
	N(4)–H(4A)···O(2) ^{#2}	0.86	2.27	3.063(3)	153.3
	N(4)–H(4B)···O(1)	0.86	1.98	2.828(3)	167.6
	N(5)–H(5A)···O(1) ^{#3}	0.86	2.14	2.950(3)	156.3
Operaciones de simetría:					
#1 x-1,y,z #2 x-1/2,-y+1/2,z+1/2 #3 x-1/2,-y+1/2,z-1/2					

Tabla 4.3.3(cont.). Enlaces de hidrógeno presentes en las sales de MTF–AINEs.

MTF– NIF·H ₂ O	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(2)–H(2D)···O(3) ^{#1}	0.86	2.18	2.923(3)	145.0
	N(2)–H(2E)···O(4) ^{#2}	0.86	2.31	3.003(3)	138.3
	N(4)–H(4A)···O(1)	0.86	2.15	2.915(3)	147.2
	N(4)–H(4B)···O(2) ^{#3}	0.86	2.43	3.195(3)	148.1
	N(5)–H(5A)···O(3) ^{#4}	0.86	2.23	3.032(4)	156.1
	N(5)–H(5B)···O(2) ^{#3}	0.86	2.25	3.057(3)	155.6
	C(6)–H(6)···N(7)	0.93	2.30	2.893(4)	120.8
	N(6)–H(6A)···O(1)	0.86	1.91	2.628(3)	139.6
	O(3)–H(3A)···O(1)	0.85	1.90	2.742(3)	170.9
	O(3)–H(3B)···O(4) ^{#5}	0.85	1.97	2.816(3)	170.3
	O(4)–H(4C)···O(2)	0.85	1.96	2.808(3)	171.3
	O(4)–H(4D)···O(2) ^{#6}	0.85	2.00	2.838(3)	166.4
Operaciones de simetría:					
#1 x,–y+1/2,z+1/2 #2 –x+2,–y+1,–z+1 #3 –x+2,y+1/2,–z+1/2					
#4 x,y+1,z #5 x,–y+1/2,z–1/2 #6 –x+2,–y,–z+1					
MTF–DIF	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(2)–H(2A)···O(2)	0.86	2.11	2.9209(15)	156.9
	N(2)–H(2B)···N(3) ^{#1}	0.86	2.43	3.1618(17)	143.5
	N(4)–H(4E)···O(2) ^{#1}	0.86	2.16	3.0116(15)	152.7
	N(5)–H(5A)···O(2) ^{#2}	0.86	2.20	3.0505(18)	169.2
	N(5)–H(5B)···O(1) ^{#1}	0.86	2.17	2.9569(17)	151.3
	C(15)–H(15)···F(1) ^{#3}	0.93	2.57	3.180(2)	123.7
	O(3)–H(3)···O(1)	0.82	1.81	2.5367(15)	146.7
Operaciones de simetría:					
#1 –x+1/2,y+1/2,–z+1/2 #2 –x+1/2,y–1/2,–z+1/2 #3 x,–y+2,z+1/2					
MTF–FLF	D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(2)–H(2A)···O(1) ^{#1}	0.86	2.11	2.866(2)	146.6
	N(4)–H(4A)···O(2)	0.86	1.95	2.791(3)	165.6
	N(4)–H(4B)···O(2) ^{#2}	0.86	2.07	2.861(3)	152.6
	N(5)–H(5A)···O(1)	0.86	2.01	2.867(3)	175.5
	N(5)–H(5B)···N(3) ^{#3}	0.86	2.30	3.152(3)	171.3
Operaciones de simetría:					
#1 x+1,y,z #2 –x+2,–y+1,–z+1 #3 –x+2,–y+1,–z+2					

4.3.3.3. Estudio de las propiedades de las sales de MTF–AINEs

4.3.3.3.1. Estabilidad térmica

Para evaluar la estabilidad térmica y determinar el punto de fusión de las nuevas fases se ha realizado un análisis mediante DSC. La **figura 4.3.10** muestra las gráficas de DSC y los eventos endotérmicos que ocurren durante los experimentos, los cuales corresponden al punto de fusión de las sales. La presencia de un solo evento endotérmico y bien definido confirma, 1) la estabilidad de la fase por debajo del punto de fusión, ya que no se producen transformaciones o fenómenos de disociación y 2) la pureza de las fases, corroborando los resultados obtenidos en PXRD.

Con la excepción de MTF–FLF, todas las sales presentan un punto de fusión en un valor intermedio al punto de fusión de los componentes, un comportamiento habitual en este tipo de materiales.³¹⁴ En este caso no se aprecia una correlación positiva entre el punto de fusión de la molécula de AINE y su fase correspondiente ya que el punto de fusión de los componentes disminuye en el orden: MEF (230 °C) > DIF (210-211 °C) > TLF (207 °C) > NIF (204 °C) > MTF (117 °C) > FLF (110 °C) mientras que las sales siguen el orden: MTF–MEF (201 °C) > MTF–FLF (200 °C) > MTF–TLF (182 °C) > MTF–DIF (170 °C) > MTF–NIF (134 °C). Estos resultados demuestran que la estabilidad térmica de MTF se mejora en todos los casos, aunque aún por debajo del punto de fusión de la MTF·HCl comercial (231.5 °C).³⁷⁸ Se debe destacar el comportamiento térmico de MTF–FLF, cuyo punto de fusión es de 200 °C, mientras que el punto de fusión de los componentes es de 110 y 117 °C para FLF y MTF respectivamente, lo que demuestra un aumento en la estabilidad térmica y el punto de fusión de ambos APIs de más de 80 °C.

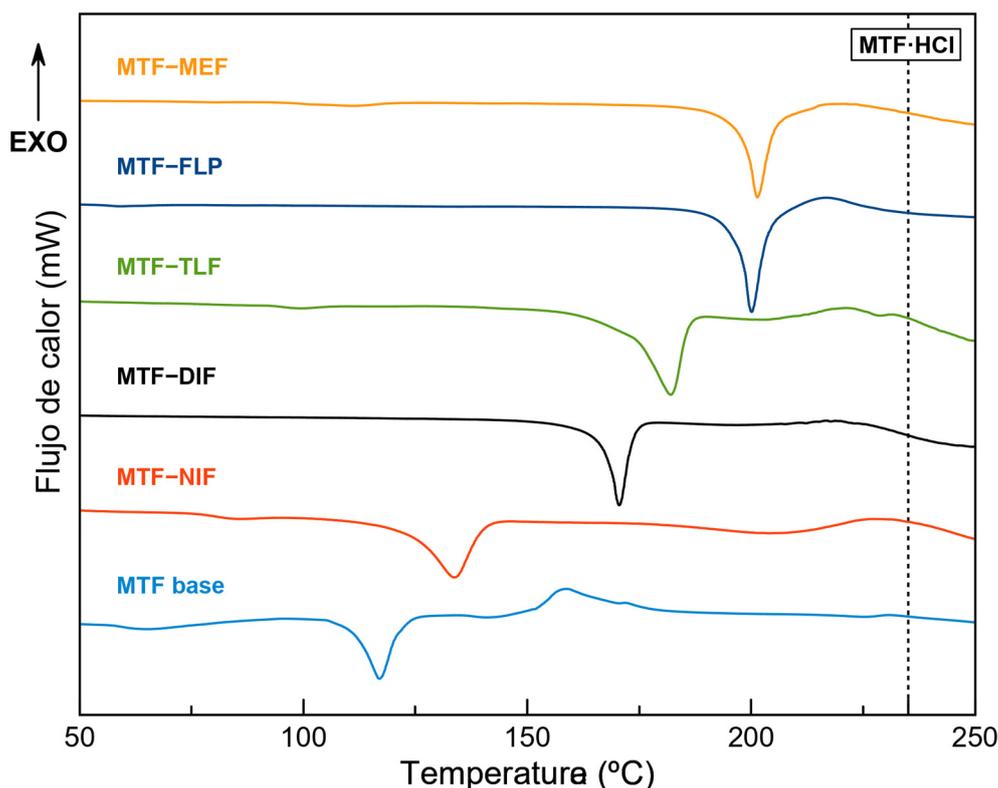


Figura 4.3.10. Curvas de DSC de MTF y las sales obtenidas. La línea punteada corresponde al punto de fusión de MTF·HCl.

4.3.3.3.2. Estabilidad termodinámica

El estudio de la estabilidad de las sales en condiciones de envejecimiento acelerado y en suspensión acuosa, permite evaluar procesos de disociación, hidratación o transición a polimorfos. En primer lugar, las sales se almacenaron bajo condiciones de alta humedad y temperatura (40 °C y 75% de HR). La **figura 4.3.11** muestra los difractogramas PXRD de las sales obtenidos durante 4 meses de estudio. Bajo estas condiciones, no se observan transiciones de fases ni cambios en la cristalinidad, por lo que se demuestra la estabilidad de todas las fases, a excepción de MTF–NIF, que presenta una transición de fase parcial en el tercer día, con una conversión final en una semana. Esta nueva fase no coincide con la sal MTF–NIF·2H₂O ni con el producto del LAG en agua, reportados en este capítulo, por lo que sugiere la formación de sales con diferentes grados de hidratación. Por su parte, la MTF no ha podido ser estudiada, ya que bajo estas condiciones de temperatura y humedad sufre fenómenos de licuación.

CONDICIONES DE ENVEJECIMIENTO ACCELERADO (40 °C, 75% RH)

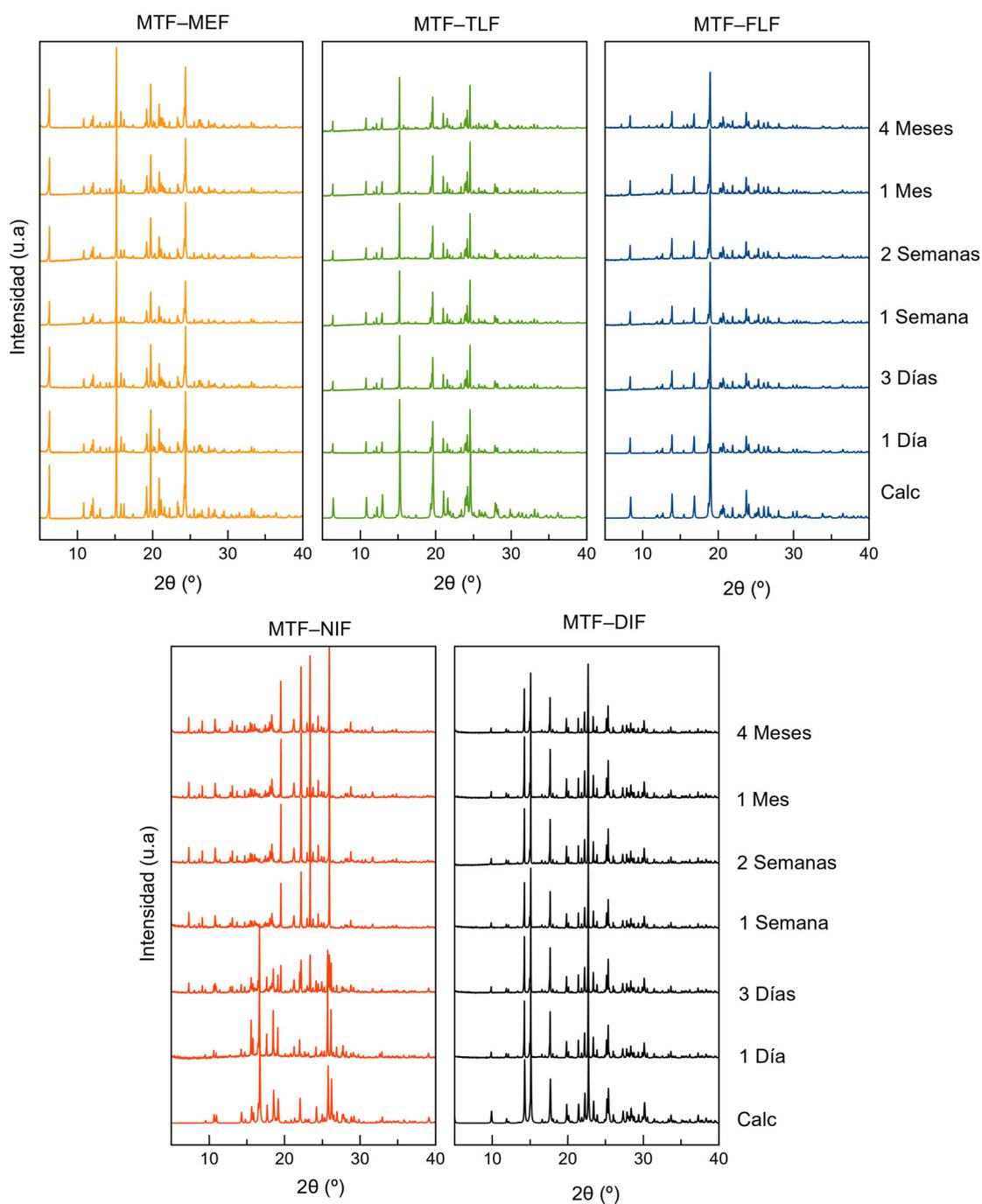


Figura 4.3.11. Difractogramas PXRD bajo condiciones de envejecimiento acelerado.

