UNIVERSIDAD
DE GRANADA

DISEÑO DE SUPERFICIES DE TITANIO BIOACTIVAS LIBERADORAS DE FÁRMACOS

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Medicina

Clínica y Salud Pública

Pablo Yael Carrazco Ávila

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Directores:

Dr. Juan Ignacio Rosales Leal.

Dra. María Encarnación Morales Hernández.

Granada, España.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Pablo Yael Carrazco Ávila
ISBN: 978-84-1195-623-9
URI: https://hdl.handle.net/10481/97745

Índice general

RESUMEN **11**

SUMMARY **13**

PRESENTACIÓN **15**

Elaboración de la tesis doctoral 16

Abreviaturas 17

Glosario 18

Producción científica 20

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN **23**

1.1 El titanio y la osteointegración 25

1.2 Caracterización superficial 29
1.2.1 Topografía 30
1.2.2 Humectabilidad 32

1.3 Diseño de superficies 34
1.3.1 Modificaciones superficiales 34
1.3.1.1 Métodos mecánicos 34
1.3.1.2 Métodos físicos 35
1.3.1.3 Métodos químicos 35
1.3.1.3.1 Tratamiento térmico alcalino 35
1.3.1.3.2 Precipitados biomiméticos 36

1.4 Biopelícula bacteriana 38

1.5 Superficies antimicrobianas 40
1.5.1 Superficie antiincrustante o *"antifouling surface"* 42
1.5.2 Superficie que mata al contacto o *"contact-killing surface"* 43
1.5.3 Superficie con liberación bioactiva de fármacos o *"drug-releasing surface"* 44

1.6 Sistema liberadores de fármacos 45
1.6.1 Nanotubos de titanio 45
1.6.2 Nanofibras elctrohiladas 46
1.6.3 Películas 46
1.6.4 Hidrogeles 46
1.6.5 Nanopartículas y micropartículas 47
1.6.5.1 Nanopartículas orgánicas 48

1.7 Polímeros sintéticos y naturales 51
1.7.1 Alcohol polivinilo 51
1.7.2 Chitosan 53

CAPÍTULO 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **59**

2.1 Hipótesis 61

2.2 Objetivos 62

CAPÍTULO 3 ESTRATEGIAS DE DISEÑO DE SUPERFICIES DE TITANIO PARA ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS **65**

3.1 Materiales y métodos 69
3.1.1 Preparación de las superficies 69
3.1.2 Grupos de estudio 70
3.1.3 Método analítico 70
3.1.4 Preparación y modificación de las superficies de titanio 70
3.1.4.1 Preparación fisicoquímica de la superficie 70
3.1.4.2 Diseño del recubrimiento a base de alcohol polivinilo 72
3.1.5 Carga farmacológica de los sistemas 72
3.1.5.1 Carga y determinación de la adsorción a la superficie 72
3.1.5.2 Carga del recubrimiento de alcohol polivinilo 73
3.1.6 Caracterización de la superficie 73
3.1.6.1 Análisis de la topografía y humectabilidad 73
3.1.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) 73
3.1.7 Determinación *In vitro* del ensayo de liberación 74
3.1.8 Análisis estadístico 74

3.2 Resultados 74
3.2.1 Topográfica de las superficies bioactivas 74
3.2.2 Determinación de la adsorción a la superficie 78
3.2.3 Determinación *In vitro* del ensayo de liberación 79

CAPÍTULO 4 NUEVA SUPERFICIE DE TI RECUBIERTA CON HIDROGEL DE PVA Y NANOPARTÍCULAS DE CHITOSAN CON LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS **83**

4.1 Material y método 87
4.1.1 Preparación de la superficie de titanio 87
4.1.2 Grupos de estudio 87
4.1.3 Método analítico 87
4.1.4 Carga de las superficies 88
4.1.4.1 Adsorción de la superficie de titanio 88
4.1.4.2 Síntesis y caracterización de las nanopartículas 88
4.1.4.2.1 Método de gelificación iónica 88
4.1.4.2.2 Carga eléctrica superficial, tamaño y polidispersión 89
4.1.4.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación (DEE%) 90
4.1.4.2.4 Propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas 90
4.1.4.3 Preparación de los recubrimientos PVA y PVANP 91
4.1.5 Caracterización de la superficie 92
4.1.5.1 Análisis de la topografía y humectabilidad 92
4.1.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM) 92
4.1.6 Ensayo de liberación *In vitro* 92
4.1.7 Actividad antimicrobiana 93

4.1.7.1 Cultivo de la placa dentobacteriana 93
4.1.7.2 Formación del cultivo sobre la superficie de titanio 93
4.1.7.3 Propiedades antimicrobianas de los sistemas trasportadores de fármaco 94
4.1.8 Análisis estadístico 95

4.2 Resultados 96
4.2.1 Caracterizaciones fisicoquímicas de las nanopartículas de chitosan 96
4.2.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación (DEE%) y evaluación *In vitro* de las propiedades adhesivas 98
4.2.3 Topografía y humectabilidad de la superficie 100
4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) 102
4.2.5 Evaluación del perfil de liberación. Ensayo *In vitro* 104
4.2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana 109

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN **119**

5.1 Topografía y adsorción a la superficie 121

5.2 Nanopartículas: Tamaño, carga, DEE%, estabilidad y adhesión 124

5.3 Liberación desde los sistemas estudiados 127

5.4 Efecto antimicrobiano 130

5.5 Limitaciones del trabajo 135

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES **139**

6.1 Conclusiones generales 141

BIBLIOGRAFÍA **143**

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Juan Ignacio Rosales Leal y la Dra. María Encarnación Morales Hernández, por su apoyo, paciencia y sabiduría, quienes han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A los grupos de investigación **CTS-205** y **CTS-974**, así como a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo financiero y los recursos que han hecho posible la realización de esta investigación.

A mis profesores y trabajadores de la facultad de odontología, con quienes conviví durante mi estancia, haciéndome sentir como en casa, estando tan lejos.

A mi familia, por su amor incondicional y apoyo constante. A mis amigos, por las risas y palabras de aliento.

RESUMEN

El principal objetivo de la actual Tesis Doctoral fue diseñar, elaborar y optimizar superficies de titanio bioactivas liberadoras de fármacos. Para ello, el trabajo de investigación presentó dos estrategias en el diseño de superficies. Una estrategia fue el diseño de superficies de titanio (pulida, oxidada y precipitados biomiméticos) mediante diferentes tratamientos superficiales. Caso contrario, donde la segunda estrategia consistió en la elaboración de 2 matrices capaces de contener y trasportar fármacos en su estructura (hidrogel y nanopartículas). Dichas superficies se diseñaron con el propósito de emplearse en la entrega dirigida de fármacos en el tejido diana.

La modificación de la superficie puede realizarse mediante diferentes metodologías, siendo el tratamiento térmico alcalino, uno de los más empleados para inducir la precipitación de fosfato de calcio amorfo en la superficie. Por otro lado, los sistemas liberadores de fármacos pueden ser diseñados mediante diferentes vías de optimización, así como por el uso de diferentes materiales de acuerdo con el objetivo deseado. Para el diseño y desarrollo de los sistemas trasportadores de fármacos fueron seleccionados dos polímeros; uno de origen natural, como es el chitosan (Cs), y otro de origen sintético, como es el alcohol polivinilo (PVA).

Se utilizó la espectrofotométrica UV-visible como método analítico para calibrar las concentraciones farmacológicas, así como el análisis de los perfiles de liberación. Se analizaron los perfiles topográficos y de humectabilidad de las superficies. La dispersión dinámica de luz (DSL) fue el método analítico utilizado para la caracterización de las nanopartículas. Por último, se realizaron ensayos de liberación y se analizó mediante pruebas bacteriológicas la actividad bacteriana de los sistemas portadores del antibiótico. Dichas pruebas bacteriológicas supusieron el uso de un cultivo bacteriano para analizar las unidades formadoras de colonias (UFC), un ensayo de la actividad de Trifosfato de adenosina (ATP)—por sus siglas en inglés *Adenosine Tripolyphosphate* — y un ensayo de Life/Dead analizado mediante microscopía confocal.

La topografía se vio modificada drásticamente cuando la superficie fue recubierta con los precipitados de hidroxiapatita. También fue posible recubrir las superficies con las matrices poliméricas, presentando un perfil de liberación adecuado a los objetivos planteados. Por último, los sistemas liberadores de fármaco presentaron propiedades antimicrobianas, demostrando una mayor eficacia y un mayor efecto prolongado en sus propiedades antibacterianas cuando fueron cargados con doxiciclina.

SUMMARY

The primary objective of the present doctoral thesis was to design, develop, and optimize bioactive drug-eluting titanium surfaces. For this purpose, the research work presented two strategies in surface design. One strategy was the design of titanium surfaces (polished, oxidized, and biomimetic precipitates) through different surface treatments. Conversely, the second strategy involved the development of two matrices capable of containing and transporting drugs within their structure (hydrogel and nanoparticles). These surfaces were designed with the purpose of being used for targeted drug delivery to target tissue.

Regarding titanium surfaces, various methodologies can be used for modification, with alkali treatment being one of the most used. This treatment induces the precipitation of amorphous calcium phosphate on the surface. As for drug delivery systems, they can be designed through numerous methods, using different materials, each one targeting a different purpose. Besides, two polymers were selected for the design and development of drug delivery systems: one of a natural origin, chitosan (Cs), and another of a synthetic origin, alcohol polyvinyl (PVA).

Concerning the methodology, UV-visible spectrophotometry was used as the analytical method to calibrate pharmacological concentrations. and release profiles; and the dynamic scattering light (DSL) method was used for nanoparticles characterization. Both the topographic and the wettability profiles, and the release profiles of drug delivery systems and their antimicrobial activities were measured and analyzed as well. Furthermore, bacteriological tests were performed using a bacterial culture selected from the patients. Antimicrobial activities were confirmed by colony-forming units (CFU), adenosine triphosphate, and live/dead assay.

The topography was drastically altered when the surface was coated with hydroxyapatite precipitates. It was also possible to coat the surfaces with polymeric matrices, presenting a release profile suitable for the intended objectives. Finally, the drug delivery systems exhibited antimicrobial properties, demonstrating greater efficacy and a prolonged antibacterial effect when loaded with doxycycline.

PRESENTACIÓN

La presente Tesis Doctoral se encuentra bajo el programa de doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública de la Universidad de Granada bajo la línea de **"Investigación en odontología clínica".** El cuerpo de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en seis capítulos. A continuación, se da una visión general del contenido tratado en cada uno de ellos.

En el **capítulo 1** de la Tesis Doctoral se desarrolla el estado del arte con una introducción general que pone en contexto la temática a tratar en este trabajo de investigación.

En el **capítulo 2** se plasman las hipótesis y objetivos que dan el punto de partida a este trabajo de investigación.

Para el **capítulo 3** se presenta la metodología empleada y los resultados obtenidos para el diseño, caracterización, preparación y perfiles de liberación de las superficies bioactivas, esta parte experimental corresponde a la primera etapa de la actual Tesis Doctoral. Donde se pone a punto el protocolo de pulido de las muestras, así como la precisión de algunos métodos analíticos como es la espectrofotometría UV-visible.

En el **capítulo 4** se desarrolla la segunda etapa del proyecto de investigación. En este capítulo, se presenta la metodología empleada para el diseño, caracterización, preparación y síntesis, así como, los perfiles de liberación y las propiedades antimicrobianas de los sistemas liberadores de fármacos. Para esta etapa del proyecto se han estandarizado y puesto a punto el método analítico de dispersión dinámica de luz (DLS), de igual forma se ha estandarizado la recolección y el análisis del cultivo polimicrobiano culminando así la parte experimental de este trabajo.

En el **capítulo 5** se aborda una discusión conjunta de todos los resultados obtenidos (capítulo 3 y 4) a lo largo de este proyecto de investigación.

Por último, en el **capítulo 6** se pone punto final de esta Tesis Doctoral. En este capítulo se plasman las conclusiones generales a las cuales se ha llegado a lo largo del trabajo de investigación.

Elaboración de la tesis doctoral

La financiación de las actividades realizadas a lo largo de la Tesis Doctoral se ha llevado a cabo por el grupo **CTS-205** de la Facultad de Farmacia, el grupo **CTS-974** de la Facultad de Odontología y a los proyectos PID2020.116082GB.I00 (MCIN/ AEI/10.13039/501100011033) y C-CTS-305-UGR23 (Universidad de Granada).

El diseño, desarrollo, caracterización y optimización de los sistemas trasportadores de fármacos, así como el análisis de los perfiles de liberación se han llevado a cabo en el grupo de investigación **farmacia práctica CTS-205**, perteneciente al Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, bajo la dirección y supervisión de la Dra. María Encarnación Morales Hernández.