La estabilidad termodinámica se ha evaluado mediante experimentos de *slurry* en agua miliQ a 25 °C. La **figura 4.3.12** muestra los difractogramas de PXRD para los sólidos, filtrados y secados al aire, después 24 horas de agitación. En ningún caso se aprecian cambios visibles en color o textura en las muestras. A pesar de que MTF-NIF y MTF-DIF muestran una transición de fase que indica baja estabilidad en solución, MTF-TLF, MTF-MEF y MTF-FLF permanecen estables. Los datos de SCXRD y PXRD

confirman la formación de la sal MTF-NIF·2H₂O, pero ha sido imposible determinar la fase final de MTF-DIF tras la suspensión acuosa. Curiosamente, esta fase desconocida coincide con la fase obtenida directamente de la reacción LAG en agua lo que sugiere la formación de una forma hidratada de la sal MTF-DIF.

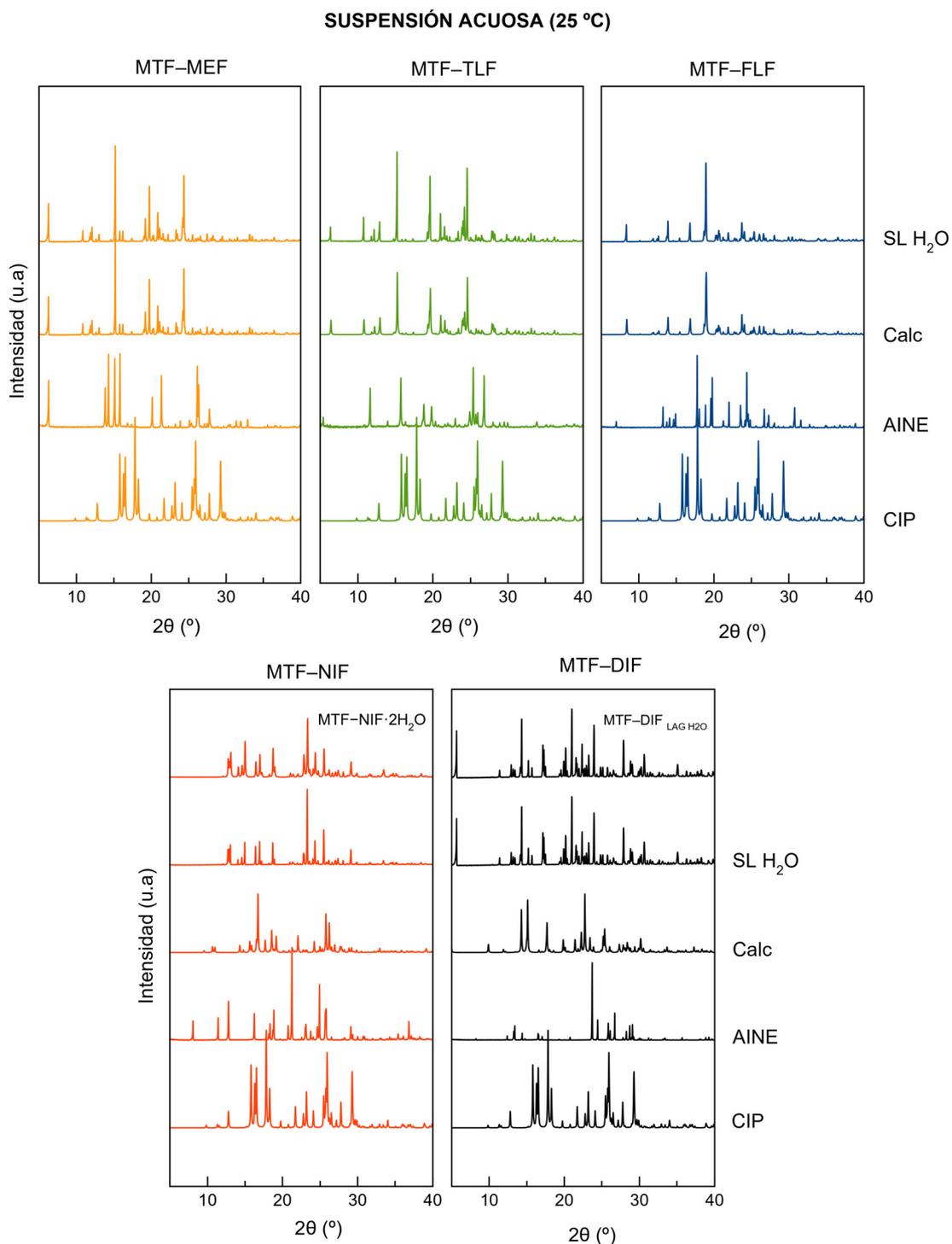


Figura 4.3.12. Difractogramas PXRD después de 24 horas en suspensión acuosa.

4.3.3.3. Estudios de solubilidad

El solapamiento de los espectros de absorción UV-Vis de los APIs, no permiten el uso de la espectrofotometría UV-Vis convencional para evaluar la solubilidad. Por ello, se han realizado estudios de HPLC-UV-Vis para separar y cuantificar la concentración de MTF en solución. La mejora de la solubilidad de los AINEs se ha evaluado mediante la normalización de los datos obtenidos para MTF, utilizando la estequiometría y, el peso molecular de las sales y los componentes. Cabe señalar que este procedimiento solo se puede aplicar a fases estables en las que se mantenga la estequiometría MTF:AINE. Desafortunadamente, la baja estabilidad de MTF-NIF y MTF-DIF observada en la prueba anterior, impide que se pueda determinar su solubilidad termodinámica. Sin embargo, se puede estudiar la solubilidad de la sal hidratada MTF-NIF·2H₂O ya que ha sido confirmada por SXCRD y PXRD.

La **tabla 4.3.3** presenta los valores de solubilidad de las sales de MTF. Estos datos muestran un aumento significativo en la solubilidad de los AINEs en comparación con los fármacos originales: MTF-TLF aumentó la solubilidad 111 veces, MTF-MEF 208 veces, MTF-NIF·2H₂O 574 veces y MTF-FLF 1110 veces. Esta mejora se debe principalmente a la disposición en capas de la estructura cristalina de las sales, que facilita la disgregación y liberación de las moléculas al medio acuoso. Con respecto a MTF·HCl la solubilidad de MTF disminuye en más de 50 veces en todas las sales, ya que la MTF·HCl presenta una solubilidad cercana a 250 mg/mL. Dado que los efectos secundarios de la MTF son principalmente causados por la acumulación gastrointestinal, la reducción de su extrema solubilidad podría ser beneficiosa para mitigar dichos efectos.

Tabla 4.3.3. Valores de solubilidad de las sales de MTF comparados con sus componentes.

Muestra	Solubilidad de MTF en la sal (mg/mL)	Solubilidad de AINEs en la sal (mg/mL)	Mejora de solubilidad MTF·HCl/AINE	Solubilidad reportada de los AINEs (mg/mL)	Refs
MTF-NIF·2H ₂ O	5.290	11.493	0.0212x/574x	<0.02	[³³¹]
MTF-FLP	4.775	5.552	0.0191x/1110x	<0.005	[³⁸⁴]
MTF-MEF	3.185	5.950	0.0127x/119x	<0.05	[^{329,346}]
MTF-TLF	2.740	10.397	0.0110x/208x	<0.05	[³²⁹]

En resumen, las nuevas sales tipo fármaco-fármaco de MTF-AINEs obtenidas en este capítulo han logrado superar dos de los principales problemas de estos APIs. Por un lado, se ha mejorado enormemente la estabilidad de MTF al mismo tiempo que se ha logrado un perfil de solubilidad sobresaliente. Las sales moleculares de MTF-AINE reportadas son menos solubles que la sal de MTF·HCl, lo que potencialmente reduce la acumulación intestinal, que es uno de los efectos secundarios más comunes asociados con el tratamiento crónico de la diabetes tipo II. La estructura cristalina dispuesta en capas de AINE-MTF-AINE permite que los AINEs actúen como barrera, protegiendo la molécula de MTF del entorno, aumentando su estabilidad y disminuyendo su solubilidad. Por otro lado, la solubilidad del AINE mejora enormemente mediante la salificación con MTF ya que se produce la ruptura de los robustos dímeros AINE-AINE presentes en su estructura nativa. Esta mejora de solubilidad es un paso muy importante para incrementar la biodisponibilidad oral de los AINEs, permitiendo reducir sus dosis y efectos secundarios.

Los resultados obtenidos en este capítulo, han derivado en la **publicación N°5** de esta tesis doctoral **“Metformin-NSAIDs molecular salts: a path towards enhanced oral bioavailability and stability” (Pharmaceutics, 2023, 15(2), 449).**

4.3.4. Referencias

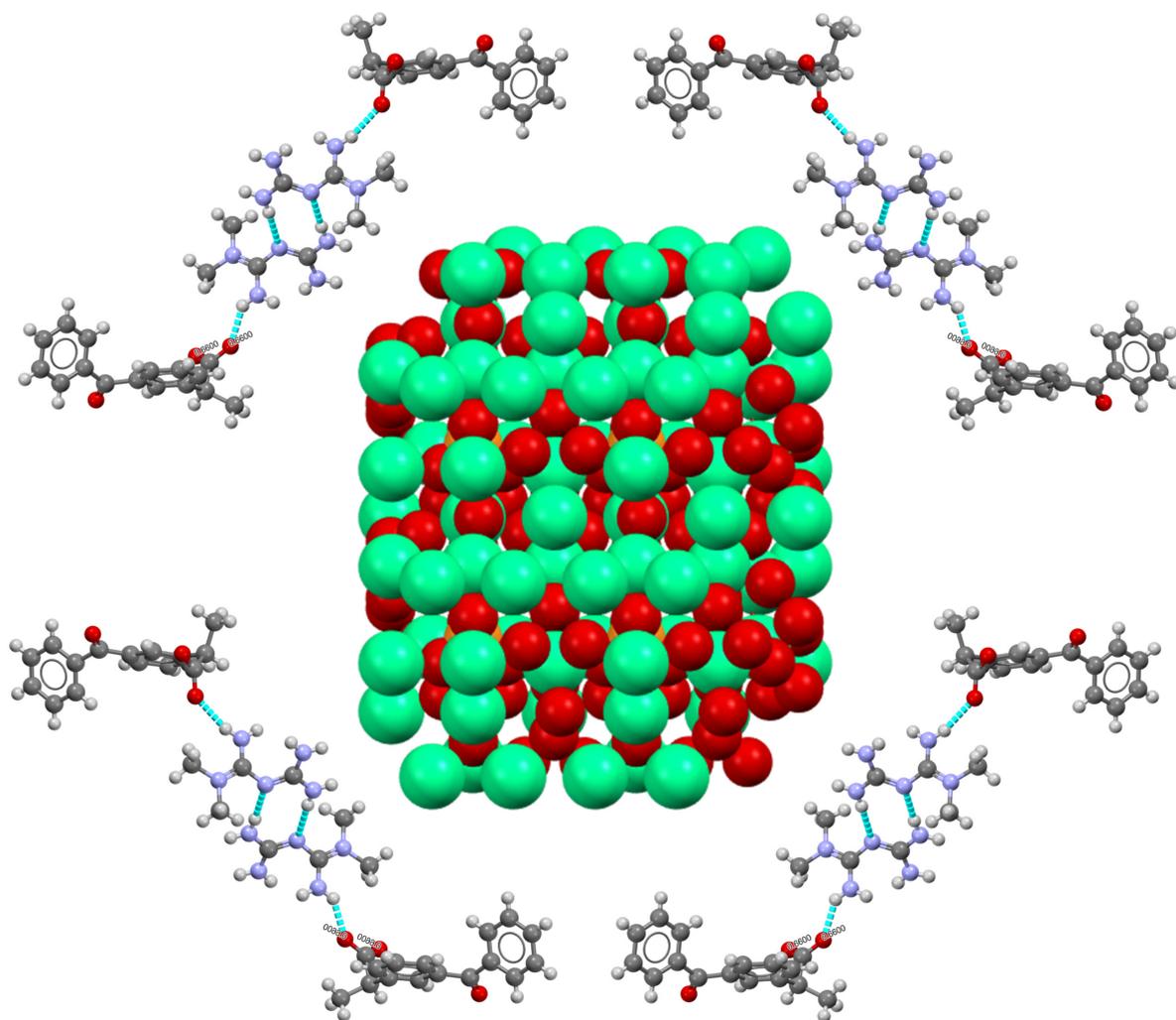
- (352) Tašić, J.; Nagy-Perjési, Z.; Takács, M. Multilevel Fuzzy Inference System for Estimating Risk of Type 2 Diabetes. *Mathematics* 2024, 12 (8), 1167. <https://doi.org/10.3390/math12081167>.
- (353) Pecoits-Filho, R.; Jimenez, B. Y.; Ashuntantang, G. E.; de Giorgi, F.; De Cosmo, S.; Groop, P. H.; Liew, A.; Hradsky, A.; Pontremoli, R.; Sola, L.; Ceriello, A. A Policy Brief by the International Diabetes Federation and the International Society of Nephrology. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2023, 203. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2023.110902>.
- (354) Powers, M. A.; Bardsley, J.; Cypress, M.; Duker, P.; Funnell, M. M.; Fischl, A. H.; Maryniuk, M. D.; Siminerio, L.; Vivian, E. Diabetes Self-Management Education and Support in Type 2 Diabetes: A Joint Position Statement of the American Diabetes Association, the American Association of Diabetes Educators, and the Academy of Nutrition and Dietetics. *Diabetes Care* 2015, 38 (7), 1372–1382. <https://doi.org/10.2337/dc15-0730>.
- (355) Moin, T.; Schmittiel, J. A.; Flory, J. H.; Yeh, J.; Karter, A. J.; Kruger, L. E.; Schillinger, D.; Mangione, C. M.; Herman, W. H.; Walker, E. A. Review of Metformin Use for Type 2 Diabetes Prevention. *Am. J. Prev. Med.* 2018, 55 (4), 565–574. <https://doi.org/10.1016/J.AMEPRE.2018.04.038>.
- (356) Viollet, B.; Guigas, B.; Sanz Garcia, N.; Leclerc, J.; Foretz, M.; Andreelli, F. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin: An Overview. *Clinical Science*. Portland Press March 1, 2012, pp 253–270. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>.
- (357) Rena, G.; Hardie, D. G.; Pearson, E. R. The Mechanisms of Action of Metformin. *Diabetologia* 2017, 60 (9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/S00125-017-4342-Z/FIGURES/3>.
- (358) McCreight, L. J.; Bailey, C. J.; Pearson, E. R. Metformin and the Gastrointestinal Tract. *Diabetologia*. Springer Verlag March 1, 2016, pp 426–435. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>.
- (359) Wilcock, C.; Bailey, C. J. Accumulation of Metformin by Tissues of the Normal and Diabetic Mouse. *Xenobiotica* 1994, 24 (1), 49–57. <https://doi.org/10.3109/00498259409043220>.
- (360) Hamdan, I. I.; Jaber, A. K. B.; Abushoffa, A. M. Development and Validation of a Stability Indicating Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Metformin Hydrochloride in Tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53 (5), 1254–1257. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.017>.
- (361) Gumieniczek, A.; Berecka-Rycerz, A.; Mroczek, T.; Wojtanowski, K. Determination of Chemical Stability of Two Oral Antidiabetics, Metformin and Repaglinide in the Solid State and Solutions Using LC-UV, LC-MS, and FT-IR Methods. *Molecules* 2019, 24 (24), 4430. <https://doi.org/10.3390/molecules24244430>.