El diseño, desarrollo, caracterización, optimización de las superficies bioactivas, así como las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en el grupo de investigación **CTS-974**, perteneciente al Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, bajo la dirección y supervisión del Dr. Juan Ignacio Rosales Leal.

Abreviaturas

A continuación, se detalla en orden alfabético las abreviaturas y sus significados de los términos utilizadas a lo largo de esta Tesis Doctoral.

- ASTM: *American Society for Testings and Materials.*
- ATP: *Adenosine triphosphate.*
- Cs: Chitosan.
- DDS: *Drug Delivery Systems*.
- DEE%: Eficiencia de encapsulación (%).
- FDA: *Food and Drug Administrations*.
- GRAS: *Generally Recognized as Safe*.
- HA: Precipitado de hidroxiapatita.
- mV: Milivoltios.
- *PBS: Phosphate Buffered Saline*.
- PDI: Índice de polidispersión.
- Potencial zeta (ζ): Carga superficial del sistema.
- PVA: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo.
- PVANP: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo cargado con nanopartículas de chitosan.
- SBF: Fluido corporal simulado.
- Ti: Titanio.
- TiP: Titanio pulido.
- TiO: Titanio oxidado.
- TiHA: Titanio con recubrimiento de precipitados de hidroxiapatita.
- TSB: *Tryptic enriched Soy Broth solution*.
- UFC: Unidades formadoras de colonias.

Glosario

Con el propósito de asimilar y comprender la terminología descrita en este trabajo de investigación se ha realizado un glosario con los términos de mayor importancia presentes en este trabajo de investigación. Para ello, se han utilizado los descriptores MeSH —por sus siglas en inglés *Medical Subject Headings*— que forman parte del vocabulario elaborado por la *National Library of Medicine (NLM)* de los Estados Unidos. Los términos MeSH se encuentran ordenados de forma alfabética.

- **Alcohol polivinilo:** Polímero preparado a partir de acetatos de polivinilo mediante la sustitución de los grupos acetato por grupos hidroxilo. Se utiliza como auxiliar farmacéutico y lubricante oftálmico, así como en la fabricación de esponjas artificiales de revestimiento de superficies, cosméticos y otros productos.
- **Biofilm:** incrustaciones formadas a partir de microbios (bacterias, algas, hongos, plancton o protozoos) incrustados en una matriz de sustancia polimérica extracelular que es secretada por los microbios. Se presentan en superficies corporales como los dientes (depósitos dentales); objetos inanimados y cuerpos de agua. Se evita la formación de biopelículas tratando las superficies con dentífricos, desinfectantes, agentes antiinfectivos y agentes antiincrustantes.
- **Chitosan:** Chitina desacetilada, polisacárido lineal de beta-1,4-D-glucosamina desacetilada. Se utiliza en hidrogel y para tratar heridas.
- **Hidroxiapatita:** Grupo de compuestos con la fórmula general $M_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, donde M es bario, estroncio o calcio (Ca). Los compuestos son el mineral principal de los depósitos de fosforita, los tejidos biológicos, los huesos humanos y los dientes.
- **Implante dental:** Material biocompatible colocado dentro (endóseos) o sobre (subperiósticos) el hueso maxilar para sostener una corona, un puente o un diente artificial, o para estabilizar un diente enfermo.
- **Materiales biomiméticos:** Materiales fabricados mediante técnicas biomiméticas, es decir, basadas en procesos naturales que se encuentran en los sistemas biológicos.

- **Nanopartículas:** Partículas con estructura de tres dimensiones de tamaño nanométrico.
- **Osteointegración:** Acción de crecimiento del tejido óseo mediante la asimilación de dispositivos o prótesis implantados quirúrgicamente para ser utilizados como piezas de recambio o anclajes.
- **Polímero:** Compuestos formados por la unión de unidades más pequeñas, generalmente repetidas, unidas por enlaces covalentes. Los compuestos suelen formar macromoléculas grandes (biopolímeros, plásticos).
- **Sistema liberador de fármaco:** Sistemas para la entrega de medicamentos a sitios diana de acciones farmacológicas. Las tecnologías empleadas incluyen las relacionadas con la preparación de fármacos, la vía de administración, la orientación del sitio, el metabolismo y la toxicidad.

Producción científica

Artículo científico

1. Carrazco Ávila PY, Arias Moliz T, Rosales Leal JI, Baca P, Rodríguez Valverde MÁ, Morales Hernandez ME. Novel Ti surface coated with PVA hydrogel and chitosan nanoparticles with antibacterial drug release: An experimental in vitro study. Clin Implant Dent Relat Res. 2024; 26(2): 427-441.
   DOI: **https://doi.org/10.1111/cid.13305**

Participaciones en Congresos

1. **XVIII Congreso de la sociedad española de cirugía bucal.**
   Autores: Carrazco Ávila PY, Morales Hernández ME, Rosales Leal JI.
   Título: Caracterización de superficies de titanio.
   Tipo de Participación: Comunicación oral.
   Publicación: -----
   ISBN:-----
   Lugar de Celebración: Online.
   Fecha: 24 y 25 de septiembre de 2021.

2. **XXXIV^{ème} Congrès International de la Société de Pharmacie de la Méditerranée Latine La Peau : Traitements et prise en charge du patient.**
   Autores: Carrazco Ávila PY, Rosales Leal JI, Morales Hernández ME.
   Título: Sistemas transportadores de fármaco en la osteointegración.
   Tipo de Participación: Comunicación oral.
   Publicación: -----
   ISBN:-----
   Lugar de Celebración: Online.
   Fecha: 1 de octubre de 2021.

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Debido a sus propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y su gran biocompatibilidad; el titanio (Ti) y sus aleaciones han sido ampliamente utilizados como implantes ortopédicos. Se estima que cada año se implantan más de 1 000 toneladas de materiales a base de titanio en el cuerpo humano con una esperanza de vida que ronda entre los 10-15 años. Sin embargo, no siempre es posible garantizar el éxito del tratamiento debido a que tanto la zona de remplazo y las condiciones de carga que reciba el implante puede condicionar la esperanza de vida del material. Además, el tratamiento puede verse comprometido por la pérdida de tejido óseo asociado a problemas periodontales, quísticos, oncológicos, traumáticos, iatrogénicos, derivados de alguna enfermedad sistémica, proceso inflamatorios o infecciones que pueden alterar y comprometer la calidad y el tiempo de cicatrización de los tejidos,(1) siendo esta última una de las causas principales del fracaso prematuro del tratamiento.

En este sentido, conferir a la superficie del implante propiedades antibacterianas se ha convertido en un objetivo crucial para el desarrollo de los diferentes dispositivos biomédicos. La inhibición del crecimiento microbiano en la superficie del dispositivo no solo podría prevenir la infección temprana, sino que, en sinergia con una superficie que induce la adhesión de los osteoblastos, podría promover una cicatrización más exitosa, garantizando el éxito del tratamiento.

1.1 El titanio y la osteointegración

El titanio (Ti) es el noveno elemento más abundante del planeta y fue descubierto en el año 1790 por el inglés William Gregor y redescubierto por el alemán Heinrich Klaproth en 1795. Pero no fue hasta años más tarde, a mediados del siglo XX, cuando el titanio y sus aleaciones comenzaron a emplearse en la industria y en el área biomédica.(2,3) En sus inicios el titanio era empleado en la fijación y fusión ósea, así como la cirugía de remplazo articular debido a la biocompatibilidad, excelentes propiedades mecánicas y químicas, además de la resistencia a la corrosión de los materiales.(2) La buena respuesta y fijación del material lo llevó a emplearse con mayor demanda en diferentes partes del cuerpo humano, como por ejemplo, el uso de implantes dentales como dispositivo de remplazo de ausencia dentaria.

En la actualidad, los implantes dentales suelen estar fabricados de titanio comercialmente puro o aleaciones de titanio. De acuerdo con la normativa de la Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (ASTM) —por sus siglas en ingles *American Society for Testing and Materials*—, el titanio varía según su grado de pureza que va del grado I hasta el grado IV (tabla 1.1). En función del aumento del grado de pureza, se presenta un aumento en la resistencia mecánica y una disminución de la ductilidad y la corrosión del material.(4) Por lo que el titanio grado IV presenta una mayor resistencia en comparación con el titanio grado I, II y III. Mientras que los implantes fabricados a base de aleaciones de titanio están compuestos principalmente de Ti6Al4V (V), presentando mayores propiedades de limite elástico y fatiga que el titanio puro (tabla 1.2).(5–7) Siendo el titanio grado IV y las aleaciones de titanio seleccionados con mayor frecuencia en la fabricación de implantes dentales debido a sus características fisicoquímicas.

Tabla 1.1 Clasificación de acuerdo con la norma ASTM F16-00 del titanio comercialmente puro según la composición química en porcentaje en peso (wt%).(8)

Grado de pureza	Fe^{+}	O^{-}	N^{+}	C^{+}	H^{+}
I	0.2	0.18	0.03	0.1	0.0125
II	0.3	0.25	0.03	0.1	0.0125
III	0.3	0.35	0.05	0.1	0.0125
IV	0.5	0.40	0.05	0.1	0.0125

Fe: Hierro. O: Oxigeno. N: Nitrógeno. C: Carbono. H: Hidrógeno. Valor máximo (+). Valor aproximado (-). *ASTM: American Society for Testing and Materials.*

Tabla 1.2 Propiedades mecánicas requeridas, de acuerdo con la norma ASTM F16-00, para los cuatro grados de titanio.(8)

Grado de pureza	Resistencia máxima de tracción (MPa)	Limite elástico al 0.2% (MPa)	Alargamiento (%)	Reducción de área (%)
I	240	170	24	30
II	345	275	20	30
III	450	380	18	30
IV	550	483	15	25

La elección del grado de pureza del titanio al momento de la fabricación del implante es crucial, ya que puede tanto favorecer como mitigar el riesgo de fracaso prematuro del tratamiento. Por lo que, el implante dental destinado a rehabilitar la ausencia dentaria debe presentar tanto un buen anclaje óseo como un buen sellado de los tejidos adyacentes ya que el mismo dispositivo conecta el tejido óseo con la cavidad oral. De ahí que, el implante dental se encuentre sometido a constantes cambios termodinámicos, saliva, aire, comida y sobrecargas mecánicas, así como, a la adhesión de microorganismos capaces de crear una placa bacteriana en la superficie de este. Siendo la adhesión bacteriana el principal factor etiológico para inducir la infección relacionada con los implantes dentales.(9)

En este sentido, para minimizar la colonización temprana de bacterias en la superficie del implante es esencial garantizar un anclaje óseo rápido y adecuado. Factores como la elección del material, así como su diseño y las técnicas de modificación de la superficie influyen en la calidad del anclaje óseo. El anclaje óseo se da con el correcto contacto hueso-implante, proporcionando la estabilidad del implante y la futura integración del dispositivo con el tejido óseo. A este proceso se le conoce como osteointegración y todo dispositivo de remplazo implantado en el tejido óseo busca su integración y fijación.

Para comprender el término de la osteointegración hay que retroceder en el tiempo. Cuando, tras algunos años de experimentación con animales, en 1962 el sueco Per-Ingvar Brånemark descubre el anclaje directo al observar que los implantes que había colocado en sus experimentos se encontraban integrados en el tejido óseo de los animales y era imposible retirarlos sin fracturar el hueso. Tras estos hallazgos, en 1965 los implantes de titanio fueron aplicados

clínicamente como implantes orales.(10,11) Aunque, en ese momento, el contacto directo hueso-implante no había sido definido aún y no fue hasta finales de la década en 1969 cuando se sugiere por primera vez que los implantes de titanio presentaban un anclaje óseo.

Pasaron algunos años más hasta mediados de los años 70´s, cuando en 1976 aparece por primera vez en la literatura el término “osteointegración”. Este nuevo termino fue definido años más tarde como **“el contacto directo entre el tejido óseo y la superficie del implante a nivel de resolución del microscopio óptico”**.(10–13) Sin embargo, la constante búsqueda por comprender el comportamiento de los tejidos ha llevado a adaptar la definición a estos nuevos descubrimientos. Algunas definiciones alternativas que han sido reportadas en la literatura describen la osteointegración como **"una conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante portador de carga", “el contacto directo hueso-implante sin capa de tejido conjuntivo intermedia”** o una definición más compleja como **"una coexistencia continua, estructural y funcional, posiblemente de forma simbiótica, entre tejidos biológicos diferenciados, adecuadamente remodelados, y componentes sintéticos estrictamente definidos y controlados que proporcionan funciones clínicas duraderas y específicas sin iniciar mecanismos de rechazo"**.(5,10)

Por muchos años se consideró que la incorporación de implantes de titanio era un fenómeno de curación de heridas debido a las reacciones benignas del tejido al material, abarcando algún tipo de unión química.(14) Sin embargo, se cuestionaron estos hallazgos demostrando que otros metales, como las aleaciones de titanio, el tantalio y el niobio, así como algunos materiales cerámicos tenían la capacidad de osteointegrarse.(14) Posteriormente, se comunicó que el titanio no era un material bioinerte sin reacciones adversas, sino que en su lugar era capaz de provocar respuestas inmunes en los tejidos. Reportándose que la osteointegración era una reacción a un cuerpo extraño en la que los tejidos intentaban incrustar el material de titanio en el hueso como modo de protección de los tejidos circundantes.(14,15)

En 1992 se reportó que cualquier material extraño en el hueso será rechazado, disuelto, reabsorbido o demarcado con una capa densa de hueso; siendo esta última lo que se considera como osteointegración y que se desarrolla con la condición de relativa inmovilidad del implante —permitiéndose movimientos en el rango de micras—.(15) Se sabe que el Ti es estable en las respuestas biológicas y no desencadena una reacción de cuerpo extraño cuando se inserta en el cuerpo humano.(16)

Recientemente, el termino osteointegración se ha interpretado desde un nuevo punto de vista **"una reacción a un cuerpo extraño en la que se forma hueso interfacial como reacción de defensa para blindar el implante frente a los tejidos"**.(10) El nuevo enfoque sobre la osteointegración se centra en que la superficie de titanio sería reconocida con mayor sensibilidad por el tejido duro, aislando este cuerpo extraño con una acumulación rápida y fuerte de sustancias óseas.(16,17)

La continua investigación de técnicas de modificación de la superficie como pueden ser técnicas de rugosidad controlada, recubrimientos bioactivos o estrategias biomiméticas busca mejorar aún más esta respuesta celular, contribuyendo a aumentar la afinidad biológica y acelerar la respuesta entre el implante y el tejido óseo para garantizar una correcta osteointegración.

1.2 Caracterización superficial

La caracterización superficial consiste en el análisis y descripción de las propiedades y estructuras de la superficie. Este proceso informa detalladamente sobre la composición, rugosidad, textura y otras características que condicionan la interacción del material con su entorno. La caracterización superficial tiene gran relevancia en campos como la ingeniería, ciencia de materiales y la investigación biomédica, permitiendo comprender y mejorar el rendimiento de los materiales. Por lo tanto, al modificar la superficie de un implante de titanio, se busca hacer de esta una superficie más compatible con el cuerpo, mejorando así la afinidad con el tejido duro y acelerando la integración ósea.

1.2.1 Topografía

La descripción y representación detallada de la forma y características físicas de una superficie son dadas por la topografía. Cuando se habla de implantes biomédicos la topografía se enfoca en describir la rugosidad, textura y características geométricas de la superficie del implante. La rugosidad de la superficie está conformada por picos y valles de longitudes variables y es posible cuantificarla con métodos topográficos bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D).(18) Sin embargo, dependiendo del tratamiento aplicado a la superficie, la topografía experimentará cambios y los parámetros de rugosidad se modificarán.(19) Estas modificaciones de la superficie en los parámetros de rugosidad se expresan a nivel de micras (1-10 μm), con el objetivo de mejorar la afinidad biológica.(16,20)

Los parámetros de rugosidad se pueden dividir en tres grupos:

1. **Parámetros de amplitud:** Estos parámetros se consideran los más importantes para la caracterización topográfica de la superficie. Proporcionan una descripción cruda de la rugosidad de la superficie, al medir las características verticales de las desviaciones de la superficie. Revelando la amplitud de las características topográficas sin informar sobre su distribución espacial.
2. **Parámetros de espacio:** Son aquellos que miden las características horizontales de las desviaciones de la superficie. Estos parámetros son fundamentales en algunos procesos de fabricación, como el prensado de chapa de acero.
3. **Parámetros híbridos:** Son una combinación de amplitud y espaciado. Son parámetros derivados que cuantifican las variaciones de la topografía en relación con las coordenadas planas.

Para esta tesis doctoral, se explicarán algunos de los parámetros de amplitud habituales.(18)

- **Altura media aritmética (R_a):** Se define como la desviación absoluta promedio de las irregularidades de rugosidad de la línea media en una longitud de muestreo. Proporciona una descripción general de las variaciones de altura.

- **Rugosidad cuadrática media (R_q):** Este parámetro representa la desviación estándar de la distribución de alturas de la superficie. Describe la rugosidad de las superficies de la superficie mediante métodos estadísticos.
- **Altura máxima de los picos (R_p):** Este parámetro se define como la altura máxima del perfil por encima de la línea media dentro de la longitud de evaluación.
- **Profundidad máxima de valles (R_v):** Se describe como la profundidad máxima del perfil por debajo de la línea media dentro de la longitud de evaluación.
- **Altura máxima del perfil (R_t o R_{max}):** Se define como la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más profundo a lo largo de la longitud de evaluación del perfil.
- **Asimetría (R_{sk}):** La asimetría de un perfil es el tercer momento central de la función de densidad de probabilidad de amplitud del perfil, medida a lo largo de la longitud de la evaluación. Es utilizado para medir la simetría del perfil con respecto a la línea media, siendo un parámetro sensible a valles profundos ocasionales o picos altos. Una distribución de altura simétrica, es decir, tantos picos como valles, tiene asimetría cero. Los perfiles con picos eliminados o rayones profundos presentan asimetría negativa. Los perfiles con valles rellenos o picos altos exhiben una asimetría positiva. El parámetro de asimetría puede emplearse para diferenciar entre dos perfiles que poseen los mismos valores Ra o Rq, pero con formas distintas.
- **Curtosis (R_{Ku}):** El coeficiente de curtosis es el cuarto momento central de la función de densidad de probabilidad de amplitud del perfil, medido a lo largo de la duración de la evaluación. La curtosis describe la nitidez de la densidad de probabilidad del perfil. Si $R_{Ku} < 3$, se dice que la curva de distribución es platicurtoica y tiene relativamente pocos picos altos y valles bajos. Si $R_{Ku} > 3$, se dice que la curva de distribución es leptokurtoica y tiene relativamente muchos picos altos y valles bajos.

El proceso de osteointegración se ve influenciada tanto por las características de la superficie como por el diseño del implante. En la interacción hueso-implante se presentan cuatro fases diferenciadas: interacción quirúrgica, proceso de curación, periodo de carga temprana y periodo de carga tardía.(21) Por lo que, la optimización de las características superficiales del implante es de vital importancia debido a que, es posible alcanzar un respuesta ósea significativamente más fuerte y un mayor contacto hueso-implante en una superficie moderadamente rugosa o micro-rugosa, y como consecuencia una mejora en la calidad de la osteointegración.(22)

1.2.2 Humectabilidad

La humectabilidad determina la capacidad de cualquier superficie sólida para humedecerse cuando entra en contacto con un líquido. Está propiedad de la superficie es importante en diversos campos, como la química, la física de superficies, la biología y la ingeniería, ya que determina como los líquidos interactúan con sólidos y otros materiales.

La capacidad de humectación del implante puede ser crucial para la adsorción de proteínas y, por ende, para la adhesión celular, debido a que la energía superficial del implante está relacionada con la humectabilidad. Las interacciones fisicoquímicas entre la superficie adsorbente y las biomoléculas impulsa la adsorción de las biomoléculas en la superficie del implante *in vivo*.(23)

Presumiblemente, una superficie hidrofóbica (baja humectabilidad) desacelera la interacción primaria con el biosistema acuoso. Por lo que, generalmente, se informa que una superficie con hidrofilia moderada mejora el crecimiento celular y la biocompatibilidad.(23,24) De hecho, se observa que a medida que la humectabilidad del implante disminuye, la adhesión celular puede verse también reducida, lo que sugiere la presencia de un intervalo de energías superficiales óptimas. De manera contraria, las reacciones interfaciales *"in vivo"* alteran parámetros físicos y químicos significativos de la superficie, como la energía superficial, lo cual repercute en la estabilidad a largo plazo de los implantes.(23)

Para determinar la hidrofobicidad/hidrofilia de una superficie, la cual suele ser expresada en términos de ángulo de contacto, se han desarrollado y empleado diferentes metodologías para su medición. El ángulo de contacto de avance o

ángulo máximo (ACA, 0_{AV}) y el ángulo de contacto de retroceso o ángulo de contacto mínimo (ACR, 0_{RE}) son dos de los métodos más utilizados para determinar la humectabilidad de la superficie debido a su reproducibilidad. El ángulo de contacto de avance se aprecia en situaciones donde la fase líquida se desplaza sobre el sólido a expensas de la fase fluida circundante, es decir, se puede observar en el punto de contacto descendente de una gota sésil inclinada en el momento en que comienza a deslizarse. Por el contrario, el ángulo de contacto de retroceso se aprecia en situaciones en donde la fase líquida retrocede sobre el sólido, disminuyendo el área húmeda a favor del área seca. Esta situación se da en el punto de contacto ascendente de una gota sésil inclinada en el momento en que comienza a deslizarse.(3) Otra forma más sencilla de cuantificar el ángulo de contacto es mediante una medida estadística. Es decir, se deposita una gota en la superficie y, a partir de su perfil o de su extensión, se obtiene el valor del ángulo de contacto. Mediante esta técnica se obtiene el ángulo de contacto de equilibrio sin tener en cuenta la histéresis.

En este sentido, es importante controlar las características fisicoquímicas del implante como son la topografía y la hidrofilia debido a que pueden influir en la calidad de la osteointegración. Después de la inserción del implante se producen respuestas inmunes e inflamatorias, seguidas de angiogénesis y osteogénesis, por lo que ambos parámetros condicionan el anclaje de proteínas sanguíneas a la superficie, creando zonas de interacción a través de células receptoras como las integrinas. Después, los neutrófilos ocupan la superficie y, entre 2 y 4 días más tarde, se unen monocitos y macrófagos. Estos pasos son importantes para la homeostasis, ya que implican la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que promueven el depósito de matriz de colágeno y la formación inicial de tejido óseo. Por lo que las características superficiales del implante pueden condicionar la respuesta biológica y, en consecuencia, la calidad de la osteointegración.(7,23,25,26)

1.3 Diseño de superficies

El diseño de la superficie tiene como objetivo mejorar el rendimiento y la durabilidad del material. Con la intención de mejorar la adhesión, resistencia a la corrosión, humectabilidad, así como, la biocompatibilidad del implante. En este contexto, se han ideado diversas estrategias para alterar la superficie del implante y consecuentemente, mejorar su compatibilidad biológica.

1.3.1 Modificaciones superficiales

Algunas de las modificaciones superficiales que reciben los implantes dentales son el grado ácido, abrasión, voladura de plasma, trasformación iónica y precipitados biomiméticos. Estas modificaciones de la superficie del implante, promueve la absorción de proteínas, la interacción célula-superficie, así como la formación de tejido óseo entre el biomaterial y el organismo. Esto se debe a que, una vez activado el proceso de cicatrización ósea después de la lesión quirúrgica, los osteoblastos entran en contacto con la superficie de titanio y depositan la matriz mineralizada. Este proceso se ve favorecido por la presencia de la capa de óxido de titanio que se forma en la superficie de titanio debido a que los osteoblastos tienden adherirse a superficies que son similares tanto en química como en rugosidad al hueso natural.(20,27–29)

1.3.1.1 Métodos mecánicos

Este tipo de metodología se enfoca en el tratamiento, la conformación o eliminación de la superficie mediante la aplicación de fuerzas físicas utilizando otro material sólido. Estos métodos son utilizados para limpiar la superficie y/o conseguir topografías específicas.(30) Entre los más comunes se pueden encontrar:

- Mecanizado.
- Esmerilado.
- Pulido.
- Arenado/Granallado.

1.3.1.2 Métodos físicos

Este tipo de metodología hace referencia a la formación directa de capas sobre la superficie del implante, con poca intervención de reacciones químicas. La formación de capas es impulsada principalmente mediante energía térmica, cinética y eléctrica.(30) Algunos de los métodos convencionales son:

- Pulverización térmica (pulverización con plasma, pulverización de combustible con oxígeno a alta velocidad, pulverización en frío)
- Implantación de iones por inmersión de plasma y deposición (PIII&D).

1.3.1.3 Métodos químicos

La modificación de la superficie mediante reacciones químicas se basa, principalmente, en las interacciones químicas en la interfaz entre el sustrato y el medio sumergido.(30) Este tipo de modificaciones usualmente son:

- Grabado ácido.
- Tratamiento térmico alcalino.
- Métodos electroquímicos.
- Métodos bioquímicos.

1.3.1.3.1 Tratamiento térmico alcalino

El tratamiento térmico alcalino es empleado para modificar la superficie de titanio mediante la inmersión del sustrato en una solución altamente corrosiva.