- (362) Moore, R. A.; Chi, C. C.; Wiffen, P. J.; Derry, S.; Rice, A. S. C. Oral Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Neuropathic Pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd October 5, 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010902.pub2>.
- (363) Schreiber, A. K. Diabetic Neuropathic Pain: Physiopathology and Treatment. *World J. Diabetes* 2015, 6 (3), 432. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.432>.
- (364) Assan, R.; Heuclin, C.; Ganeval, D.; Bismuth, C.; George, J.; Girard, J. R. Metformin-Induced Lactic Acidosis in the Presence of Acute Renal Failure. *Diabetologia* 1977, 13 (3), 211–217. <https://doi.org/10.1007/BF01219702>.
- (365) Vecchio, S.; Giampreti, A.; Petrolini, V. M.; Lonati, D.; Protti, A.; Papa, P.; Rognoni, C.; Valli, A.; Rocchi, L.; Rolandi, L.; Manzo, L.; Locatelli, C. A. Metformin Accumulation: Lactic Acidosis and High Plasmatic Metformin Levels in a Retrospective Case Series of 66 Patients on Chronic Therapy. *Clin. Toxicol.* 2014, 52 (2), 129–135. <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.860985>.
- (366) Whelton, A. Nephrotoxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Physiologic Foundations and Clinical Implications. In *American Journal of Medicine*; Elsevier, 1999; Vol. 106, pp 13S-24S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00113-8).
- (367) Chan, N. N.; Fauvel, N. J.; Feher, M. D. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Metformin: A Cause for Concern? *Lancet* 1998, 352 (9123), 201. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)77806-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)77806-5).
- (368) Jia, L.; Wu, S.; Gong, J. A Tolbutamide Metformin Salt Based on Antidiabetic Drug Combinations: Synthesis, Crystal Structure Analysis and Pharmaceutical Properties. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 2019, 75 (9), 1250–1258. <https://doi.org/10.1107/S2053229619010647>.
- (369) Bian, X.; Jiang, L.; Gan, Z.; Guan, X.; Zhang, L.; Cai, L.; Hu, X. A Glimepiride-Metformin Multidrug Crystal: Synthesis, Crystal Structure Analysis, and Physicochemical Properties. *Molecules* 2019, 24 (20), 3786. <https://doi.org/10.3390/molecules24203786>.
- (370) Bian, X.; Jiang, L.; Zhou, J.; Guan, X.; Wang, J.; Xiang, P.; Pan, J.; Hu, X. Improving Dissolution and Cytotoxicity by Forming Multidrug Crystals. *Molecules* 2020, 25 (6), 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules25061343>.
- (371) Putra, O. D.; Furuishi, T.; Yonemochi, E.; Terada, K.; Uekusa, H. Drug-Drug Multicomponent Crystals as an Effective Technique to Overcome Weaknesses in Parent Drugs. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (7), 3577–3581. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00639>.
- (372) Li, M.; Sun, J.; Kuang, W.; Zhou, L.; Han, D.; Gong, J. Drug-Drug Multicomponent Crystals of Epalrestat: A Novel Form of the Drug Combination and Improved Solubility and Photostability of Epalrestat. *Cryst. Growth Des.* 2022, 22 (8), 5027–5035. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.2c00533>.
- (373) Feng, W. Q.; Wang, L. Y.; Gao, J.; Zhao, M. Y.; Li, Y. T.; Wu, Z. Y.; Yan, C. W. Solid State and Solubility Study of a Potential Anticancer Drug-Drug Molecular Salt of Diclofenac and Metformin.

- J. Mol. Struct. 2021, 1234, 130166. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2021.130166>.
- (374) Pérez-Fernández, R.; Fresno, N.; Goya, P.; Elguero, J.; Menéndez-Taboada, L.; García-Granda, S.; Marco, C. Structure and Thermodynamical Properties of Metformin Salicylate. *Cryst. Growth Des.* 2013, 13 (4), 1780–1785. https://doi.org/10.1021/CG400150F/SUPPL_FILE/CG400150F_SI_001.CIF.
- (375) Zhou, W. X.; Zhao, H. W.; Chen, H. H.; Zhang, Z. Y.; Chen, D. Y. Characterization of Drug-Drug Salt Forms of Metformin and Aspirin with Improved Physicochemical Properties. *CrystEngComm* 2019, 21 (25), 3770–3773. <https://doi.org/10.1039/c9ce00377k>.
- (376) Tong, W. Q.; Whitesell, G. In Situ Salt Screening - A Useful Technique for Discovery Support and Preformulation Studies. *Pharm. Dev. Technol.* 1998, 3 (2), 215–223. <https://doi.org/10.3109/10837459809028498>.
- (377) Cruz-Cabeza, A. J. Acid-Base Crystalline Complexes and the PKa Rule. *CrystEngComm* 2012, 14 (20), 6362–6365. <https://doi.org/10.1039/c2ce26055g>.
- (378) Diniz, L. F.; Carvalho, P. S.; Gonçalves, J. E.; Diniz, R.; Fernandes, C. Solid-State Landscape and Biopharmaceutical Implications of Novel Metformin-Based Salts. *New J. Chem.* 2022, 46 (28), 13725–13737. <https://doi.org/10.1039/D2NJ00453D>.
- (379) Somasundaram, S.; Rafi, S.; Hayllar, J.; Sigthorsson, G.; Jacob, M.; Price, A. B.; Macpherson, A.; Mahmud, T.; Scott, D.; Wrigglesworth, J. M.; Bjarnason, I. Mitochondrial Damage: A Possible Mechanism of the “topical” Phase of NSAID Induced Injury to the Rat Intestine. *Gut* 1997, 41 (3), 344–353. <https://doi.org/10.1136/gut.41.3.344>.
- (380) Braga, D.; Maini, L.; Grepioni, F. Mechanochemical Preparation of Co-Crystals. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42 (18), 7638–7648. <https://doi.org/10.1039/c3cs60014a>.
- (381) Kálmán, A.; Párkányi, L.; Argay, G. Classification of the Isostructurality of Organic Molecules in the Crystalline State. *Acta Crystallogr. Sect. B* 1993, 49 (6), 1039–1049. <https://doi.org/10.1107/S010876819300610X>.
- (382) Oliveira, M. A.; Peterson, M. L.; Klein, D. Continuously Substituted Solid Solutions of Organic Co-Crystals. In *Crystal Growth and Design*; American Chemical Society, 2008; Vol. 8, pp 4487–4493. <https://doi.org/10.1021/cg800454r>.
- (383) Spek, A. L. Structure Validation in Chemical Crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2009, 65 (2), 148–155. <https://doi.org/10.1107/S090744490804362X>.
- (384) Oh, D. H.; Park, Y. J.; Kang, J. H.; Yong, C. S.; Choi, H. G. Physicochemical Characterization and in Vivo Evaluation of Flurbiprofen-Loaded Solid Dispersion without Crystalline Change. *Drug Deliv.* 2011, 18 (1), 46–53. <https://doi.org/10.3109/10717544.2010.509365>.

CAPÍTULO 5

SALES MOLECULARES: CAPACIDAD PARA AUMENTAR LA CARGA DE FARMACOS EN NANOPARTÍCULAS DE APATITO



5.1. Introducción

El uso de nanopartículas como vehículos transportadores de fármacos ha demostrado tener un excelente potencial para solventar problemas específicos de diferentes APIs.^{385,386} En este campo, las nAp han demostrado una gran capacidad para aumentar la biodisponibilidad, la absorción y distribución de fármacos, proporcionando una liberación sostenida y controlada, que minimiza los efectos secundarios y la toxicidad asociada a fenómenos de acumulación.^{23,203} Además, su tamaño nanométrico, proporciona un área superficial extensa que, sumado a las numerosas sustituciones iónicas en superficie, permiten la adsorción superficial de grandes concentraciones de moléculas orgánicas. Estas características, además de las ya demostradas excelentes propiedades biológicas de las nAp, han permitido su aplicación en el transporte de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades como el osteosarcoma, la osteoartritis y afecciones óseas.^{23,203,258,279,387}

Sin embargo, la solubilidad del agente incorporado en las nanopartículas, se presenta como un factor limitante que influye directamente en la cantidad de material que puede incorporarse eficazmente.^{299,388,389} Esta problemática, provoca que la mayoría de fármacos de la clase II y IV del SCB sean realmente complejos de asociar con vehículos de transporte, ya que la concentración en solución que se puede alcanzar es ínfima en comparación con la capacidad de carga soportada.^{152,390} Un enfoque novedoso, que se presenta en este capítulo, es la combinación de vehículos de transporte como las nAp, con el uso de MMFs. De este modo, la síntesis de un MMF permitirá aumentar la solubilidad del API en cuestión, incrementando la capacidad de carga del mismo.

En este capítulo se recoge una prueba de concepto que versa sobre el uso de una nueva sal molecular tipo fármaco-fármaco de DKT (AINE) y MTF (**Figura 5.1**), para operaciones de carga en nAp biomiméticas, con el objetivo final de estudiar la capacidad del MMF para incrementar la concentración de API incorporado en las nanopartículas.

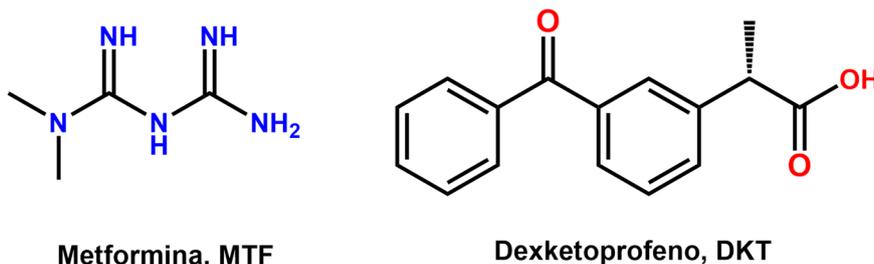


Figura 5.1 Diagramas moleculares de MTF y DKT.

5.2. Síntesis de materiales

5.2.1. Síntesis de nanopartículas de apatito

Las nAp se obtuvieron mediante descomplejación térmica de disoluciones Ca^{2+} /cit/fosfato/carbonato. En este procedimiento 50 mL de una solución de Na_2HPO_4 (0.06 M) y Na_2CO_3 (0.1 M) se combinaron con 50 mL de una solución de CaCl_2 (0.1M) y $\text{Na}_3(\text{cit})$ (0.2 M), trabajando a 4 °C. El pH de la mezcla resultante se ajustó a 8.5 usando HCl diluido. Inmediatamente, la solución se llevó a un baño de agua a 80 °C. Después de 4 horas, la suspensión de nAp se llevó a una estufa a 80 °C y se dejó durante 96 horas, dando el tiempo suficiente para la maduración del Ap. Finalmente, las nAp se recuperaron mediante varios ciclos de centrifugación y lavado con agua miliQ (6 ciclos a 9.000 rpm durante 9 minutos cada uno). El precipitado obtenido se liofilizó durante 12 horas (-50 °C y 3 mbar).^{208,209}

5.2.2. Síntesis de MTF–DKT

Para la síntesis de MTF–DKT se ha seguido la misma metodología propuesta en el capítulo 4.3, por lo que el diseño experimental de este MMF se fundamenta en la misma revisión bibliográfica e interacciones ya descritas en las sales de MTF–AINEs. A su vez, la MTF se obtuvo mediante neutralización de MTF·HCl con NaOH en 2-propanol (ver metodología en el capítulo 4.3.2.2).

La síntesis mecanoquímica de MTF–DKT se realizó mediante operaciones de LAG en un molino de bolas Retsch MM2000 a una frecuencia de 25 Hz de agitación y temperatura ambiente. En estas operaciones, una mezcla 1:1 de MTF (0.5 mmol, 64.58 mg) y DKT (0.5 mmol, 127.145 mg), 100 μL de etanol y 2 bolas de acero inoxidable de 7 mm de diámetro, se colocaron en jarras de acero inoxidable y se agitaron durante 30 minutos. Todos los productos obtenidos, han sido analizado mediante PXRD para determinar la formación de un nuevo MMF, su cristalinidad y su pureza. A su vez, todas las operaciones se han repetido varias veces para asegurar la reproducibilidad de la reacción.

Los cristales de MTF–DKT se obtuvieron mediante evaporación lenta (1 día) de soluciones saturadas del producto del LAG usando etanol como disolvente. Los cristales se separaron cuidadosamente de la solución y se midieron en SCXRD.

5.2.2. Síntesis de Ap-MTF-DKT

Las nAp funcionalizadas con MTF-DKT, se obtuvieron mediante deposición química, siguiendo la metodología descrita por F. J. Carmona *et al.*³⁹¹ En estos ensayos las nAp se mezclaron con una solución acuosa de MTF-DKT, dando lugar a una suspensión acuosa de nAp. Específicamente, se combinaron 50 mg de nanopartículas con 1 mL de solución, con concentraciones crecientes de MTF-DKT. Las concentraciones utilizadas para la carga de las nAp se establecieron después de evaluar la solubilidad de la sal. Con el objetivo de poder establecer una comparación, en lo que a concentración de DKT incorporado respecta, se realizaron ensayos paralelos con soluciones de DKT. Después de 4 horas en agitación, la suspensión se liofilizó durante 24 horas (-50 °C y 3 mbar) y el precipitado sólido se almacenó a temperatura ambiente hasta su caracterización.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Evaluación de la formación de MTF-DKT

Para evaluar la formación del MMF se realizaron medidas de difracción de rayos X de polvo. La **figura 5.2** muestra los difractogramas de PXRD de DKT, MTF y el producto obtenido del LAG de una mezcla estequiométrica 1:1 de MTF y DKT, utilizando etanol como aditivo líquido. Cuando se compara con los componentes de la reacción, el producto presenta un patrón de PXRD diferente indicando la formación de un nuevo material cristalino. La ausencia de reflexiones atribuidas a MTF y DKT, indica la correcta estequiometría de la reacción y la conversión completa de los componentes a esta nueva fase. Finalmente, el producto del LAG se ha utilizado para obtener monocristales que permitan el estudio de la estructura cristalina mediante SCXRD. El difractograma de polvo simulado a partir de esta estructura se ha utilizado para confirmar la pureza, cristalinidad y reproducibilidad de la fase obtenida por LAG.

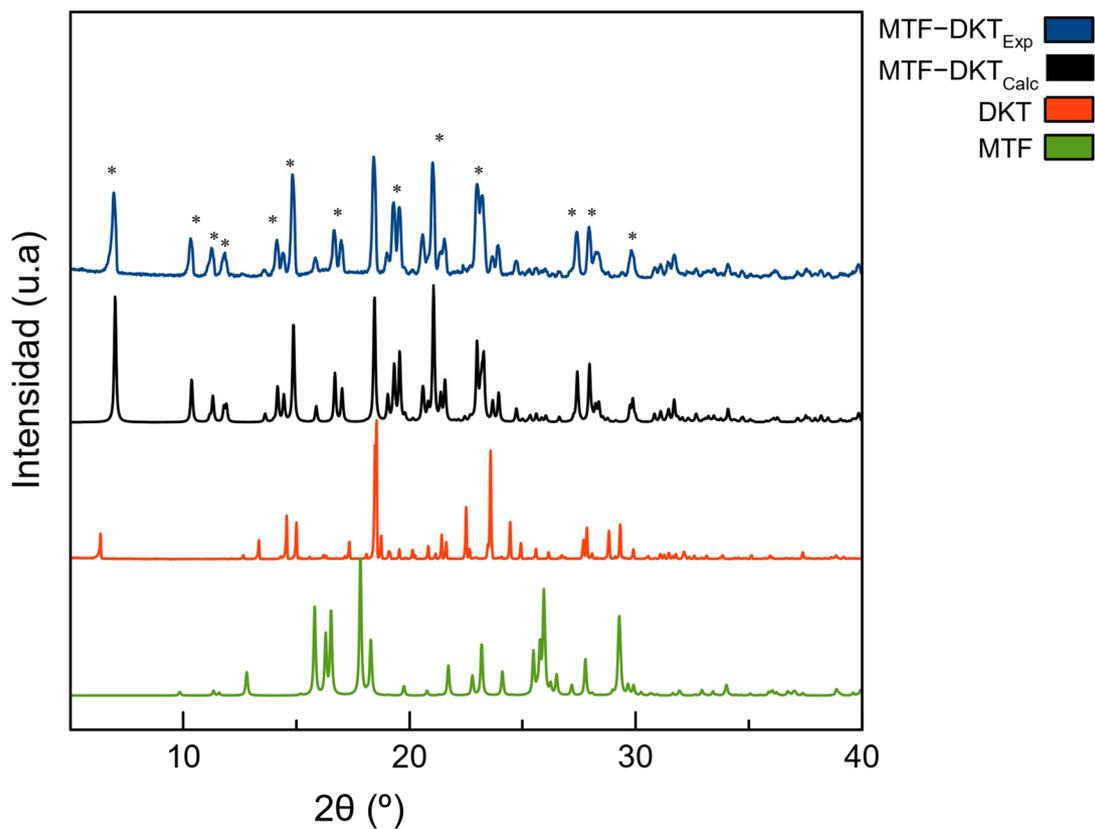


Figura 5.2. Difractogramas de PXRd de MTF, DKT, del producto de la reacción de LAG y del difractograma simulado a partir de la estructura cristalina de MTF-DKT.

La espectroscopía FTIR es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de nAp ya que permite evaluar la adsorción superficial y la internalización de moléculas orgánicas. Pero, además, esta técnica complementaria a PXRd, también proporciona información de valor sobre los grupos funcionales implicados en la formación de MMFs, lo que permite discernir entre la formación de cocrisales o sales. La **figura 5.3** muestra los espectros FTIR de DKT, MTF y el producto obtenido del LAG de una mezcla estequiométrica 1:1 de MTF y DKT.

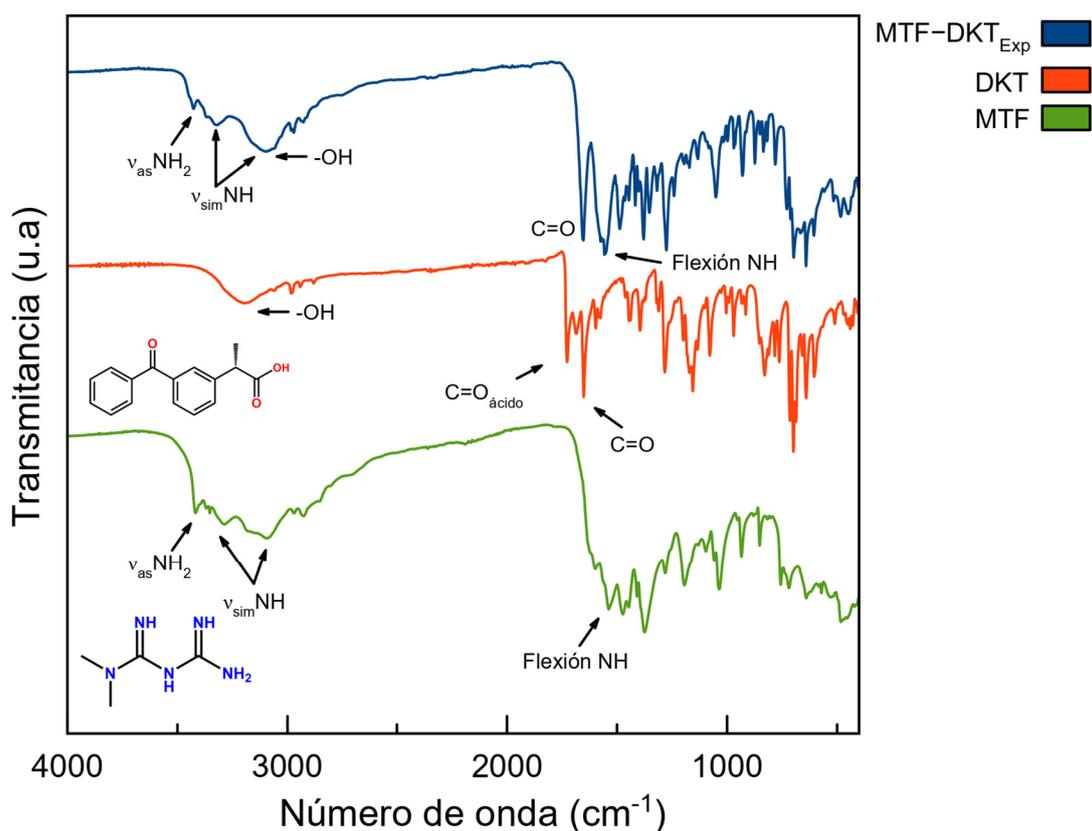


Figura 5.3. Espectros FTIR de MTF, DKT y el producto de la reacción de LAG.

DKT presenta una banda intensa y definida en 1727 cm^{-1} correspondiente al modo de tensión asimétrica del grupo $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico, además de una señal en 1652 cm^{-1} correspondiente al modo de tensión del grupo $\text{C}=\text{O}$ (cetona). En la región de 3200 cm^{-1} se observa una banda ancha que se atribuye a los modos de tensión de los grupos $-\text{OH}$. Tras la reacción con MTF, la banda de tensión asimétrica del grupo $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico se desplaza por completo hacia números de onda más bajas, lo que indica la ionización del grupo y la posible formación de una sal molecular. Además, las señales de los grupos $\text{C}=\text{O}$ y $-\text{OH}$ se desplazan a 1653 y 3158 cm^{-1} respectivamente indicando cambios en los modos de vibración debido a interacciones con otros grupos funcionales. Al observar el espectro de MTF, se observa una serie de bandas entre 3420 y 3090 que se atribuyen a las tensiones asimétricas y simétricas de los grupos. Además, se observa una banda menos definida en 1537 cm^{-1} asociada a los modos de flexión de los grupos $-\text{NH}$. Todas estas señales sufren desplazamientos tras la reacción con DKT, lo que indica la interacción de estos grupos funcionales. Específicamente en el espectro de MTF-DKT se observa una banda doble característica en 1574 y 1557 cm^{-1} asociada a los modos de

flexión de los grupos –NH. Esta doble banda no es apreciable en MTF por lo que es distintiva de esta nueva fase, y puede ser utilizada como referencia para los estudios de carga en nAp.

5.3.2. Estructura cristalina de MTF–DKT

Los cristales obtenidos han permitido el estudio y la determinación estructural de esta sal, mediante SXCRD, Estos datos confirman la transferencia de un protón del ácido carboxílicos de DKT al grupo nitrogenado básico de MTF, dando como resultado la formación de la sal MTF–DKT. El mapa experimental de densidad electrónica corrobora estos resultados, que se confirman mediante el análisis de las distancias de enlace C–O del grupo carboxilato del AINE, que mostraron valores de ΔD_{C-O} similares a los observados en sales, que van desde 0.008 a 0.024 Å. Los datos cristalográficos se resumen en la **tabla 5.1**. La información sobre los enlaces de hidrógeno que se recogen en la **tabla 5.2** al final de esta sección.