El titanio puro tiene la característica de ser termodinámicamente inestable y altamente reactivo cuando interactúa con el oxígeno, esta interacción superficie-oxigeno forma una capa de óxido de titanio en la superficie.(3) La notable inercia química, resistencia a la corrosión así como, la habilidad para repasivarse —reacción química del material que forma una capa pasiva de óxido cuando la superficie del metal o aleación entra en contacto con el oxígeno del aire— del titanio y de la mayoría de sus aleaciones se deben principalmente a la estabilidad química, así como, a la estructura sólida de la capa de óxido de titanio que se forma en la superficie.(31)

El titanio normalmente contiene tres capas de óxido diferentes tales como: TiO presente en la capa interna, Ti_2O_3 en la capa intermedia y la presencia de TiO_2 en la capa externa. Esta última capa de óxido que se forma en la superficie del titanio puede oscilar entre 3 a 10 mm de grosor, pudiendo aumentar lentamente con el tiempo.(30,32) En función del estado de oxidación de la superficie de titanio, se conocen diferentes estequiometrias, siendo el dióxido de titanio el más estable y común.(3) Además, es posible aumenta la cantidad de TiO_2 cuando el titanio es sumergido en un medio altamente oxidativo.(30)

La inmersión del titanio en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) de entre 5-10M durante 24 h a 60 °C oxida la superficie creando una nueva capa de titanato de sodio en esta. Debido al tratamiento NaOH, la capa pasiva de TiO_2 del titanio interactúan con los iones Na^+ y los iones O^{2-} de la solución NaOH; generando una capa de titanato de hidrógeno de sodio ($Na_xH_{2-x}Ti_yO_{2y+1}$; $0<x<2$) en la superficie del mental. Esta nueva capa de titanato de hidrógeno de sodio se transforma en titanato de sodio ($Na_2Ti_6O_{13}$) con la presencia de pequeñas cantidades de rutilo (TiO_2), la cual incrementa su resistencia de 5 a 50 mN después del tratamiento térmico.(30,33)

1.3.1.3.2 Precipitados biomiméticos

La nueva superficie de titanio induce la formación de hidroxiapatita mediante una interacción iónica entre la capa de óxido de la superficie de titanio tratada y un fluido corporal simulado.

Se ha reportado que una superficie ionizada puede inducir la nucleación y deposición de hidroxiapatita en la superficie de titanio debido a que la superficie modificada iónicamente presenta mayor capacidad de nucleación de hidroxiapatita.(34,35) Este proceso se lleva a cabo mediante una interacción iónica cuando el titanio es sumergido en un fluido corporal simulado acelular, con concentraciones de iones casi similares a las del plasma sanguíneo humano (tabla 1.3).(36,37) El fluido corporal simulado (SBF) —por sus siglas en ingles *Simulated Body Fluid*— es una solución termodinámicamente inestable debido a la sobresaturación con respecto a la hidroxiapatita.(38) Sin embargo, la hidroxiapatita precipita a la temperatura normal del cuerpo, debido que la barrera energética para la nucleación homogénea de la hidroxiapatita en SBF es muy

alta. Esta capacidad del material para inducir la precipitación de hidroxiapatita en un SBF también inducirá la formación de hidroxiapatita *in vivo*.(33)

La precipitación de hidroxiapatita se produce debido a que los iones Na^+ presentes en la superficie son liberados e interaccionan con los iones H_3O^+ que se encuentran en el SBF. Esta interacción iónica da como resultado grupos $TiOH^-$ en la superficie de titanio, los cuales absorben selectivamente los iones Ca^{2+} cargados positivamente presentes en el SBF. A medida que los iones de calcio se acumulan, la carga de la superficie cambia de negativa a positiva. Este cambio de carga produce la unión de los iones de fosfato cargados negativamente presentes en el SBF, formándose fosfato de calcio amorfo en la superficie de titanio. La fase final del proceso es metaestable y se transforma eventualmente en hidroxiapatita estable cristalina, similar a la del hueso.(30,33,38)

Tabla 1.3 Concentraciones iónicas del plasma humano y de las soluciones sintéticas, mM. (37)

	Plasma en sangre	**Tas-SBF**
Na^+	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0
Ca^{2+}	2.5	2.5
Mg^{2+}	1.5	1.5
Cl^-	103.0	125.0
HCO_3^-	27.0	27.0
$HPO^2_4^-$	1.0	1.0
$SO^2_4^-$	0.5	0.5
Ca/P	2.5	2.5
Buffer	-	TRIS
pH	7.4	7.4

1.4 Biopelícula bacteriana

El diseño y las características del implante, como la topográfica, humectabilidad y la química de la superficie, son parámetros importantes que buscan alcanzar la correcta integración del tejido óseo. Sin embargo, el tratamiento puede verse comprometido debido a procesos infecciosos que inducen una inadecuada respuesta celular. Esto se debe a que, durante la colocación del implante, tanto las células huésped como las células patógenas compiten por adherirse y colonizar su superficie. Si la *"carrera hacia la superficie"* es ganada por las células patógenas puede conllevar a inconvenientes o fracasos en el tratamiento. De hecho, la infección asociada a los implantes dentales es una de las causas principales de fracaso en el tratamiento y puede presentarse semanas después de la cirugía o incluso varios años después de la colocación del implante.(39,40) La infección de los implantes dentales se relaciona con dos razones principales: la formación de una biopelícula en la superficie del implante y la capacidad inmune comprometida de la interfaz tejido-implante.(41)

Cuando el implante entra en contacto con las sustancias fisiológicas del cuerpo se crea una capa de proteína superficial entre el hueso y la superficie del implante, haciendo que la superficie sea idónea para la colonización de bacterias ya sea de forma directa o mediante interacciones con proteínas preasorbidas. A medida que las bacterias planctónicas se adhieran a la capa de proteína formada en la superficie del implante resultará en la formación de microcolonias, desarrollándose una estructura de biopelícula única en 3D constituida a partir de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares hidratada.(2,40,41) Con el aumento de la densidad de las microcolonias, los biopolímeros extracelulares producidos sirven como una barrera que mantiene la estructura de la biopelícula.(40)

La biopelícula que se adhiere de forma irreversible a una superficie, interfase o entre sí; se compone aproximadamente del 10% de células patógenas y de hasta un 90% de lipopolisacáridos, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.(40,42) Esta matriz de sustancias poliméricas extracelulares proporciona al ecosistema estabilidad mecánica y mejora de la adherencia a la superficie del implante. Una vez establecida la comunidad microbiana esta exhibe un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la expresión de genes, debido a

que la biopelícula presenta ambientes heterogéneos. Las capas superficiales de la biopelícula están compuestas por bacterias metabólicamente activas, mientras que, las capas más profundas presentan bacterias metabólicamente inactivas derivado de la limitada difusión de oxígeno y nutrientes en esta zona de la matriz polimerica.(9,43) Además, las bacterias metabólicamente activas presentes en las capas superficies pueden volver a su forma planctónica si estás se desprenden de la matriz polimérica, pudiendo de esta forma colonizar e inducir nuevas infecciones en zonas distintas del cuerpo o del implante.(7,40)

Se ha reportado que en la *"carrera hacia la superficie"* la temprana contaminación bacteriana del campo operatorio es una de las causas más frecuentes en el fallo temprano del implante. Debido a que, el sistema inmunitario se ve gravemente alterado por el trauma quirúrgico después de la implantación, siendo este momento considerado el de mayor riesgo para la adhesión bacteriana y por ende la infección temprana del sitio quirúrgico. Incluso una vez completada la integración entre el tejido óseo y la superficie del implante, la capacidad de la respuesta inmune se ve disminuida debido al pequeño número de vasos sanguíneos en la zona. Esta disminución en la eficacia del mecanismo de defensa facilita la adhesión y colonización de los agentes patógenos.(9,41,44)

La biopelícula crea un entorno de protección para las bacterias ante agentes antimicrobianos (como pueden ser los antibióticos convencionales). Ya que, a medida que aumenta la densidad de bacterias en las colonias, se induce una mejora en la interacción entre las células patógenas mediante señalizaciones bioquímicas. Pudiendo facilitar un intercambio y transferencia de genes de virulencia, así como genes de resistencia entre microorganismos, aumentando la tolerancia y resistencia a los antibióticos.(40) Dando como resultado, que los agentes antimicrobianos convencionales no puedan erradicar completamente los patógenos depositados en la película, ya que las dosis estándar normalmente no pueden penetrar la biopelícula y matar a las bacterias, esto se suma a la inactivación de los agentes en ambientes ácidos.(40,45)

Es este sentido, prevenir la adhesión bacteriana y la formación de la biopelícula es un gran reto, ya que, el microbioma oral es el segundo más grande del cuerpo con aproximadamente 700 especies de microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos que interactúan entre sí de forma sinérgica,

antagonista o incluso, como señalización. Induciendo la formación de una biopelícula en la cavidad oral y se estima que 400 de estas especies bacterianas son capaces de adherirse a la superficie del implante.(7,46) Siendo el *Staphylococcus aureas* una de las bacterias gran positiva más estudiadas, ya que esta bacteria exhibe una alta capacidad de formar biopelículas multicelulares que protegen a las células bacterianas del sistema inmunológico, presentando una alta resistencia a los antibióticos.(46–48)

De la misma forma, las bacterias *Pseudomonas aeruginosa gramnegativas, Porphyromonas gingivalis, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus sanguinis* han sido estudiadas debido a que se encuentran asociadas a la infección de los implantes dentales.(39) Por lo que, el diseño de las nuevas superficies no solo busca la rápida respuesta celular mediante la modificación topográfica de la superficie, sino que además se han desarrollado diferentes enfoques para dotar a la superficie de titanio con propiedades antimicrobianas facilitando la respuesta celular y garantizar, de este modo, una correcta osteointegración.(2,9,49)

1.5 Superficies antimicrobianas

La colonización bacteriana, y por lo tanto la infección, pueden ocurrir desde antes o después de la cirugía. Durante la etapa perioperatoria donde el equipo quirúrgico, la ropa usada por el personal y la atmosfera del quirófano pueden ser un foco de contaminación. La contaminación de la herida también puede ocurrir de manera continua, ya sea durante el traumatismo, en lesiones penetrantes, o desde una fuente adyacente a la herida. Otra forma de que el sitio quirúrgico pueda verse afectado es debido a la infección de manera hematógena, lo que significa que células patógenas se diseminan a través de la linfa o sangre desde un sitio de infección distante.(50)

En consecuencia, las primeras horas después de la cirugía son críticas para que las células del huésped se adhieran y colonicen la superficie del implante, ganando a las células patógenas la *“carrera hacía la superficie”*. Una de las alternativas más utilizadas es la administración sistémica de antibióticos, ya sea de forma profiláctica o preventiva antes y/o después de la cirugía. Sin embargo, las limitaciones de la administración sistémica de medicamentos, así como la

baja concentración de medicamento en el tejido diana debido a una vascularización comprometida y mala perfusión después de la cirugía puede complicar el tratamiento. Además, la eficacia del tratamiento con antibióticos se ve significativamente reducida cuando se ha formado una biopelícula en la superficie del implante, ya que las células internas presentes en la biopelícula pueden presentar resistencia a los antibióticos debido al abuso generalizado de estos.(50,51)

Una forma de disminuir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas es diseñar superficies de implantes dentales capaces de inhibir la adhesión y colonización bacteriana. Estas estrategias se pueden centran principalmente en el desarrollo de superficies con repulsión bacteriana pasiva o con una eliminación activa de bacterias. Las estrategias pasivas se enfocan en evitar la formación de biopelículas en los implantes, mientras que los enfoques activos buscan diseñar recubrimientos que liberen agentes antimicrobianos con el fin de alterar y eliminar de forma eficaz la células bacterianas.(40,50) Sin embargo, es primordial que la nueva superficie siga siendo biocompatible y promotora de la osteointegración.