Tabla 5.1. Datos cristalográficos y detalles del refinamiento de MTF–DKT

Compuesto	MTF–DKT
Fórmula	C ₄₀ H ₅₀ N ₁₀ O ₆
Peso molecular	766.90
Sistema cristalino	298(2)
Grupo espacial	Monoclínico
a/Å	P2 ₁ (4)
b/Å	14.059(3)
c/Å	9.178(2)
α/°	16.920(4)
β/°	90
γ/°	112.416(7)
V/Å³	90
Z	2018.3(8)
Dc/g cm⁻³	2
F(000)	816
Reflexiones tomadas	39277
Reflexiones únicas	7068 [R(int) = 0.0779]
Datos / restricciones / parámetros	7068/1/531
Goodness-of-fit on F²	1.002
R₁ (I > 2σ(I))	0.0483, 0.1111
wR₂ (I > 2σ(I))	0.0874, 0.1331

MTF–DKT cristaliza en el sistema monoclinico con grupo espacial $P2_1$. La unidad asimétrica contiene dos cationes MTF^+ (MTF1, MTF2) y dos aniones DKT^- (DKT1, DKT2), químicamente equivalentes pero cristalográficamente independientes. En primer lugar, el ángulo diedro definido por el grupo guanidinio y el grupo dimetilamina es diferente entre ambas MTF, en MTF1 este ángulo es de 56.32° mientras que en MTF2 es de 55.57° . En segundo lugar, la molécula DKT1 presenta un desorden del grupo carboxilato, el cual se dispone en dos posiciones alternas. En la **figura 5.4a** se representa la unidad asimétrica de esta sal molecular mostrando el componente del anión DKT desordenado con mayor contribución (66%). Las moléculas de MTF^+ interactúan con DKT^- mediante un enlace de hidrógeno electrostático discreto que involucra los grupos guanidinio...carboxilato, formando el heterosintón $D_1^1(2)$. Los pares MTF–DKT se unen entre sí mediante enlaces de hidrógenos entre los grupos amina de los cationes de MTF^+ $R_2^2(8)$ que se establecen entorno a un eje de inversión. A su vez, las unidades asimétricas se asocian mediante interacciones de hidrógeno adyacentes $R_2^2(8)$ que involucran el grupo carboxilo de DKT^- y el grupo -NH de MTF^+ , dando lugar a cadenas onduladas que se extienden a lo largo del eje b . En estas cadenas, las moléculas de DKT^- quedan en la parte externa, mientras que las moléculas de MTF^+ se protegen en el interior (**Figura 5.4b**) lo cual tendrá implicaciones en las propiedades fisicoquímicas de la sal. Estas cadenas se asocian mediante interacción $CH\cdots\pi$ para formar capas 2D que se extienden paralelas al plano (1, 0, -1) del cristal (**Figura 5.4c**). Finalmente, estas capas se apilan dando lugar a la estructura supramolecular 3D, que se mantiene por interacciones no covalentes hidrofóbicas débiles.

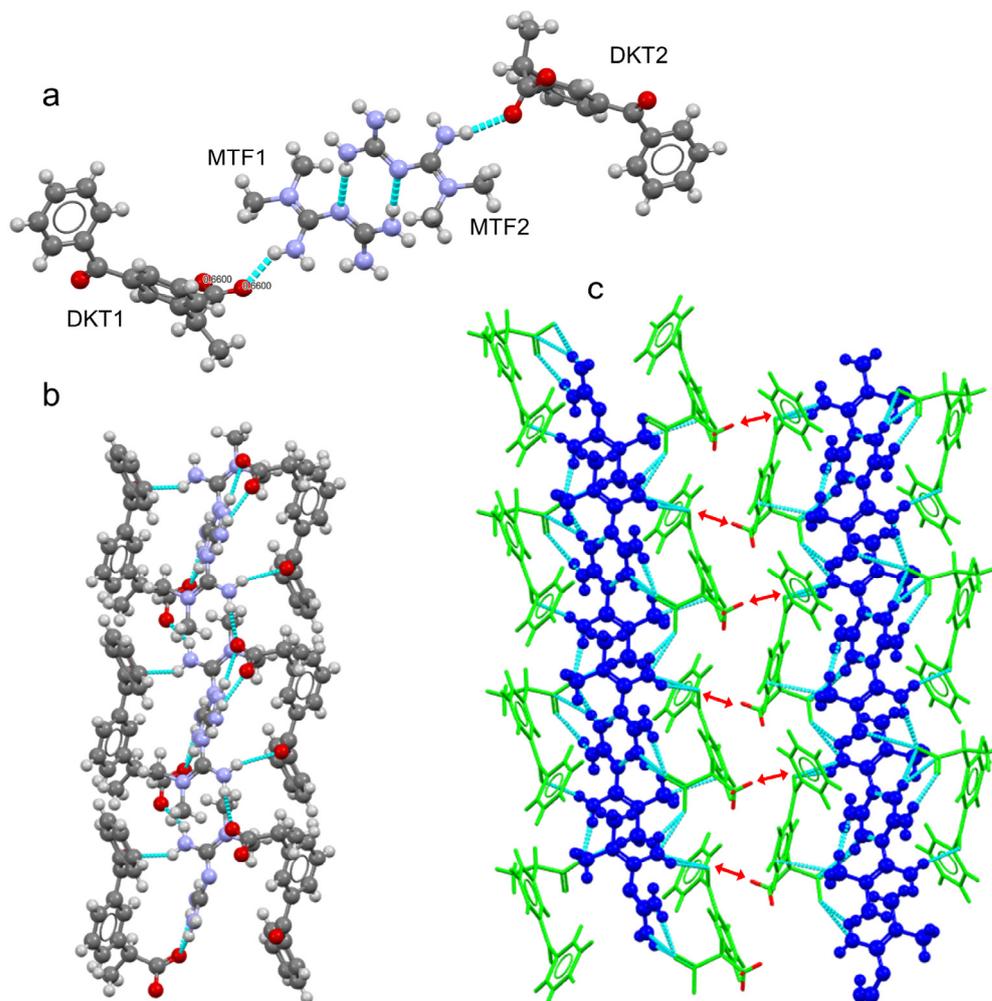


Figura 5.4. (a) Unidad asimétrica de MTF–DKT. (b) Estructura de cadena ondulada 1D observada en MTF–DKT. (c) Formación de capas 2D mediante interacciones $\text{CH}\cdots\pi$ entre cadenas adyacentes. MTF^+ se representa en azul y DKT^- en verde.

Tabla 5.2. Enlaces de hidrógeno presentes en MTF–DKT

MTF–DKT	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
	N(20)-H(20A)...O(5A) ^{#1}	0.86	2.08	2.857(17)	150.4
	N(20)-H(20A)...O(5B) ^{#1}	0.86	2.09	2.92(4)	163.9
	N(20)-H(20B)...O(5A) ^{#2}	0.86	2.16	2.865(14)	139.2
	N(20)-H(20B)...O(5B) ^{#2}	0.86	2.40	3.05(5)	133.0
	N(22)-H(22A)...O(5A) ^{#1}	0.86	2.15	2.908(17)	147.3
	N(22)-H(22B)...N(51)	0.86	2.15	3.003(6)	173.8
	N(25)-H(25A)...O(4A)	0.86	1.92	2.642(9)	140.3
	N(25)-H(25A)...O(4B)	0.86	2.06	2.89(3)	161.5
	N(25)-H(25B)...O(13) ^{#1}	0.86	2.44	3.029(6)	126.1
	C(55)-H(55A)...O(32)	0.96	2.45	3.160(6)	130.6
	N(1)-H(1D)...O(32)	0.86	2.05	2.892(6)	164.8
	N(1)-H(1E)...O(41) ^{#3}	0.86	2.42	3.100(5)	137.0
	N(49)-H(49A)...N(23)	0.86	2.18	3.038(6)	173.4
	N(49)-H(49B)...O(32) ^{#3}	0.86	2.11	2.959(5)	169.6
	N(50)-H(50A)...O(33) ^{#3}	0.86	2.11	2.946(6)	162.8
Operaciones de simetría:					
#1 x,y+1,z #2 -x+2,y+1/2,-z+1 #3 x,y-1,z					

5.3.3. Estudio de las propiedades de MTF–DKT

5.3.3.1. Estabilidad térmica y termodinámica de MTF–DKT

Para evaluar la estabilidad térmica y determinar el punto de fusión de MTF–DKT se ha realizado un análisis mediante DSC. La **figura 5.5a** muestra las curvas de DSC y los eventos endotérmicos que se producen durante el experimento, los cuales corresponden al punto de fusión del material. La presencia de un solo evento endotérmico bien definido confirma la estabilidad de la sal por debajo del punto de fusión, ya que no se producen transformaciones o fenómenos de disociación, y la pureza de la fase, corroborando los resultados obtenidos en PXRD. En este caso específico, MTF–DKT presenta un punto de fusión de 152.9 °C, un valor que indica una notable mejora de la estabilidad térmica de ambos APIs llegando a duplicar la temperatura de fusión de DKT (75 °C).

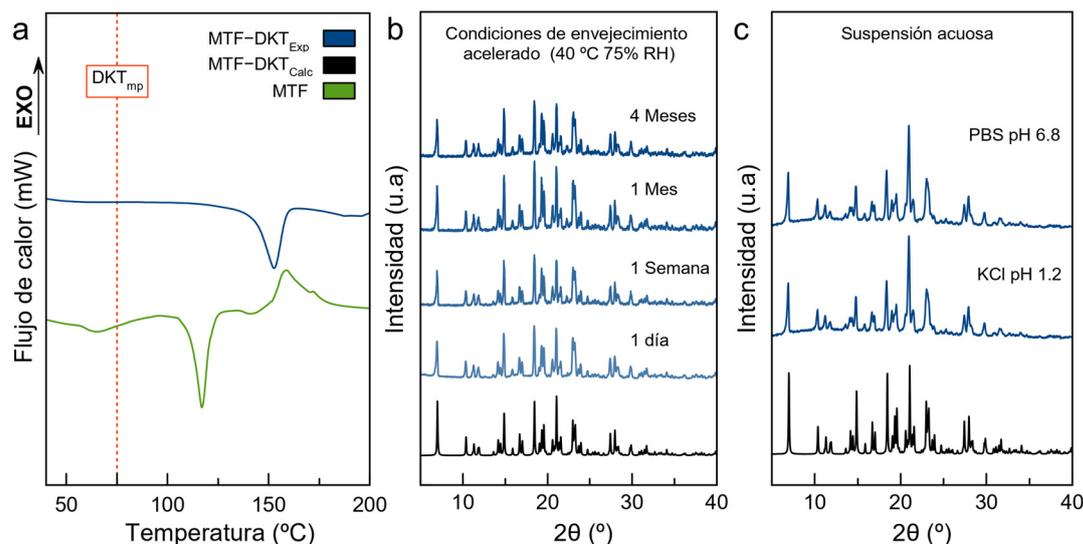


Figura 5.5 (a) Curvas de DSC. (b) Difractogramas de PXRd de MTF–DKT en condiciones de envejecimiento acelerado y (c) en suspensión acuosa (Buffer PBS pH 6.8 y KCl pH 1.2).

Siguiendo el flujo de trabajo, la estabilidad de MTF–DKT se ha evaluado en condiciones de envejecimiento acelerado, para descartar procesos de disociación, hidratación o transición a polimorfos. Para ello, MTF–DKT ha sido expuesta a condiciones de alta humedad y temperatura (40 °C y 75% de HR) durante 4 meses. La **figura 5.5b** muestra los patrones de PXRd de la sal bajo estas condiciones. Al igual que en el capítulo anterior, MTF no ha podido ser evaluada, ya que su baja estabilidad y su alto grado de higroscopicidad se traducen en fenómenos de licuación en las primeras horas de exposición. Sin embargo, el proceso de salificación con DKT confiere a MTF una excelente protección contra la humedad. La estabilidad general de la nueva sal se demuestra por la ausencia de cambios en el difractograma de PXRd o cambios en la intensidad del mismo (cambios en la cristalinidad).

Por su parte la estabilidad termodinámica de MTF–DKT se ha evaluado mediante experimentos de *slurry* en suspensiones acuosas (PBS pH 6.8 y KCl pH 1.2) a 25 °C. La **figura 5.5c** muestra los difractogramas de PXRd para los sólidos, filtrados y secados al aire, después 24 horas de agitación. En ningún caso se aprecian cambios visibles de color y textura. Tampoco se observan cambios en los difractogramas que puedan estar asociados con transiciones de fases, o fenómenos de hidratación, lo que indica que la nueva sal molecular obtenida, es estable en solución acuosa.

La mejora de estabilidad general con respecto a MTF, se debe al ordenamiento molecular en la estructura cristalina. Como se ha estudiado en el apartado anterior, MTF–DKT se dispone formando cadenas infinitas, formadas por moléculas de DKT en el exterior y moléculas de MTF en el interior. Esta disposición permite que las moléculas de DKT actúen como cubierta protectora que protege a MTF del ataque de moléculas de agua y otros agentes en el medio. Además de ofrecer una gran resistencia frente a la humedad, los resultados de DSC han demostrado una gran mejora de estabilidad térmica frente a ambos APIs. El elevado punto de fusión de esta fase es una consecuencia la intrincada red de puentes de hidrógenos que conectan las moléculas de MTF y DKT en la estructura cristalina. Estos resultados ya han sido observados en diferentes materiales MMFs presentados en esta tesis, lo que demuestra el gran potencial de este tipo de sólidos farmacéuticos.