Estos nuevos enfoques antimicrobianos (pasivos y activos) han sido clasificados por diferentes autores de acuerdo a su diseño y propiedades.(50–52) Sin embargo, estás clasificaciones pueden ser un poco confusas. De manera que, de acuerdo a las clasificaciones analizadas en la literatura, coincidimos con algunos autores que las nuevas superficies pueden agruparse, en términos generales, en tres categorías principales.(40,45)

1. Superficie antiincrustante o *“antifouling surface”*.
2. Superficie que mata al contacto o *“contact-killing surface”*.
3. Superficie con liberación bioactiva a partir de recubrimientos o “drug-releasing surface”

1.5.1 Superficie antiincrustante o *"antifouling surface"*

Como se ha mencionado anteriormente en la sección **1.3 Diseño de superficies**, las modificaciones superficiales del implante no contienen agentes antimicrobianos y se centran en diseñar superficies que reduzcan el micro movimiento del implante para promover la adhesión celular y una rápida osteointegración.(53) Sin embargo, se ha reportado que las propiedades superficiales que resultan de la modificación de esta, tales como, la rugosidad, humectabilidad, carga y energía libre superficial influyen en la adhesión bacteriana. Esto puede condicionar las modificaciones superficiales del implante debido a que una superficie repelente puede comprometer la adhesión de células huésped, ya que tanto las células huésped como las células patógenas presentan mecanismos de adhesión similares.(50,51)

Así mismo, con el desarrollo de la nanotecnología, la rugosidad que describe las crestas o proyecciones de la superficie, es decir, la distancia entre dos picos o dos valles ya no es relevante para describir superficies a nanoescala.(51) Las modificaciones en la micronanotopografía del sustrato genera nuevos patrones en la superficie, dando como resultado superficies antiincrustantes y superhidrófobas. Con esto se busca replicar algunas nanoestructuras presentes en la naturaleza, como las hojas de loto las cuales resisten la adhesión bacteriana ya que son superhidrófobas, de igual forma se busca replicar las alas de las cigarras ya que exhiben una superhidrofobicidad y sus nanocapilares pueden dañar la membrana celular.(50,52)

Las superficies superhidrófobas se crean realizando estructuras rugosas (nanopilares, nanocanales y nanodiscos) sobre materiales hidrofóbicos para obtener superhidrofobicidad. Estas superficies presentan una excesiva repelencia al agua ya que presentan un ángulo de contacto con el agua por encima de 150°. La poca o nula humectabilidad, así como el alto nivel de rugosidad de la superficie permite que se creen bolsas de aire entre la superficie y la membrana celular de la bacteria, dificultando el contacto completo.(50,54) Otra estrategia, se basa en superficies superhidrófilas con ángulos de contacto con el agua por debajo de 10°. Esto se consigue mediante alteraciones químicas con características morfológicas diferentes, ya que al combinar microrrugosidades regulares con sustancias hidrófilas estas se quedan

atrapadas en la superficie debido a la rugosidad, generando una capa acuosa que limita la adhesión bacteriana.(40,52)

1.5.2 Superficie que mata al contacto o *"contact-killing surface"*

El enfoque biomimético de la superficie que mata al contacto se inspira en las estructuras de las alas de las cigarras y libélulas, que presentan un revestimiento de nanopuntas. Este decorado de las alas actúa como medio defensivo contra los contaminantes bacterianos.(50,55) Por lo que, para replicar este efecto, se diseñan nanoestructuras topográficas análogas, como son: nanobarras, nanopilares y nanobordes. Las propiedades inherentes de muerte por contacto de estas superficies se relacionan directamente con las propiedades dimensionales de las nanoestructuras diseñadas como la altura, el ancho y el espaciado.(56)

Estas superficies nanotexturizadas (nanopilares gruesos y romos) promueven la adhesión bacteriana entre las espigas, provocando la suspensión, el estrés, ruptura del cuerpo celular y en última instancia la muerte celular de las bacterias.(40) Sin embargo, este tipo de diseños no son eficaces contra especies Gram-positivas, probablemente porque esta especie de bacterias presentan capas gruesas de peptidoglicano, lo que genera una superficie más rígida y resistente al estrés.(50,54)

Como alternativa, se han diseñado superficies que inducen la muerte por contacto, empleando antibióticos, biomoléculas como el quitosano y la celulosa, así como ciertos péptidos antimicrobianos. Estos agentes antimicrobianos se unen a la superficie mediante diferentes enlaces, tal como un enlace sulfhídrico unido al polidimetilsilaxano (PDMS) o alternativas mediante una unión covalente con aminopropiltrietoxi silano (APTES) al óxido de la superficie.(29,45) Sin embargo, este sistema podría ver reducida su eficacia debido a que los restos de las bacterias que han muerto por contacto con la superficie se van depositando sobre la misma, creando una barrera para nuevos grupos de bacterias activas y brindan nuevos sitios de adhesión para las bacterias planctónicas.(57,58) En adición, la estabilidad mecánica del sistema podría ser una limitación, dado que una fuerza de fricción con la superficie podría romper los enlaces de unión y, por lo tanto, la pérdida del recubrimiento.(45)

1.5.3 Superficie con liberación bioactiva de fármacos o *"drug-releasing surface"*

Este tipo de enfoque incorpora un recubrimiento a la superficie desde el cual se pueden liberar agentes bioactivos de manera sostenida alrededor del implante y los tejidos circundantes, con el objetivo de estimular y acelerar la respuesta celular. Gran variedad de los recubrimientos de la superficie se desarrollan a partir de biopolímeros con versatilidad molecular y funcional, permitiendo la funcionalización con sustancias bioactivas. Entre estos biopolímeros podemos encontrar los de origen natural como el alginato, el colágeno, la celulosa, la gelatina, el ácido hialurónico y el chitosan (Cs). Mientas que biopolímeros de origen sintético podemos encontrar la policaprolactona (PCL), la pelieteretercetona (PEEK), la poli-L-lactida (PLLA), la poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA), poliuretano y el alcohol polivinilo (PVA).(40,59) En general, los biopolímeros buscan estimular la diferenciación y proliferación celular. No obstante, algunos biopolímeros son inertes por sí mismos, por lo que se emplean en combinación con otros biopolímeros.(60)

Por otro lado, se ha buscado conferir a los recubrimientos de superficie con propiedades antimicrobianas y han sido cargados en combinación con antibióticos para prevenir la adhesión y colonización bacteriana de la superficie.(39,61) En este punto es crítico la optimización del sistema liberador para conocer la carga óptima del principio activo y los factores que influyen en la liberación de este, por lo que, se han estudiado diferentes estrategias de administración y liberación focalizada de fármacos.(2,53) Sin embargo, la liberación de antibióticos desde algunos recubrimientos ha generado precaución debido a la prevalencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.(39) Una alternativa a estos inconvenientes, es diseñar sistemas de liberación cargados con fármacos que además de promover la respuesta celular, tengan propiedades antimicrobianas. Una alternativa son los polímeros catiónicos y aniónicos (como el chitosan, péptidos y la celulosa) los cuales se ha reportado que presentan propiedades antibacterianas.(2,40,62)

1.6 Sistema liberadores de fármacos

La incorporación de agentes antimicrobianos a sistemas liberadores de fármaco (DDS) —por sus siglas en ingles *Drug Delivery Systems*— ha llamado la atención como alternativa a la resistencia de las bacterias a los antibióticos debido a que los sistemas liberadores de fármacos permiten focalizar el sitio de administración del principio activo. Enfocándose en mejorar la respuesta celular al prevenir y controlar la adhesión bacteriana. Además, la administración de fármaco vía DDS limita los efectos secundarios del principio activo cuando estos son suministrados de forma sistémica.(53,63)

Estos sistemas han sido empleados para cargar diferentes principios activos como factores de crecimiento, proteínas, péptidos, antibióticos como pueden doxiciclina, vancomicina, gentamicina, penicilina, clortetraciclina, estreptomicina o daptomicina entre otros. Incluso se han empleado estos sistemas buscando otro enfoque terapéutico al incorporar fármacos como ibuprofeno, paracetamol o doxepina.(49,57,64–68) Esto indica la versatilidad de los sistemas para transportar y liberar el principio activo. Sin embargo, una consideración que hay que tener en cuanta es que la elección del sistema liberador de fármaco determina la capacidad de carga, la duración de la liberación y la vía de administración más adecuada del fármaco. Asimismo, las propiedades del principio activo como la solubilidad, la potencia, el sitio de acción y la tasa de eliminación influyen en la selección del fármaco.(53)

En este contexto, diferentes estrategias han sido empleadas para diseñar sistemas capaces de transportar y liberar fármaco. Desde modificaciones superficiales del implante hasta el uso de biopolímeros naturales y/o sintéticos capaces de crear matrices estables, que al contacto con el medio fisiológico inician su degradación y, en consecuencia, la liberación del fármaco. Los recubrimientos de implantes abarcan desde nanotubos de titanio, nanofibras electrohiladas, hidrogeles, películas, micropartículas y nanopartículas.(53)

1.6.1 Nanotubos de titanio

Se pueden crear matrices de nanotubos de titania (TiO_2) mediante un proceso de anodización electroquímica. Este tipo de sistemas permite la adsorción del fármaco de forma física además de presentar una alta biocompatibilidad.

Durante el proceso de anodización electroquímica, parámetros como la temperatura de reacción, el voltaje de anodización o el tiempo de reacción condicionan las características de los nanotubos, como pueden ser el diámetro, la longitud, la relación de aspecto y volumen. Influenciando directamente las tasas de carga y liberación de fármaco.(67,69,70)

Este tipo de sistemas se complementa con recubrimientos poliméricos como PLGA o chitosan, los cuales sirven como una capa protectora que puede ser beneficiosa para ajustar, retener o prolongar la liberación del fármaco. Además, esta copa protectora favorece la unión y proliferación celular. Una de las ventajas de incorporar polímeros es la posibilidad de cargar el sistema con otros vehículos de liberación como nanopartículas que permitan encapsular fármacos hidrófobos.(53,71)

1.6.2 Nanofibras elctrohiladas

Estos sistemas están fabricados generalmente con poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA). El sistema se caracteriza por presentar una estructura no tejida altamente porosa, con alta permeabilidad, estabilidad y facilidad de funcionalización. Siendo la técnica de electrohilado la metodología empleada para su fabricación. La carga del sistema con fármacos se puede inducir mezclando el principio activo con el polímero antes de la técnica de electrohilado o mediante la adsorción e inmovilización del principio activo en las fibras.(53,72)

1.6.3 Películas

El recubrimiento de la superficie con una película bidimensional es posiblemente la estrategia más sencilla para la administración localizada de fármacos. Este tipo de sistema se logra mediante el recubrimiento por pulverización, fundición por goteo o técnicas de inmersión. Sin embargo, una de las limitantes de esta técnica es la reproducibilidad debido a que es complejo estandarizar la uniformidad, la química y el grosor de los recubrimientos.(53,73,74)

1.6.4 Hidrogeles

Los hidrogeles se definen como materiales viscoelásticos tridimensionales formados por una red polimérica con entrecruzamiento físico y/o químico de uno o más polímeros y tienen una alta capacidad de absorber grandes cantidades de

agua.(75) Debido a sus características y su blanda consistencia estos sistemas pueden simular tejidos vivos, además de ser biodegradables y presentar estabilidad bajo condiciones fisiológicas. Los hidrogeles pueden ser clasificados en dos grupos debido a sus características. Los hidrogeles estables o químicos presentan una red entrecruzada de enlaces covalentes. Mientras que, los hidrogeles reversibles o físicos presentan una red de enlaces secundarios como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o fuerzas hidrofóbicas.(76)

Los sistemas de liberación en forma de hidrogel han atraído la atención en el desarrollo de lentes de contacto, apósitos de heridas, administración de fármacos y genes, ingeniería de tejidos, andamios celulares, reparación de tejidos, inmunoterapias y vacunas. Como resultado de su biocompatibilidad, capacidad de hinchazón en medios acuosos y la sensibilidad a estímulos externos.(77) Estos sistemas pueden ser fabricados a partir de materiales naturales, sintéticos o una combinación de ellos. Algunos de los materiales naturales empleados en la fabricación de hidrogeles son: el colágeno, la fibrina, el ácido hialurónico, alginato o chitosan.(53,78,79) Por el contrario, los materiales sintéticos empleados para diseñar hidrogeles son: el alcohol polivinilo (PVA), el polietilenglicol (PEG), el policaprolactona (PCL) y el ácido poliláctico (PLA).(75,80)

Esta característica del sistema permite que los hidrogeles puedan ser cargados con principios activos permitiendo que la matriz sirva como una plataforma trasportadora en la entrega dirigida de fármacos.(45)

1.6.5 Nanopartículas y micropartículas

Para el propósito de esta Tesis Doctoral, los términos “nanopartículas” y “micropartículas” se refieren a partículas de tamaño medido en nanómetros y micrómetros, respectivamente.