5.3.3.2. Solubilidad y perfil de disolución de MTF–DKT

Teniendo en cuenta el objetivo de este capítulo, los estudios de solubilidad se centran en la cuantificación de DKT, ya que MTF presenta una excelente solubilidad, por lo que no supone un factor limitante para la carga de nanopartículas. El perfil de disolución y la solubilidad en equilibrio de DKT se han evaluado condiciones fisiológicas relevantes en la adsorción y el metabolismo de fármacos (solución acuosa buffer PBS pH 6.8 y KCl pH 1.2). La **tabla 5.1** muestra los valores de solubilidad de MTF–DKT y DKT obtenidos por HPLC. Todos los valores de absorbancia se han tomado en el máximo de absorbancia de DKT, 260 nm.

Tabla 5.3. Concentración de DKT (mg/mL) en su forma nativa y en la sal de MTF–DKT.

(mg/mL)		DKT		DKT en MTF-DKT	
Tiempo (min)	pH 1.2	pH 6.8	Tiempo (min)	pH 1.2	pH 6.8
1	0.06	0.21	1	98.15	377.61
3	0.09	0.23	3	148.36	469.13
6	0.10	0.24	6	168.33	566.84
10	0.10	0.22	10	168.62	567.80
30	0.10	0.23	30	150.32	483.90
60	0.10	0.21	60	161.87	455.30
120	0.10	0.21	120	160.97	456.07
1440	0.10	0.21	1440	161.43	456.43

El valor de solubilidad termodinámica de DKT en PBS pH 6.8 es de 0.21 mg/mL, lo cual está acorde a lo reportado en la bibliografía confirmando la validez del método.³⁹²⁻³⁹⁴ Por su parte, la concentración de DKT en solución acuosa PBS pH 6.8, alcanzada por la sal MTF-DKT es de 456 mg/mL, lo que supone una mejora 2150 veces con respecto a DKT. En una solución KCl pH 1.2, se han obtenido valores de solubilidad de 0.1 mg/mL para DKT, mientras que la sal permite alcanzar concentraciones de 161 mg/mL multiplicando la solubilidad en pH ácido 1600 veces. Se debe destacar, que la forma del perfil de disolución es similar en DKT y MTF-DKT, ya que ambos muestran un comportamiento de *spring-parachute*, con una sobresaturación en los primeros minutos. En la sal, este fenómeno permite alcanzar concentraciones pico de DKT de 567 y 168 mg/mL en pH 6.8 y 1.2 respectivamente. Estos resultados muestran una solubilidad de la sal excepcional, que permite incrementar enormemente la concentración de DKT en solución y en consecuencia la biodisponibilidad del fármaco.

Esta gran mejora de solubilidad también es una consecuencia de la disposición de los APIs en la estructura supramolecular de la sal ya que las moléculas de MTF se disponen en el interior de las cadenas onduladas DKT-MTF. La mayor solubilidad de MTF facilita la disgregación de dichas cadenas y la liberación de las moléculas de DKT al medio. La presencia de MTF en el interior de las cadenas produce la disrupción de los dímeros de DKT:DKT fuertemente unidos en su estructura nativa, potenciando la solubilidad.

Aunque la cuantificación no se centra en MTF, la estabilidad termodinámica demostrada en el apartado anterior permite estimar la solubilidad de MTF en estos ensayos, teniendo en cuenta el peso molecular de MTF y la estequiometría 1:1 de la sal. En solución ácida KCl, MTF alcanza una concentración de 54 mg/mL, mientras que en PBS, se alcanza concentraciones en equilibrio de 150 mg/mL, y una concentración pico de 191 mg/mL. Estos valores son comparables a la solubilidad de MTF·HCl en condiciones fisiológicas, sin embargo, en MTF-DKT se produce la sustitución de iones Cl⁻ por un API con actividad terapéutica intrínseca.

5.3.4. Nanopartículas de apatito dopadas con MTF–DKT

La ruta más común para la obtención de nAp dopadas, se basa en la incorporación *in situ* del agente dopante durante el proceso de síntesis de las nanopartículas en un ensayo *one-pot*. Esta metodología se ha llevado a cabo en los capítulos 3.1 y 3.2 para el desarrollo de nAp funcionalizadas con moléculas de citrato y dopadas con iones metálicos. Sin embargo, en este capítulo la incorporación de DKT y, principalmente, MTF–DKT se antoja más compleja por una serie de consideraciones.

Las nAp utilizadas para este estudio, se obtienen mediante descomplejación térmica de soluciones Ca^{2+} /cit/fosfato/carbonato a 80 °C. La incorporación de citrato en las nAp, proporciona un carácter biomimético que mejora las propiedades biológicas del material y añade grupos funcionales en superficie que ayudan a la adsorción de otras moléculas durante el dopaje. Sin embargo, la presencia de citrato en el medio de reacción, también representa una competencia para DKT en la formación de sales con MTF. Esto ha sido demostrado en trabajos paralelos ajenos a esta tesis, mediante la formación de la sal MTF–citrato.³²⁴ Además la naturaleza básica fuerte de la MTF provoca que esta molécula sea muy reactiva y propensa a la salificación ya sea con contraiones orgánicos o inorgánicos. Por último las altas temperaturas utilizadas durante la síntesis de las nAp (80°C) son perjudiciales para moléculas orgánicas termolábiles como MTF, la cual ha demostrado ser muy inestable bajo condiciones de alta humedad y temperatura. En definitiva la incorporación de MTF y DKT, ya sea como agentes libres o en la fase MTF–DKT, no es viables para un dopaje *one-pot* de las nAp, ya que se afectaría gravemente a la formación y la estabilidad de la sal MTF–DKT, a las propiedades de las nAp sintetizadas y al rendimiento de carga de las mismas.

Una metodología alternativa que permite evitar estos problemas y maximizar la carga de DKT, es la propuesta por F. J Carmona *et al.*³⁹¹ Estos autores proponen la funcionalización postsíntesis de nanopartículas, mediante precipitación química. Esta metodología, evita alterar las propiedades de las nanopartículas, pero además evita la pérdida de rendimiento de dopaje debido a los ciclos de lavado de las nanopartículas. De esta manera se garantiza un máximo rendimiento de carga, ya que toda la cantidad de agente dopante permanece ligada a la superficie de las NPs y/u ocluida en el material. En un ensayo típico, se prepara una solución acuosa de la molécula que se desea incorporar. A esta solución se le añade una determinada cantidad de nanopartículas, formando una

suspensión que es agitada. Finalmente, tras la agitación y homogenización de la suspensión, se produce la precipitación química del dopante sobre las nanopartículas mediante liofilización de la suspensión. Esta metodología permite obtener una gran eficiencia de carga, siempre que la molécula en cuestión tenga la solubilidad acuosa necesaria para alcanzar dicha concentración.

Siguiendo esta propuesta, el primer paso en el estudio de carga de DKT y MTF-DKT es realizar un cribado para identificar la cantidad máxima de agente dopante que soportan las nAp. 50 mg de nAp se han mezclado con 1 mL de solución con concentraciones crecientes de DKT y MTF-DKT. Tras 4 horas de agitación, la suspensión es liofilizada y analizada mediante PXR. La **figura 5.5a** muestra los difractogramas PXR de Ap-MTF-DKT obtenidos en un rango de concentraciones de 1 a 50 mg/mL. La coprecipitación de las nAp con el agente dopante en fase cristalina indica que se ha superado el límite de carga en las nAp, y por lo tanto, el producto es una mezcla de fases de Ap-dopado y dopante en exceso.

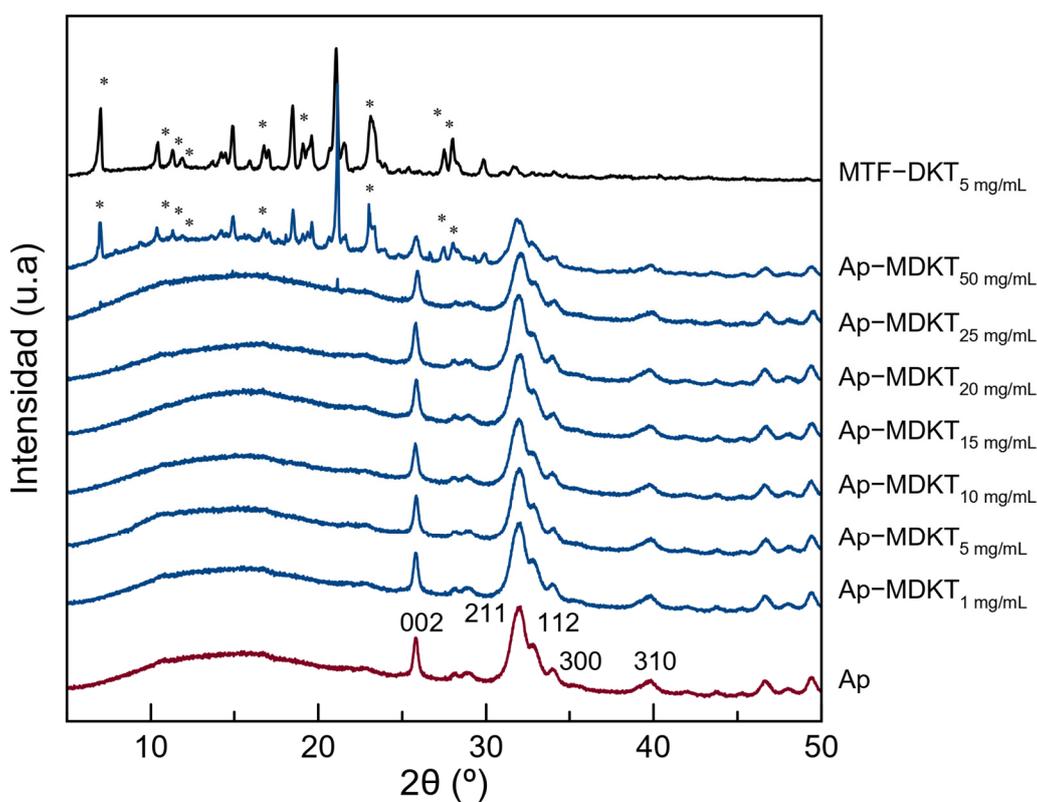


Figura 5.6. Difractogramas PXR de las muestras Ap-MTF-DKT.

A concentraciones inferiores a 25 mg/mL de MTF-DKT, los difractogramas muestran las reflexiones fundamentales del Ap (PDF 01-1008), $2\theta = 25.87^\circ$ (plano (002)), 31.77° (211), 32.19° (112), 32.90° (300), 33.9° (202) y 39.81° (310). Además, el tratamiento de precipitación química por liofilización no afecta a la cristalinidad o el tamaño nanométrico de las nAp, ya que no se aprecian cambios significativos en su patrón de polvo. Cuando se utiliza una concentración de 25 mg/mL de MTF-DKT se observa la aparición de señales de poca intensidad que se corresponden con MTF-DKT. Estas señales se hacen mucho más evidentes cuando se aumenta la concentración a 50 mg/mL ya que se produce la precipitación masiva de la sal en fase cristalina. Paralelamente, y con el objetivo de descartar la precipitación amorfa MTF-DKT, se ha realizado el mismo protocolo utilizando soluciones de MTF-DKT en ausencia de nAp. El patrón de polvo de la liofilización de una solución de 5 mg/mL de MTF-DKT se representa en **figura 5.5a**. Estos resultados indican que la concentración máxima de MTF-DKT aceptada por las nAp es de 20 mg/mL. Esta concentración representa un 28.57% en peso respecto a la cantidad total de precipitado (nAp+dopante). En este caso, el agente dopante es un MMF, por lo que para comparar la cantidad de carga de DKT con el API de referencia, se debe tener en cuenta que DKT presenta una participación en peso del 66.3% en el conjunto MTF-DKT, por lo tanto, la concentración máxima de DKT (en fase sal) incorporada en las nAp es de 13.26 mg/mL, un 18.95 %w/w. Todos los valores de concentraciones utilizados en estos ensayos, así como sus respectivos porcentajes en peso se recogen en la **tabla 5.4**.

Tabla 5.4. Concentración de DKT y MTF-DKT (mg) en 1 mL de suspensión de nAp (50 mg).

DKT	% w/w	MTF-DKT	% w/w	DKT en MTF-DKT	% w/w
0.1	0.20	1	1.96	0.66	1.30
0.2	0.40	5	9.09	3.32	6.03
—	—	10	16.67	6.63	11.05
—	—	15	23.08	9.95	15.30
—	—	20	28.57	13.26	18.95
—	—	25	33.33	16.58	22.10
—	—	50	50.00	33.16	33.16

Por su parte, la limitada solubilidad acuosa de DKT solo permite alcanzar una concentración máxima de 0.2 mg/mL, un valor que representa un 0.4 % del peso total de las nAp-DKT, y que es 66 veces inferior a los 13.26 mg/mL de DKT que es capaz de incorporar la sal MTF-DKT. Como es de esperar, a estas concentraciones no se produce la precipitación cristalina de DKT, puesto que no se ha alcanzado la saturación de las

nAp. Estos resultados no se representan en la **figura 5.6** ya que todos los difractogramas asociados al dopaje de DKT se corresponden con la fase Ap.

Una vez se ha establecido el límite de carga de las nAp, se debe confirmar la presencia del agente dopante en las mismas. En este contexto, el uso de un MMF multiplica los posibles escenarios ya que las nanopartículas pueden ser dopadas por 1) DKT, 2) MTF, 3) DKT y MTF como moléculas libres y 4) la sal MTF–DKT en su conjunto, manteniendo las interacciones no covalentes. La espectroscopía FTIR permite estudiar las interacciones entre grupos funcionales, confirmando la adsorción de moléculas discretas de DKT, MTF o la sal MTF–DKT.

Al igual que en PXRD, el bajo porcentaje de carga de DKT imposibilita su detección mediante FTIR. Por su parte la **figura 5.7** muestra los espectros IR de las nanopartículas cargadas con MTF–DKT. En todas las concentraciones se observan las señales características del nAp en la región 400-1800 cm^{-1} , incluyendo la tensión asimétrica de los grupos PO_4^{3-} ($\nu_3\text{PO}_4$) en la región 1000-1100 cm^{-1} , la tensión simétrica $\nu_1\text{PO}_4$ a 958-960 cm^{-1} , y los modos de flexión $\nu_4\text{PO}_4$ a 608 y 1564 cm^{-1} y $\nu_2\text{PO}_4$ a 470 cm^{-1} . La presencia de grupos carbonato (CO_3^{2-}) se confirma por las bandas localizadas a 1414 cm^{-1} y 1473 cm^{-1} ($\nu_3\text{CO}_3$), y a la banda intensa a 873 cm^{-1} ($\nu_2\text{CO}_3$). Además de las señales del Ap, se observan las señales características de MTF–DKT, un doblete característico en 1574 y 1557 cm^{-1} de los grupos $-\text{NH}$, y la banda en 1653 cm^{-1} correspondiente al modo de tensión del grupos $\text{C}=\text{O}$ (cetona). La ausencia de la banda intensa y definida en 1727 cm^{-1} correspondiente al modo de tensión asimétrica del grupo $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico de DKT descarta la incorporación de moléculas de DKT en su forma libre. Estas señales son observables desde una concentración de 5 mg/mL y crecen en intensidad conforme se aumenta la concentración de sal incorporada. Cuando se alcanza la saturación de las nAp (>25 mg/mL), la intensidad de las señales del Ap disminuyen en relación a las señales de la sal debido a la mezcla de fases. Esta evidencia certifica que las moléculas de MTF–DKT se encuentran adsorbidas en la superficie, o bien en el interior de las nAp agregadas.

La incorporación de la sal en su conjunto es otro motivo que permite explicar la gran capacidad de carga de DKT cuando se compara con el API nativo. Se ha demostrado que la presencia de grupos iónicos cargados negativamente, dota a las nAp de una gran afinidad por moléculas nitrogenadas como la MTF.³⁹¹ Esta afinidad por el Ap y a su vez

la tendencia a formar sales con DKT, permitiría a MTF actuar de molécula puente entre las nAp y el DKT, permitiendo una capacidad de carga de DKT muy alta. Esto supone una ventaja adicional en el uso de MMF para aumentar el límite de carga y es que, aparte del aumento de carga de DKT, la sal también permite incorporar otro agente terapéutico como la MTF.

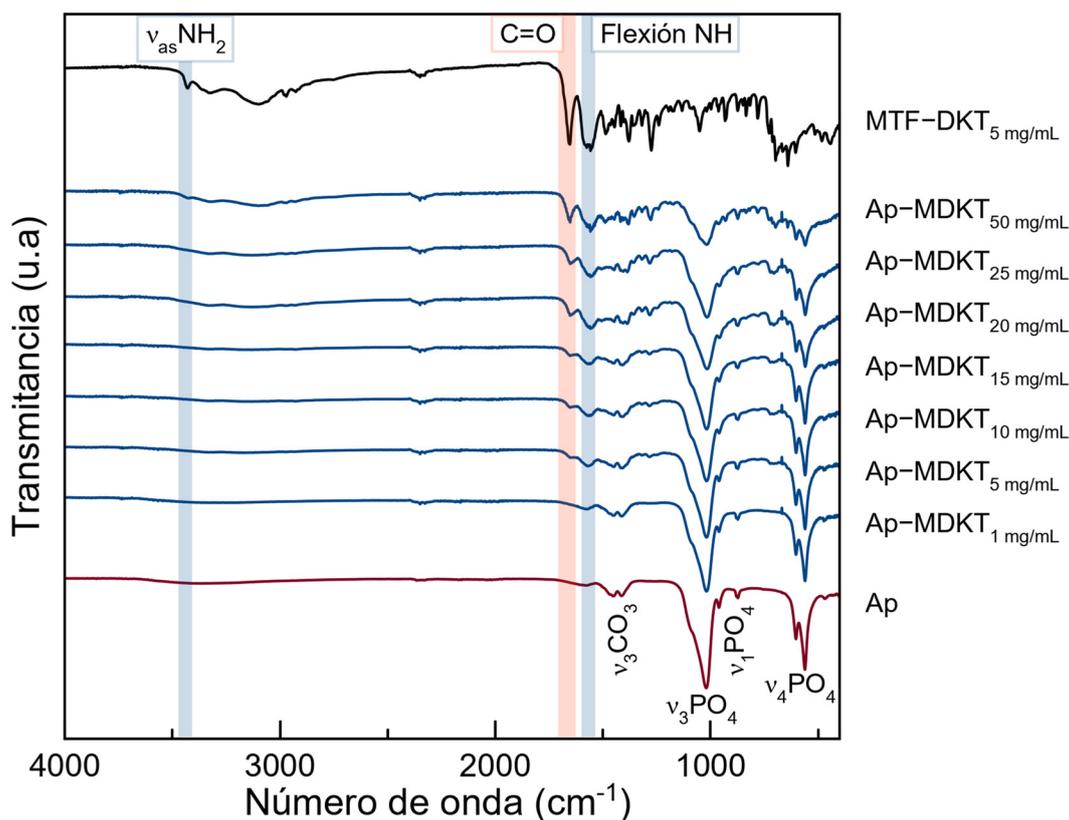


Figura 5.6. Espectros FTIR de las muestras Ap-MTF-DKT.

Por último, y con el objetivo de evaluar cambios morfológicos en las nAp que puedan estar asociados al proceso de precipitación química se ha realizado un análisis detallado mediante SEM. La **figura 5.7.** muestra las imágenes tomadas para muestras de Ap y Ap-MTF-DKT obtenida con concentraciones de 10, 20 y 50 mg/mL, así como para el precipitado cristalino de una solución de 5 mg/mL MTF-DKT. Las imágenes muestran nAp con una morfología homogénea y típica del apatito biomimético obtenido por descomplejación térmica (capítulo 3.1). Las nAp presentan un tamaño inferior a 50 nm, aunque se observa la formación de aglomerados de mayor tamaño.

La funcionalización de las nAp con MTF-DKT por debajo de la concentración de carga máxima, no produce cambios observables en lo que a morfología y tamaño de las nAp respecta. Cuando se aumenta la concentración por encima de la capacidad de carga se observan grandes cristales de la sal junto con a nAp. Cabe destacar que, aunque PXRD y FTIR confirman la presencia de la fase MTF-DKT en las nAp, los cristales que observados de MTF-DKT crecidos en presencia de nAp, presentan menor tamaño y una morfología elongada, formando agujas prismáticas, que se diferencian de los cristales precipitados en ausencia de nAp, los cuales se caracterizan por un tamaño de partícula mayor y una morfología prismática, cercana a la formación de bloques. Estas imágenes no solo confirmar la deposición de la sal sobre las nAp, si no que además demuestra que el proceso de carga es inócuo para las propiedades biomiméticas de las nAp obtenidas por descomplejación térmica.

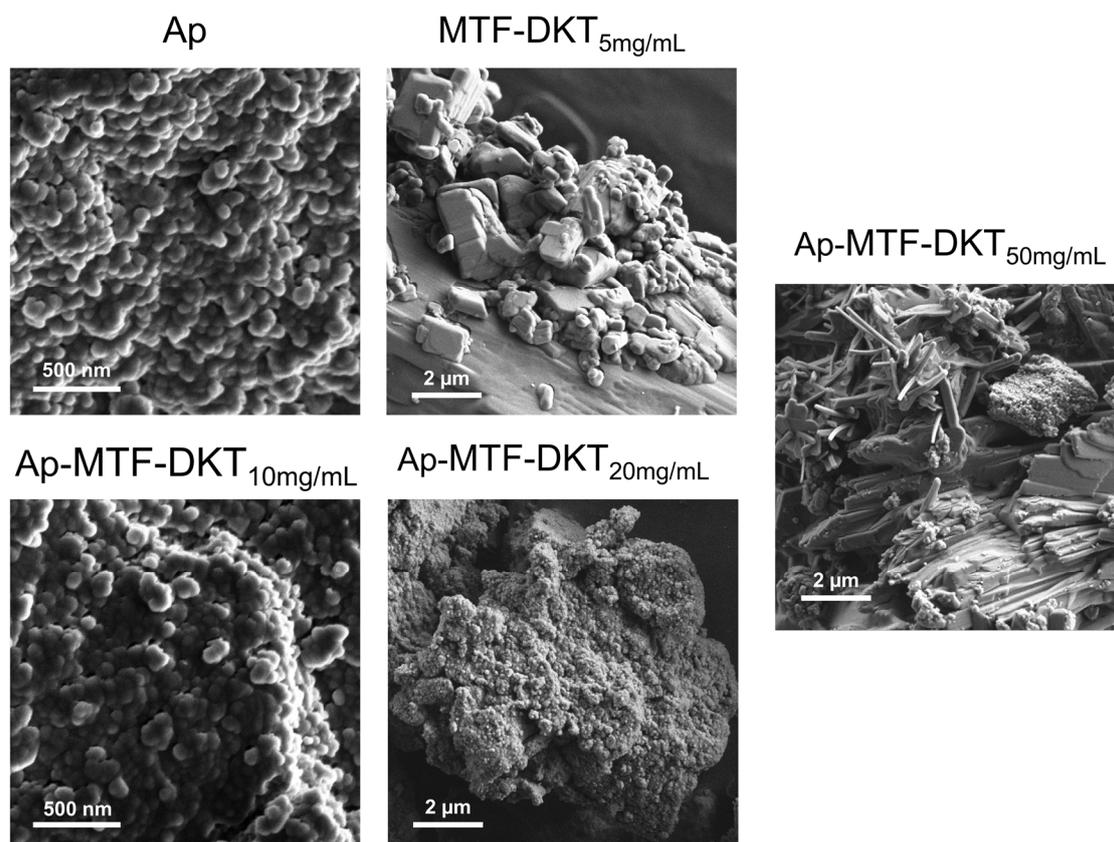


Figura 5.6. Imágenes SEM de las muestras Ap, MTF-DKT_{10mg/mL}, Ap-MTF-DKT_{10mg/mL}, Ap-MTF-DKT_{20mg/mL} y Ap-MTF-DKT_{50mg/mL}.

En resumen, este capítulo recoge los estudios preliminares de una prueba de concepto que estudia el potencial de los MMFs para aumentar el límite de carga en nanopartículas de fármacos cuya solubilidad se presenta como un factor limitante. Se debe tener en cuenta que, este enfoque no se limita al uso de nAp, comúnmente enfocadas en el entorno óseo, sino que es aplicable a otro tipo de materiales, ya sean nanopartículas, superficies, andamios poliméricos, liposomas, etc. Específicamente, la formación de la sal molecular MTF–DKT ha permitido una carga 50 veces superior a la obtenida por DKT en su estado nativo. Este hecho provoca que la solubilidad de DKT deje de ser un factor limitante, siendo ahora el propio área superficial de las nAps lo que establece el límite de carga. La concentración de MTF–DKT necesaria para saturar las nAp, se corresponde con el 3% de la solubilidad total de la sal (≈ 600 mg/mL), lo que permite el uso de materiales que acepten mayores cantidades de agente dopante.