Cuando se habla de DDS mediante partículas, por lo general se diferencia entre nanopartículas y micropartículas. Algunos autores consideran como nanopartículas sistemas que varían en rango de tamaño de entre 1 y 100 nm, y cuanto mayor sea el tamaño del sistema es más probable que se comporten como micropartículas.(81–83) No obstante, aunque el tamaño juega un papel importante en la caracterización del sistema, con frecuencia se buscan tamaños

< 300 nm debido a que pueden penetrar fácilmente los capitales y el tejido epitelial. Se ha reportado que tamaños < 100 nm presentan una captación arterial tres veces mayor en comparación con partículas de tamaños más grandes > 275 nm.(81,84,85)

Existe una gran variedad de posibilidad para el desarrollo de nanopartículas y la elección de cada una de ellas radica en las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de cada sistema. Por lo que, las nanopartículas deben cumplir con una serie de características mínimas. El sistema debe ser biocompatible y biodegradable, además de tener un tamaño y propiedades superficiales adecuadas, una alta capacidad de incorporar principios activos a la matriz, brindar protección a los principios activos ante su degradación en el organismo, la posibilidad de prolongar los tiempos de circulación en sangre para alcanzar la acumulación del sistema en el tejido diana, así como, una metabolización y eliminación correcta del sistema.(86–88)

En los últimos años, gracias al avance en el campo de la nanotecnología el desarrollo de partículas a niveles nanométricos se ha visto ampliamente explorado. Solo hasta el año 2003, al ingresar el término Mesh *"nanoparticles"* en la base de datos MEDLINE (vía PudMed) habían sido publicados 851 artículos. Sin embargo, cuando la búsqueda se realiza entre 2004-2024 (marzo 2024) se reportan 188 418 artículos. Por lo que, la variedad de nanosistemas con diferentes potenciales de aplicación en biomedicina es inmensa. Pudiéndose encontrar sistemas a base de micelas, liposomas, quantum dots, nanopartículas orgánicas (poliméricas o lipídicas) e inorgánicas basadas en materiales magnéticos como magnetita (óxido de hierro), metales semiconductores como oro o plata, hidrogeles, dendrímeros o nanotubos de carbono.(87–92)

Entre todas estas estrategias, para este trabajo de investigación nos centraremos en nanopartículas orgánicas poliméricas debido a que son una plataforma prometedora para la entrega dirigida de medicamento.

1.6.5.1 Nanopartículas orgánicas

Las nanopartículas orgánicas son sistemas coloidales sólidos conformados por macromoléculas que varían en rango de tamaño de entre 1 nm a 1000

nm.(68,92) Y acorde al material utilizado para la síntesis del sistema, estas se pueden dividir en términos generales en tres grupos:

1. Nanopartículas a base de polímeros.
2. Nanopartículas a base de lípidos.
3. Nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros.

Las nanopartículas basadas en polímeros naturales y sintéticos presentan propiedades interesantes como sistema portador de fármaco debido a su estabilidad, larga vida útil y facilidad de caracterización del sistema.(93,94) Lo que permite mejorar la biocompatibilidad y la facilidad de incorporar principios activos tanto hidrófilos como hidrófobos al sistema. Dando como resultado una mejora de la solubilidad y liberación del fármaco.(89) Estas ventajas permiten al sistema la posibilidad de liberar concentraciones idóneas en áreas focalizadas, maximizando el efecto terapéutico y reduciendo los efectos secundarios del medicamento cuando son administrados de forma sistémica.(63)

Dependiendo del método de preparación, las nanopartículas pueden ser de dos tipos: nanocápsulas y nanoesferas. Cuando las nanopartículas constan de una estructura núcleo-capa, se denominan nanocápsulas. Por el contrario, si las nanopartículas constan de una matriz polimérica continua se denominan nanoesferas. Esta versatilidad del sistema las hace excelentes vehículos de transporte para la entrega dirigida de biomoléculas, fármacos, genes y vacunas al sitio de interés *in vivo*.(89,92,95)

Además, dependiendo del polímero (natural o sintético) empleado para la síntesis del sistema las nanopartículas tendrán características específicas. Por lo que la elección del material dependerá de una serie de criterios como:

1. El tamaño de nanopartícula deseada.
2. Las propiedades del fármaco a transportar (solubilidad, estabilidad, etc.).
3. Características y funcionalidad de la superficie.
4. Grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad del polímero.
5. Perfil de liberación del sistema.
6. Antigenicidad del producto final.

Estos criterios son importantes ya que condicionan la viabilidad del sistema. Por ejemplo, las nanopartículas poliméricas no biodegradables pueden ser utilizadas

en la entrega dirigida de medicamentos o como sistema complementario del diagnóstico por imagen (polimetacrilato y polimetilmetacrilato). Por otro lado, alguno de los polímeros sintéticos biodegradables empleados como sistemas liberadores de fármacos son el ácido poliláctico, la poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA), polianhídridos, poli-ε-caprolactona, alcohol polivinilo, etc. Mientras que, algunos de los polímeros naturales más ampliamente utilizados para la síntesis de nanopartículas son la celulosa, alginato, el ácido hialuronato, el chitosan, etc.(84,89,90,95,96)

El chitosan (Cs) es un polímero con gran versatilidad y biocompatibilidad, por lo que ha sido estudiado en la síntesis de nanopartículas (NP). Las nanopartículas diseñadas a base de chitosan presentan una mejor absorción celular y pueden ser aplicadas en enfoques como administración de fármacos, proteínas, genes, vacunas y agentes quimioterapéuticos oculares, mucosos, preorales, pulmonares e intranasales.(97–99) Las nanopartículas de chitosan (NPCs) se pueden preparar mediante diferentes metodologías y de igual forma se debe tener consideración en la metodología a utilizar, ya que esta condicionará las características finales de las NP.(89,98,100)

1. Gelificación o reticulación iónica.
2. Método de coacervación complejo.
3. Método de coprecipitación
4. Método de difusión de disolvente de emulsión.
5. Método de microemulsión.
6. Método micelar inverso.
7. Método de evaporación de disolvente basado en emulsión.

Entre todas las posibilidades que se pueden encontrar para el diseño de NPCs. La gelificación o reticulación iónica es una de las más empleadas debido a sus grandes beneficios en comparación con las otras técnicas además de ser una técnica de fácil preparación.(84,97,98) La metodología de esta técnica será detallada en el apartado **4.1.4.2.1 Método de gelificación iónica** correspondiente al **capítulo 4**.

1.7 Polímeros sintéticos y naturales

Como se ha podido precisar podemos encontrar diferentes estrategias para la entrega focalizada de medicamentos. La elección de una de ellas dependerá del sitio y el propósito de tratamiento que se desea alcanzar. De la misma forma, la matriz portadora del principio activo deberá trabajar en sinergia con las características superficiales del implante, así como, brindar estabilidad al sistema seleccionado como DDS. Como se ya se ha mencionado anteriormente, los polímeros usados como matrices para crear sistemas liberadores de fármacos pueden ser clasificados como:

1. Sintéticos o naturales.
2. Biodegradables o no biodegradables.

Ya se han mencionado algunos ejemplos de estos tipos de polímeros por lo que, para propósitos de este trabajo de investigación se detallarán dos de los polímeros que presentan grandes propiedades fisicoquímicas, tanto individuales como en conjunto debido a su alta biocompatibilidad y versatilidad. Uno de origen sintético y otro de origen natural.

1. Alcohol polivinilo (PVA).
2. Chitosan (Cs).

1.7.1 Alcohol polivinilo

El alcohol polivinilo (PVA) es un polímero sintético que se usa normalmente como apósito de heridas cutáneas debido a sus buenas propiedades y características.(101,102) Es un polímero ecológico, biodegradable y bioadhesivo, además, al ser soluble en agua, se convierte en una solución no tóxica, incolora, inodora y transparente.(75,103) El PVA fue sintetizado por primera vez en el año 1924 por Hermann y Haehnel, mediante la hidrólisis del acetato de polivinilo en etanol con hidróxido de potasio. El PVA $(C_2H_4O)n$, estructuralmente es un polímero lineal interconectado mediante enlaces de carbono-carbono con presencia de grupos de hidroxilo en las cadenas laterales que le permiten al polímero que se auto-entrecruce.(80,104) La figura 1.1 muestra la composición química del alcohol polivinilo.(105)

El polímero ve alterado su peso molecular en función de la longitud de la cadena inicial de acetato y el grado de hidrólisis (20,000 a 400,000 g/mol). Por lo que, el polímero puede ser clasificado en dos grupos, un primer grupo donde se encuentra parcialmente hidrolizado (87-89%) y un segundo grupo donde el polímero está totalmente hidrolizado (91-99%). Esto se debe a que los grupos acetato experimentan hidrólisis mediante un intercambio de éster con metanol, en presencia de metilato de sodio anhidro o hidróxido de sodio acuoso.(63,106) Por otro lado, los grupos hidroxilo del PVA influyen significativamente en sus propiedades reológicas y mecánicas, generando enlaces de hidrógeno tanto inter como intramoleculares, por lo que la disposición espacial y densidad de los grupos determinan estás propiedades.(104)

De la misma forma, dependiendo del grado de hidrólisis del polímero la solubilidad del material se ve afectada, cuando el PVA se encuentra parcialmente hidrolizado este es más soluble en agua, presentando mayor flexibilidad y adhesión a superficies hidrofóbicas. Mientras que, cuando el PVA se encuentra totalmente hidrolizado el polímero es más estable en presencia de solventes orgánicos, presentando una mayor resistencia a la tracción y adhesión sobre superficies hidrófilas.(63,102) Así pues, las propiedades reológicas y viscoelásticas del PVA son influenciadas por las uniones físicas, el grado de polimerización, el grado de hidrólisis, el peso molecular y la orientación molecular.(104,106,107)

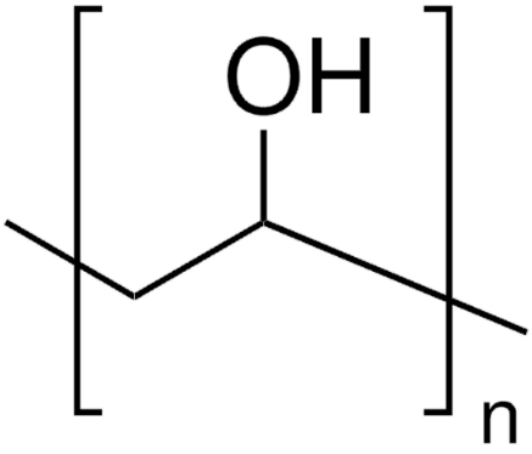

Figura 1.1. Estructura química del alcohol polivinilo.

El PVA ha sido aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA) —por sus siglas en ingles *Food and Drug Administration* —.(108) Como se ha descrito, el alcohol polivinilo tiene una alta capacidad de reticulación lo cual favorece la formación de películas e hidrogeles. En adición se ha reportado que es un material que no presenta toxicidad, carcinogenicidad, y sí una buena compatibilidad y biodegradabilidad en tejidos y fluidos humanos.(63,109)

Además, posee propiedades físicas y mecánicas deseables, como una buena permeabilidad a los gases, alto índice de expansión, capacidad de absorción de fluidos y una buena transparencia. No obstante, el PVA presenta algunas limitaciones, como la falta de propiedades antibacterianas, el ser un material intrínsicamente bioinerte que no favorece la señalización y las interacciones celulares.(102,110) La tabla 1.4 presenta los valores específicos de las propiedades fisicoquímicas del PVA.

Tabla 1.4 Propiedades fisicoquímicas del alcohol polivinilo.(63)

Propiedades	Valores
Punto de inflamación	79 °C
Punto de fusión	180 - 190 °C
Punto de ebullición	340 °C
Temperatura de descomposición	>200 °C
Viscosidad	>4.8 - 5.8 mPa.s
Densidad	1.19-1.13 g/cm^3
pH	5.0 – 6.5
Índice de refracción	1.49 – 1.53

1.7.2 Chitosan

La quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina) es un polímero de origen natural y es el segundo polisacárido más abundante en la tierra después de la celulosa. Y se encuentra presente en la concha de algunos invertebrados, como camarones o cangrejos, en la pared celular de algunos hongos y en el exoesqueleto de algunos crustáceos.(111–113) Cuando el polímero es sometido a una

desacetilación alcalina da como resultado chitosan (poli-D-glucosamina). El componente estructural del producto resultante es similar a los glucosaminoglicanos —Un tipo de biomoléculas con función estructural, principalmente presentes en los tejidos conectivos, epiteliales y óseos, así como en el medio intercelular—.(113)

El Cs es un polisacárido glucosaminoglicano catiónico y es posiblemente el único polication de origen natural renovable.(114) Este polisacárido presenta una estructura semicristalina lineal que está compuesto por dos subunidades de monosacáridos, D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces glucosídicos β-1,4. El polímero presenta tres grupos funcionales reactivos ubicados en cada unidad de monosacáridos; un grupo amino libre en los átomos de carbono C-2 de las unidades desacetiladas y grupos hidroxilo en los átomos de carbono C-3 y C-6 en las unidades acetiladas y desacetiladas. La variabilidad en las proporciones de GlcN y GlcNAc dan lugar a diferentes propiedades fisicoquímicas primarias del chitosan, como el grado de desacetilación, el peso molecular y la viscosidad del polímero. Siendo estás propiedades fisicoquímicas del chitosan las que determinan en gran medida las propiedades antimicrobianas, así como, la solubilidad y viscosidad del polímero.(42,102,115,116)

Al ser un polímero con naturaleza policatiónica, el chitosan purificado presenta una escasa solubilidad y alta viscosidad. Sin embargo, es posible lograr su disolución con ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido fórmico o mediante ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico. Con el objetivo de mejorar la solubilidad del Cs, se han realizado modificaciones tanto físicas (mezcla) o químicas (sustitución *N* o *O*, copolimerización e injerto) principalmente en el grupo amino funcional reactivo y los grupos hidroxilo del polímero. Estos cambios estructurales del chitosan mejoran la solubilidad en agua y se pueden realizar mediante alquilación, acilación, cuaternización y sacarizacion, dando como resultado productos derivados funcionales tales como: *N,N,N*-trimetilchitosan (TMC), carboximetilchitosan (CMCS), chitosan cloruro de hidroxipropil timetil amonio (HACC) y chitoologosacáridos, respectivamente.(42,98,100,111,117)

El Cs ha sido aprobado y catalogado por la FDA de EE. UU como material seguro (GRAS) —por sus siglas en inglés *Generally Recognized as Safe*—.(98) El Cs presenta características físicas y biológicas interesantes debido a que es un material biocompatible, biodegradable, el cual exhibe baja toxicidad y actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, de mostrar características bioadhesivas, bacteriostáticas y propiedades biológicas que estimulan la curación de los tejidos favoreciendo la osteointegración.(84,118–121) La alta biocompatibilidad del chitosan podría deberse a que las unidades repetitivas de N-acetilglucosamina del polímero tiene una similitud estructural con los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular.

En adición, se ha reportado que el Cs posee propiedades que pueden promover la regeneración de tejidos blandos y la osteoconducción.(113,120,122) La naturaleza mucoadhesiva del chitosan lo hacen un candidato prometedor para encapsular, transportar y liberar fármaco en la administración oral. Debido a que las moléculas cargadas positivamente del Cs (catiónicas) logran una interacción electroestática fuerte con las moléculas cargadas negativamente de la superficie mucosa (aniónicas). En adición, el Cs se degrada de manera lenta en azúcares amino no tóxicos los cuales pueden ser absorbidos completamente por el cuerpo.(99,123)

Estas características posicionan al chitosan como un recubrimiento de interés para mejorar la respuesta celular, evitar la adhesión de bacterias y brindar un efecto terapéutico focalizado sin que el implante pierda sus propiedades originales.(122) Gracias a su gran versatilidad se ha utilizado en la industria alimentaria, agrícola, textil, farmacéutica y en el área biomédica ha sido investigado como vehículo de transporte de principios activos y DDS.(75,84,117) La figura 1.2 muestra la composición química del chitosan.(124)

La gran maleabilidad de los polímeros (PVA y Cs) los hacen grandes candidatos como sistemas liberadores de fármacos en la entrega dirigida de medicamentos. La combinación de estos dos polímeros ha demostrado tener buenas propiedades mecánicas y químicas debido a sus interacciones intermoleculares únicas debido a que el PVA presenta un alto grado de enlaces de hidrógeno entre sus grupos hidroxilos (-OH), mientras que el Cs tiene grupos amino ($-NH_2$)

en su estructura química, los cuales pueden crear enlaces de hidrogeno con los grupos hidroxilo del PVA.(79,98) Por ende, para contrarrestar las limitaciones que presenta el PVA, se han estudiado ambos polímeros en conjunto como sistemas liberadores de fármacos.(123,125–129)

En este sentido, como se ha mencionado previamente el alcohol polivinilo es un polímero inerte sin propiedades antimicrobianas capaz de crear una matriz reticulada que sirva como portadora del agente terapéutico deseado. Por lo que, la combinación con nanopartículas de chitosan presentaría la posibilidad de vehiculizar agentes terapéuticos deseados en el sitio quirúrgico. El nuevo sistema liberaría el agende terapéutico de manera controlada durante las primeras horas tras su administración para prevenir la adhesión bacteriana a la superficie, permitiendo a las células huésped colonizar la superficie del implante.

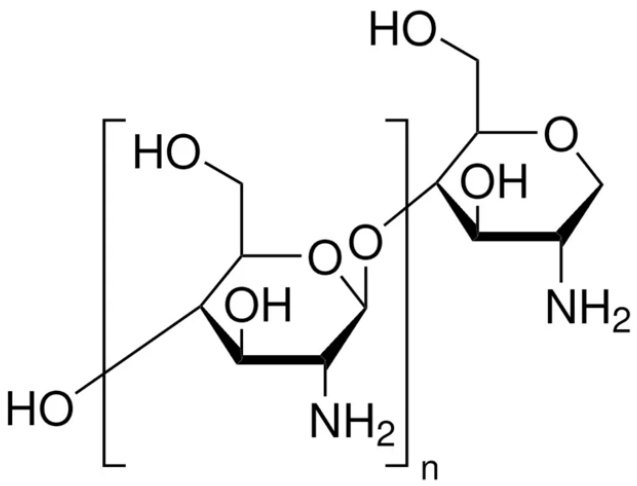

Figura 1.2. Estructura química del chitosan.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 2

Hipótesis y objetivos

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

2.1 Hipótesis

Como se ha podido expresar en el estado del arte, la temprana colonización bacteriana de la superficie de titanio puede condicionar la respuesta celular del huésped, aumentando críticamente la posibilidad de un fracaso en el tratamiento. La hipótesis de este trabajo es que, mediante un tratamiento de superficie, es posible vehiculizar fármacos y provocar un efecto biológico. Es decir, se plantea lo siguiente:

1. El aumento de la humectabilidad superficial condiciona la retención del fármaco.
   - Una superficie con cargas iónicas facilita la adsorción de fármacos y su posterior liberación.
   - Una superficie más rugosa garantiza la adsorción de fármacos y su posterior liberación.
2. Es posible recubrir la superficie de titanio con matrices poliméricas capaces de liberar fármaco.
3. El recubrimiento de una matriz polimérica reduce la adhesión bacteriana.

2.2 Objetivos

El objetivo fundamental planteado en esta Tesis Doctoral es diseñar superficies de titanio bioactivas liberadoras de fármacos. Con la intensión de conseguir este propósito se plantean los siguientes objetivos específicos.

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre los diferentes tratamientos superficiales para modificar la superficie de titanio.
2. Analizar mediante la bibliografía los diferentes sistemas liberadores en la entrega focalizada de fármacos.
3. Modificar fisicoquímicamente la superficie de titanio para conseguir precipitados de hidroxiapatita.
4. Diseñar un recubrimiento de la superficie de titanio a base de alcohol polivinilo para la entrega dirigida de fármacos.
5. Diseñar y elaborar nanopartículas a base de chitosan reproducibles con su posterior caracterización en cuanto a tamaño, estructura, índice de polidispersión, propiedades eléctricas y adhesivas, así como, la estabilidad coloidal durante su almacenamiento y conservación.
6. Caracterizar las superficies para evaluar sus perfiles topográficos y su humectabilidad.
7. Caracterizar las superficies bioactivas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
8. Seleccionar los métodos analíticos adecuados para:
   - Determinar mediante las rectas de calibrado las concentraciones de los fármacos.
   - Determinar el porcentaje de adsorción de las superficies bioactivas.
   - Determinar el porcentaje de fármaco con el que ha sido cargado el recubrimiento de alcohol polivinilo.
   - Determinar el porcentaje de encapsulación de las nanopartículas de chitosan.
   - Evaluar los perfiles de liberación de las superficies bioactivas.
9. Diseñar las pruebas bacteriológicas para evaluar la actividad antimicrobiana de los sistemas liberadores de fármacos.

.

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 3

Estrategias de diseño de superficies de titanio para adsorción y liberación de fármacos

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

El objetivo de este primer estudio fue modificar fisicoquímicamente superficies de titanio para analizar si una superficie rugosa es capaz de transportar fármaco o es necesario el uso de un vehículo de transporte. Para ello, se diseñaron cuatro superficies con tres enfoques terapéuticos. Los grupos de estudio analizados en este capítulo son: una superficie de titanio mecanizada mecanográficamente (Ti), una superficie de titanio oxidada (TiO), una superficie de titanio con precipitados de hidroxiapatita (TiHA) y, por último, el uso de una matriz tridimensional formada a partir de un polímero sintético, alcohol polivinilo (PVA). Los fármacos seleccionados para este estudio fueron: paracetamol, ibuprofeno y doxepina clorhidrato. Se analizó la rugosidad de las superficies y su humectabilidad. Además, se evaluó la capacidad de adsorción de las superficies y sus perfiles de liberación. La figura 3.1 ilustra una gráfica resumen con los grupos de estudio.

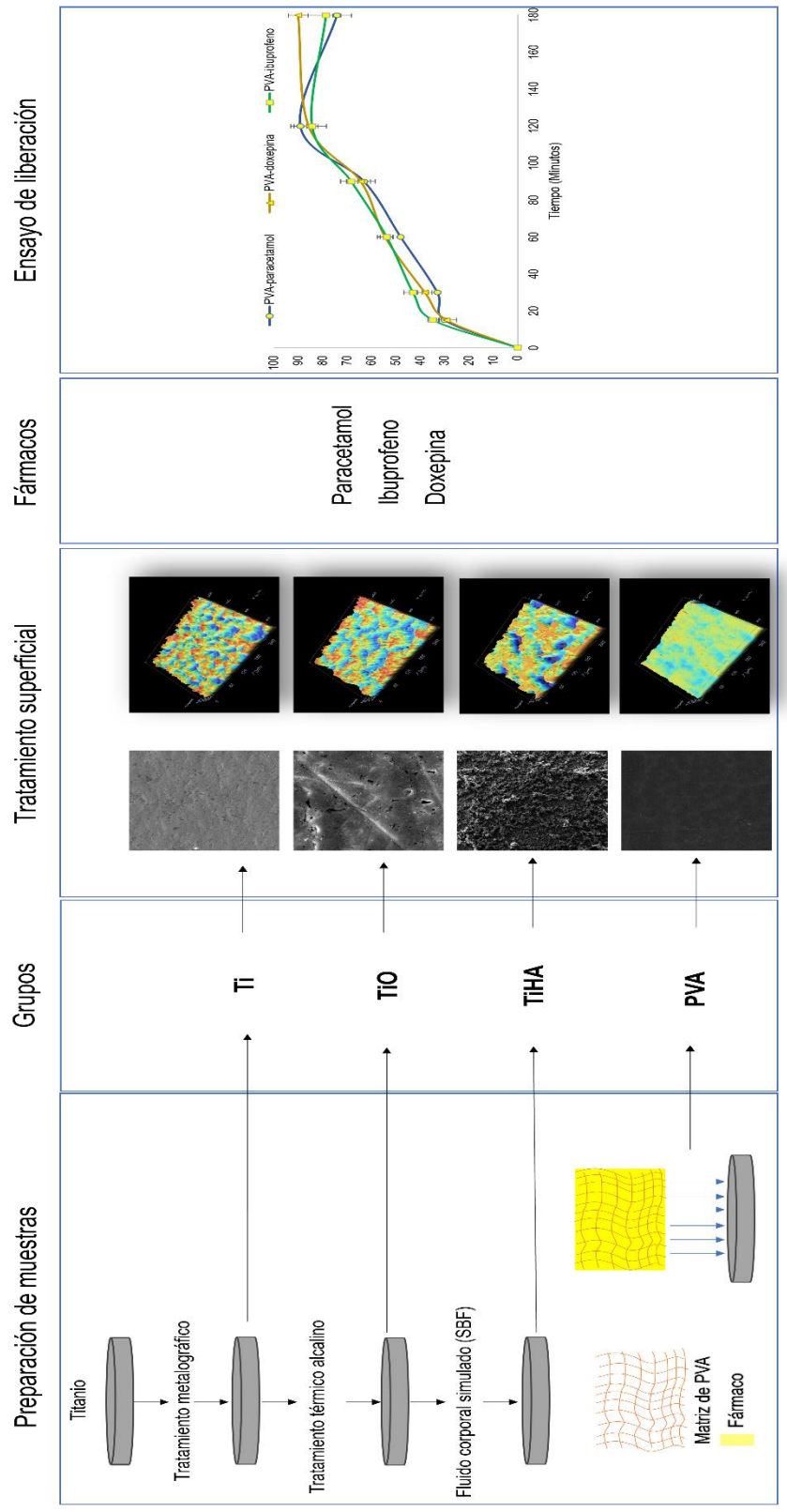

Figura 3.1. Gráfica resumen. Ti: Titanio. TiO: Titanio oxidado. TiHA: Titanio con precipitados de hidroxiapatita. PVA: Titano con recubrimiento de alcohol polivinilo.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Preparación de las superficies

Para este trabajo de investigación, fueron utilizados cilindros de titanio comercialmente puro de grado II ASTM (Manfredi, S. Secondo di Pinerolo, Italia). Las muestras fueron cortadas en discos con un diámetro de 15 mm y un grosor de 2 mm. Los discos que presentaron irregularidades debido al corte fueron descartados y las muestras seleccionadas fueron sometidas a un protocolo de limpieza y pulido. El cual consistió en sumergir las muestras en una solución de acetona (PanReac AppliChen ITW Reagent, Assay) al 99.5% para, posteriormente, someterlas a ultrasonidos durante 10 minutos y a una temperatura de 36 °C. Posteriormente, las muestras fueron retiradas de la solución de acetona y sometidas nuevamente a ultrasonido en una solución de agua desionizada para realizar una segunda etapa de limpieza durante 10 minutos a 36 °C.