5.4. Referencias

- (385) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- (386) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmacol. Reports* **2012**, *64* (5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5).
- (387) Iafisco, M.; Delgado-Lopez, J. M.; Varoni, E. M.; Tampieri, A.; Rimondini, L.; Gomez-Morales, J.; Prat, M. Cell Surface Receptor Targeted Biomimetic Apatite Nanocrystals for Cancer Therapy. *Small* **2013**, *9* (22), 3834–3844. <https://doi.org/10.1002/smll.201202843>.
- (388) Panzade, P.; Wagh, A.; Harale, P.; Bhilwade, S. Pharmaceutical Cocrystals: A Rising Star in Drug Delivery Applications. *J. Drug Target.* **2024**, *32* (2), 115–127. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2023.2300690>.
- (389) Sugandha, K.; Kaity, S.; Mukherjee, S.; Isaac, J.; Ghosh, A. Solubility Enhancement of Ezetimibe by a Cocrystal Engineering Technique. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14* (9), 4475–4486. https://doi.org/10.1021/CG500560W/SUPPL_FILE/CG500560W_SI_001.PDF.
- (390) Erxleben, A. Cocrystal Applications in Drug Delivery. *Pharm. 2020, Vol. 12, Page 834* **2020**, *12* (9), 834. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12090834>.
- (391) Carmona, F. J.; Dal Sasso, G.; Ramírez-Rodríguez, G. B.; Pii, Y.; Delgado-López, J. M.; Guagliardi, A.; Masciocchi, N. Urea-Functionalized Amorphous Calcium Phosphate Nanofertilizers: Optimizing the Synthetic Strategy towards Environmental Sustainability and Manufacturing Costs. *Sci. Reports* **2021**, *11* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83048-9>.
- (392) Garcia-Arieta, A.; Gordon, J.; Gwaza, L.; Mangas-Sanjuan, V.; Álvarez, C.; Torrado, J. J. Agitation Rate and Time for Complete Dissolution in BCS Biowaivers Based on Investigation of a BCS Biowaiver for Dexketoprofen Tablets. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (9), 3194–3201. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5B00131/ASSET/IMAGES/LARGE/MP-2015-00131V_0004.JPEG.
- (393) Rossi, P.; Paoli, P.; Ienco, A.; Biagi, D.; Valleri, M.; Conti, L. A New Crystal Form of the NSAID Dexketoprofen. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2019**, *75* (6), 783–792. <https://doi.org/10.1107/S2053229619006533/KY3174SUP3.PDF>.
- (394) Barbanoj, M. J.; Antonijoan, R. M.; Gich, I. Clinical Pharmacokinetics of Dexketoprofen. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40* (4), 245–262. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140040-00002/FIGURES/TAB4>.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral se marcó como objetivo general diseñar, sintetizar y estudiar las propiedades de nuevos materiales multicomponente con apatitos nanocristalinos y cocristales farmacéuticos antiinflamatorios. El trabajo realizado ha permitido obtener materiales orgánicos e inorgánicos, además de combinar ambos en un enfoque innovador que aumenta el límite de carga de fármacos con baja solubilidad sobre nanopartículas de apatito. Estos materiales poseen propiedades híbridas aplicables en biomedicina, con particular importancia en bioimagen, regeneración ósea y administración de fármacos.

Las conclusiones generales se exponen a continuación:

1. El método de descomplejación térmica de disoluciones $\text{Ca}^{2+}/\text{Tb}^{3+}/\text{cit}/\text{fosfato}/\text{carbonato}$ ha permitido preparar nanocristales de $\text{Tb}^{3+}:\text{cit-nAp}$ con un contenido máximo de ~12.8% en peso de Tb^{3+} . La luminiscencia del material (particularmente la R.L.I.) aumenta con el contenido de Tb^{3+} y no varía apreciablemente con los cambios de pH, fuerza iónica y temperatura. Las $\text{Tb}^{3+}:\text{cit-nAp}$ no presentan citotoxicidad frente a las líneas celulares carcinogénicas A375, MCF7 y HeLa, ni frente a fibroblastos. La luminiscencia verde de las nanopartículas, observadas tras su captación e internalización celular, ha permitido su localización mediante citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia, demostrando así su potencial para aplicaciones en bioimagen.
2. El método de transformación en una etapa mediante la técnica hidrotermal ha permitido la transformación completa de CaCO_3 biogénico (calcita), extraído de la concha de ostra de la especie *Crassostrea gigas*, en nano-micropartículas de apatito dopadas con Mn^{2+} , Co^{2+} y Mg^{2+} a temperaturas no superiores a 200 °C. La incorporación de iones CO_3^{2-} en su estructura, así como el tamaño y la morfología de las nanopartículas denotan su carácter biomimético. Esto subraya la capacidad de esta estrategia de reciclaje y economía circular para obtener materiales de interés biomédico a partir de desechos como las conchas de moluscos. Los ensayos *in vitro* de las nanopartículas han demostrado una alta citocompatibilidad frente a dos líneas celulares murinas, MS1 (células pancreáticas endoteliales) y m17.ASC (células madre mesenquimales) así como, la capacidad de

modular la actividad génica y enzimática de factores clave implicados en la diferenciación osteogénica de células madre m17.ASC.

3. El método de difusión de vapor en microgotas ha posibilitado la síntesis de nanocomposites de apatito con láminas multicapa de grafeno y óxido de grafeno. La funcionalización de las láminas con aminoácidos y citrato ha favorecido la precipitación heterogénea del nAp sobre las láminas. Los nanocomposites muestran una mejora en las propiedades mecánicas cuando se compara con el apatito. Los ensayos biológicos han demostrado la biocompatibilidad de los nanocomposites frente células madre mesenquimales murinas m17.ASC a dosis bajas (hasta 0.1 $\mu\text{g/mL}$), mientras que a dosis elevadas los nanocomposites empeoran la viabilidad celular. La incorporación de Tb^{3+} en las formulaciones dota a los composites de propiedades luminiscentes, con R.L.I. proporcional al contenido de Tb^{3+} , el cual a su vez depende del tipo de biomolécula usado para funcionalizar las superficies, disminuyendo éste en el orden L-Arginina >L-Alanina >L-Aspártico>Citrato. Sin embargo, la incorporación de Tb^{3+} disminuye la viabilidad celular frente a los composites no dopados. Estos resultados permiten elegir las condiciones óptimas para fabricar composites con propiedades mixtas, mecánicas y biológicas y/o luminiscentes equilibradas para aplicaciones en ingeniería del tejido óseo.

4. Se han obtenido 4 cocristales de etenzamida utilizando polifenoles isoméricos como moléculas coformadoras. En sus estructuras cristalinas, la introducción de las moléculas de polifenol ha permitido aumentar la distancia de separación entre dímeros de etenzamida, lo que se traduce en una mejora de la solubilidad en comparación con el fármaco nativo. Sin embargo, también implica una menor estabilidad térmica y la disociación de los cocristales bajo condiciones fisiológicas.

5. Se han obtenido 8 sales moleculares tipo fármaco-fármaco de ciprofloxacino con fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La formación de sales ha permitido mejorar la solubilidad de ciprofloxacino y los fármacos antiinflamatorios, mejorar la estabilidad térmica de los fármacos antiinflamatorios e incrementar la eficiencia antibiótica de ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, reduciendo la dosis necesaria para conseguir un efecto inhibitorio similar al ciprofloxacino nativo.

6. Se han obtenido 7 sales moleculares tipo fármaco-fármaco de metformina con fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La estructura cristalina dispuesta en capas crea una barrera de moléculas de fármacos antiinflamatorios que protegen a la metformina del entorno mejorando su estabilidad general. Las sales moleculares reportadas son mucho más solubles que los antiinflamatorios, pero menos solubles que la sal comercializada metformina·HCl, lo que potencialmente reduciría la acumulación intestinal, uno de los efectos secundarios más comunes del tratamiento crónico de la diabetes tipo II. La formación de sales produce la disrupción de los dímeros de moléculas de los fármacos antiinflamatorios, observados en las estructuras nativas, mejorando enormemente su solubilidad.

7. Para la obtención de materiales híbridos Apatito-Cocrystal se ha desarrollado una nueva sal molecular tipo fármaco-fármaco de metformina con dexketoprofeno que presenta una solubilidad acuosa elevada, alcanzando valores pico de dexketoprofeno de 567 y 168 mg/mL en pH 6.8 y 1.2 respectivamente, lo que supone una mejoría de 2150 y 1600 veces la solubilidad del fármaco. Cumpliendo el objetivo principal de esta Tesis, se ha propuesto un enfoque novedoso que se apoya en el uso de materiales multicomponentes farmacéuticos, para aumentar el límite de carga de dexketoprofeno en nanopartículas de apatito. El uso de la sal molecular metformina-dexketoprofeno ha permitido una carga 50 veces superior a la obtenida por el fármaco dexketoprofeno, lo que provoca que su solubilidad deja de ser un factor limitante en el proceso de carga, siendo ahora la propia área superficial de las nanopartículas la que establece el límite de carga.

CONCLUSIONS

The general objective of this doctoral thesis was to design, synthesize and study the properties of new multicomponent materials with nanocrystalline apatite and anti-inflammatory pharmaceutical cocrystals. The work has yielded organic and inorganic materials, as well as combining both in an innovative approach that increases the loading limit of drugs with low solubility on apatite nanoparticles. These materials possess hybrid properties applicable in biomedicine, with particular relevance in bioimaging, bone regeneration and drug delivery.

The general conclusions are set out below:

1. The thermal decomplexation method of $\text{Ca}^{2+}/\text{Tb}^{3+}/\text{cit}/\text{phosphate}/\text{carbonate}$ solutions has allowed the preparation of $\text{Tb}^{3+}:\text{cit-nAp}$ nanocrystals with a maximum Tb^{3+} content of ~12.8 wt.%. The luminescence of the material (particularly the R.L.I.) increases with Tb^{3+} content and does not vary appreciably with changes in pH, ionic strength and temperature. The $\text{Tb}^{3+}:\text{cit-nAp}$ do not show cytotoxicity towards the carcinogenic cell lines A375, MCF7 and HeLa, nor fibroblasts. The green luminescence of the nanoparticles, observed after cellular uptake and internalization, has allowed their localization by flow cytometry and confocal fluorescence microscopy, thus demonstrating their potential for bioimaging applications.
2. The one-step transformation method using the hydrothermal technique has allowed the complete transformation of biogenic CaCO_3 (calcite), extracted from the oyster shell of the species *Crassostrea gigas*, into apatite nano-microparticles doped with Mn^{2+} , Co^{2+} and Mg^{2+} at temperatures no higher than 200 °C. The incorporation of CO_3^{2-} ions in their structure, as well as the size and morphology of the nanoparticles, denote their biomimetic character. This underlines the capacity of this recycling and circular economy strategy to obtain materials of biomedical interest from waste such as mollusk shells. In vitro tests of the nanoparticles have demonstrated high cytocompatibility against two murine cell lines, MS1 (pancreatic endothelial cells) and m17.ASC (mesenchymal stem cells) as well as the ability to modulate the gene and enzyme activity of key factors involved in the osteogenic differentiation of m17.ASC stem cells.

3 The sitting drop vapour diffusion method has enabled the synthesis of apatite nanocomposites with multilayer graphene and graphene oxide flakes. The functionalization of the flakes with amino acids and citrate has favored the heterogeneous precipitation of nAp on the flakes. The nanocomposites show improved mechanical properties when compared to apatite. Biological assays have demonstrated the biocompatibility of nanocomposites against m17.ASC murine mesenchymal stem cells at low doses (up to 0.1 $\mu\text{g/mL}$), while at high doses nanocomposites worsen cell viability. The incorporation of Tb^{3+} in the formulations endows the composites with luminescent properties, with R.L.I proportional to the Tb^{3+} content, which in turn depends on the type of biomolecule used to functionalize the surfaces, decreasing in the order L-Arginine >L-Alanine >L-Aspartic>Citrate. However, the incorporation of Tb^{3+} decreases cell viability compared to undoped composites. These results allow for choosing the optimal conditions to manufacture composites with mixed mechanical and biological and/or luminescent balanced properties for applications in bone tissue engineering.

4. Four ethenzamide cocrystals have been obtained using isomeric polyphenols as cofomer molecules. In their crystalline structures, the introduction of the polyphenol molecules has increased the separation distance between ethenzamide dimers, resulting in improved solubility compared to the native drug. However, it also implies lower thermal stability and dissociation of the cocrystals under physiological conditions.

5. Eight drug-drug molecular salts of ciprofloxacin have been obtained with non-steroidal anti-inflammatory drugs. The formation of salts has improved the solubility of ciprofloxacin and the anti-inflammatory drugs, improved the thermal stability of the anti-inflammatory drugs, and increased the antibiotic efficiency of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, reducing the dose required to achieve an inhibitory effect similar to that of native ciprofloxacin.

6. Seven drug-drug molecular salts of metformin with non-steroidal anti-inflammatory drugs have been obtained. The layered crystalline structure creates a barrier of anti-inflammatory drug molecules that protect metformin from the environment, improving its overall stability. The reported molecular salts are much more soluble than the anti-inflammatory drugs, but less soluble than the marketed salt metformin-HCl, potentially reducing intestinal accumulation, one of the most common side effects of chronic type II diabetes treatment. Salt formation results in the disruption of the anti-

inflammatory drug molecule dimers observed in native structures, greatly improving their solubility.

7. To obtain Apatite-Cocrystal hybrid materials, a new drug-drug molecular salt of metformin with dexketoprofen has been developed which presents a high aqueous solubility, reaching dexketoprofen peak concentrations of 567 and 168 mg/mL at pH 6.8 and 1.2 respectively, which represents a 2150 and 1600 fold improvement in the solubility of the drug. Fulfilling the main objective of this Thesis, a novel approach relying on the use of pharmaceutical multicomponent materials has been proposed to increase the loading limit of dexketoprofen on apatite nanoparticles. The use of the molecular salt metformin-dexketoprofen has allowed a loading 50 times higher than that obtained by the drug dexketoprofen, which means that its solubility is no longer a limiting factor in the loading process, being now the surface area of the nanoparticles itself the one that establishes the loading limit.