Las muestras fueron retiradas del ultrasonido y se procedió a realizar un protocolo de pulido metalográfico utilizando papeles de carbono de silicio n°500, 800, 1200, 2500 y 4000 grit, asegurando un pulido gradual de la superficie.(130) Con el objetivo de estandarizar el proceso de pulido, todas las muestras fueron analizadas con un estereomicroscopio óptico (Olympus SZ-PT, Tokyo, Japan) a 100x después de cada paso para analizar que la superficie no presentara ralladuras. Como control de calidad, cada 10 muestras pulidas, se analizó una mediante microscopía confocal para asegurar una Ra <0.20 µm [escala de barrido con confocal de 240µmX200µm]. Los discos de titanio fueron sometidos al protocolo de limpieza descrito previamente entre cada cambio de papel de carbono de silicio para eliminar los restos de viruta depositados en la superficie.

Finalmente, las muestras fueron tratadas con plasma de radiofrecuencia de argón (Emitech, KX1050 Plasma Asher) a una potencia de 25W a 200 °C durante 15 minutos para remover todas las impurezas orgánicas. Inmediatamente después, la etapa de oxidación de las superficies fue estabilizada con agua durante 24 h. Los discos de titanio se dejaron secar durante 24 h a 37 °C.(131)

3.1.2 Grupos de estudio

Para este trabajo de investigación, se analizaron cuatro enfoques para la entrega focalizada de fármaco:

- Mediante inmersión directa de las superficies:
  - Titanio pulido (Ti).
  - Titanio oxidado (TiO).
  - Titanio con precipitados de hidroxiapatita (TiHA).
- Indirectamente
  - Mediante una matriz de alcohol polivinilo (PVA).

3.1.3 Método analítico

Tres fármacos diferentes fueron utilizados para este estudio: paracetamol (Fagron, Barcelona, España), ibuprofeno (Sigma–Aldrich, USA) y doxepina clorhidrato (Fagron, Barcelona, España). El método analítico seleccionado fue la espectrofotometría ultravioleta. Con la intención de validar dicho método analítico, se determinó si era exacto, preciso y lineal a partir de diferentes rectas de calibrado comprobando que el rango de concentraciones utilizado cumplía con la Ley de Beer-Lambert´s. Asimismo, se determinó experimentalmente la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los fármacos utilizados. En concreto, estas longitudes de onda fueron: 257 nm para el paracetamol, 222 nm para el ibuprofeno y 292 nm para la doxepina clorhidrato (λ max). El dispositivo utilizado es el UV-Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 40.

3.1.4 Preparación y modificación de las superficies de titanio

3.1.4.1 Preparación fisicoquímica de la superficie

Se prepararon tres superficies de titanio.

- **Superficie de titanio pulida (Ti):** Para este grupo las muestras fueron sometidas solamente al protocolo de limpieza y pulido metalográfico descrito en el apartado **3.1.1. Preparación de la superficie**. Este grupo fue considerado como grupo control.
- **Superficie de titanio oxidado (TiO):** Una vez que el tratamiento de pulido fue aplicado a las superficies, se procedió a realizar un tratamiento térmico

alcalino a la superficie. Como primer paso, las muestras fueron colocadas en vasos de precipitado e inmersas en hidróxido de sodio (NaOH) 5M a 60 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo de exposición a la solución de NaOH, las muestras fueron colocadas al ultrasonido y se procedió a realizar un protocolo de limpieza con la finalidad de eliminar las impurezas depositadas en la superficie. Por último, los discos se dejaron secar a 40 °C por 24 h.(25)

- **Precipitados de hidroxiapatita (TiHA):** Para lograr el recubrimiento con precipitado biomimético de hidroxiapatita en la superficie, la muestra fue sometida a un tratamiento térmico alcalino previo siguiendo la metodología en el grupo TiO. Durante el proceso de ionización de las superficies, se preparó una solución de SBF siguiendo la formula descrita por Jalota et al 2006 (Tabla 3.1).(37). Cuando las muestras se encontraron listas, estas fueron colocadas en vasos de precipitado y sumergidas en SBF a una concentración del 0.2% v/v durante 15 días a 36 °C. Cada 24 h la solución de fluido corporal simulado fue remplazada por el mismo volumen de solución SBF fresca.(37)

Tabla 3.1 Preparación de la solución de fluido corporal simulado. Formula; Tas-SBF (pH 7.4 at 36.7° - 37° C).(37)

Orden	Reactivo	Gramos
1	NaCl	9.8184
2	$NaHCO_3$	3.4023
3	KCl	0.5591
4	$Na_2 HPO_4$	0.2129
5	$MgCl2 * 6H_2O$	0.4574
6	1M HCl	15 ml
7	$CaCl_2 * 2H_2O$	0.5513
8	Na_2SO_4	0.1065
9	TRIS $(CH_2OH)_3CNH_2$	9.0855
10	1M HCl	~ 120 ml
11	Milli-Q water	up to 1000 ml

3.1.4.2 Diseño del recubrimiento a base de alcohol polivinilo

El recubrimiento de alcohol polivinilo (Panreac, Barcelona, España) fue elaborado a partir de un hidrogel debido a su simplicidad y bajo costo de la operación.(65,132,133) Como primer paso, se utilizó una concentración del 3% p/v de PVA [formula molecular: $(C_2H_4O)_n$; M= 72 000 g/mol]. Dicha concentración inicial fue integrada a un volumen de 4.5 ml de agua desionizada. El polvo de PVA se agregó lentamente mientras la solución se mantenía en agitación constante a temperatura ambiente hasta que el polvo de PVA fue completamente disuelto. Como segundo paso, se procedió a eliminar las burbujas de aire generadas durante la agitación. Para ello las soluciones se mantuvieron en reposo durante 48 h a temperatura ambiente.

Trascurrido el tiempo de reposo, las muestras fueron colocadas en placas de Petri y se dejaron secar a 37 °C durante 24 h. Las muestras presentaron una superficie uniforme, homogénea y libre de burbujas.

3.1.5 Carga farmacológica de los sistemas

3.1.5.1 Carga y determinación de la adsorción a la superficie

Se utilizó el proceso de inmersión para cargar las superficies de titanio. Todas las muestras fueron colocadas en vasos de precipitado y sumergidas en las soluciones de los fármacos anteriormente mencionados durante 24 horas y a 25 ºC. En concreto, las concentraciones seleccionadas fueron: 27.7 µg/mL para el paracetamol, 80 µg/mL para el ibuprofeno y 100 µg/mL para la doxepina. Por último, para determinar la cantidad de fármaco adsorbido a la superficie se recurrió a un método indirecto analizando la cantidad de fármaco encontrada en el sobrenadante de las soluciones mediante espectrofotometría y de acuerdo con la siguiente fórmula:

Rendimiento de adsorción (%) = (peso del fármaco en superficies) / (peso del fármaco utilizado inicialmente) x 100

3.1.5.2 Carga del recubrimiento de alcohol polivinilo

Para cargar el recubrimiento de alcohol polivinilo, el polvo de PVA fue agregado a una solución que contenía las concentraciones de fármaco previamente establecidas. Para el diseño del recubrimiento de PVA se utilizó el procedimiento de evaporación de solvente descrito, en el apartado **3.1.4.2 Diseño del recubrimiento de alcohol polivinilo**.

3.1.6 Caracterización de la superficie

3.1.6.1 Análisis de la topografía y humectabilidad

El análisis topográfico de las superficies se realizó por medio de un microscopio confocal de luz blanca (PLμ Sensofar-Tech, Barcelona, España), tres discos por grupo fueron examinados con un objetivo EPI x50 (285 x 209 μm²) obteniendo tres topografías por disco. El software del microscopio proporcionó datos sobre los parámetros topográficos.(130) Los parámetros analizados fueron la rugosidad media (Ra), la rugosidad máxima (Rp altura relativa máxima), la rugosidad del valle (Rv profundidad relativa máxima), la altura absoluta (Rmax / t =Rp+Rv), la raíz cuadrada media (Rq), la asimetría (Rsk) y la curtosis (Rku).(134) El análisis topográfico fue utilizado para controlar el proceso de pulido de las superficies.

La humectabilidad se evaluó en tres discos de cada grupo midiendo el ángulo de contacto mediante la técnica ADSA-CD (Axisymmetric Drop Shape Analysis-Contact Diameter). El ángulo de contacto (θ) se determinó a partir de una gota sésil de 1 ml depositada en la superficie con una micropipeta, utilizando agua purificada Milli-Q para las mediciones. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada disco.

3.1.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los sistemas trasportadores de fármaco fueron analizados en tamaño, forma y propiedades superficiales mediante microscopía electrónica de barrido. (Hitachi S-5-10, Tokyo, Japón). Antes del análisis, las muestras se montaron en una superficie de aluminio usando una cinta adhesiva de doble cara y haciéndolo conductor de electricidad mediante el recubrimiento con una fina capa de oro (aproximadamente 20 nm) al vacío.

3.1.7 Determinación *In vitro* del ensayo de liberación

Para determinar el perfil de liberación de las muestras, los discos se introdujeron en vasos de precipitado que contenían 3.5 mL de agua desionizada en un baño termostático hasta que alcanzaron la temperatura de 37 °C. Las muestras se mantuvieron bajo agitación continua a 200 rpm durante 6 h a 37 °C. Para determinar el perfil de liberación, se extrajo un 1 mL del medio a intervalos de tiempo previamente establecidos. La solución fue remplazada con el mismo volumen de medio. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría.

3.1.8 Análisis estadístico

Los parámetros del ángulo de contacto y rugosidad fueron tratados mediante el análisis de la varianza y una prueba de comparación múltiple student-Newman Keuls. Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar y los resultados se señalaron como diferencia significativa cuando $p<0.05$.

3.2 Resultados

3.2.1 Topográfica de las superficies bioactivas

La tabla 3.2 muestra el ángulo de contacto y los parámetros de rugosidad de las superficies. La superficie TiHA presentó los valores más altos de Ra, Rq y Rp. Los valores de Rv y Rt fueron diferentes para cada superficie, siendo la superficie Ti la que presentó los valores más bajos. Rsk fue significativamente negativa para la superficie PVA y casi 0 para la superficie Ti; la superficie PVA y TiHA presentaron una superficie platicurtica. Las superficies Ti y TiHA obtuvieron una Rku cercana a 3. La humectación superficial fue mayor para TiHA y TiO, que obtuvieron resultados similares. Ti y PVA obtuvieron resultados similares pero inferiores a los otros dos. Las figuras 3.2 y 3.3 muestran el perfil topográfico y la caracterización de las superficies analizadas, respectivamente.

Tabla 3.2 Parámetros de rugosidad y ángulo de contacto.

Grupos	R_p (µm)	R_v (µm)	R_a (nm)	R_q (nm)	R_{max} (µm)	Rsk	Rku	Ángulo de contacto
Ti	1.13 (0.12)^{a}	-1.03 (0.29) ^{a}	0.19 (0.02)^{a}	0.23 (0.03)^{a}	1.95 (0.35)^{a}	-0.22 (0.08)^{a}	2.87 (0.87)^{a}	59 (4)^{a}
TiO	0.71 (0.09)^{b}	-5.57 (2.44)^{b}	0.17 (0.05)^{a}	0.31 (0.15)^{ab}	6.28 (2.49)^{b}	-5.55 (2.75)^{b}	68.73 (50.69)^{b}	20 (5)^{b}
TiHA	12.86 (1.74)^{c}	-25.84 (3.02)^{c}	3.99 (0.67)^{b}	5.22 (0.63)^{c}	38.71 (2.28)^{c}	0.18 (0.35)^{c}	3.98 (0.78)^{c}	23 (2)^{b}
PVA	1.28 (0.16)^{d}	-10.58 (0.53)^{d}	0.22 (0.02)^{a}	0.44 (0.08)^{bd}	10.68 (2.45)^{d}	-16.70 (5.95)^{d}	357.87 (99.58)^{d}	53 (4)^{c}

Ti: Titanio. TiO: Titanio oxidado. TiHA: Titanio con precipitados de hidroxiapatita. PVA: Recubrimiento de alcohol polivinilo. Parámetros analizados: Altura máxima de los picos (R_p). Profundidad máxima de valles (R_v). Altura máxima aritmética (R_a). Rugosidad cuadrática media (R_q). Altura máxima de perfil (R_{max}). Asimetría (Rsk). Curtosis (Rku). n=6. Los valores en cada fila con letras diferentes fueron estadísticamente diferentes. ($p<0.05$).

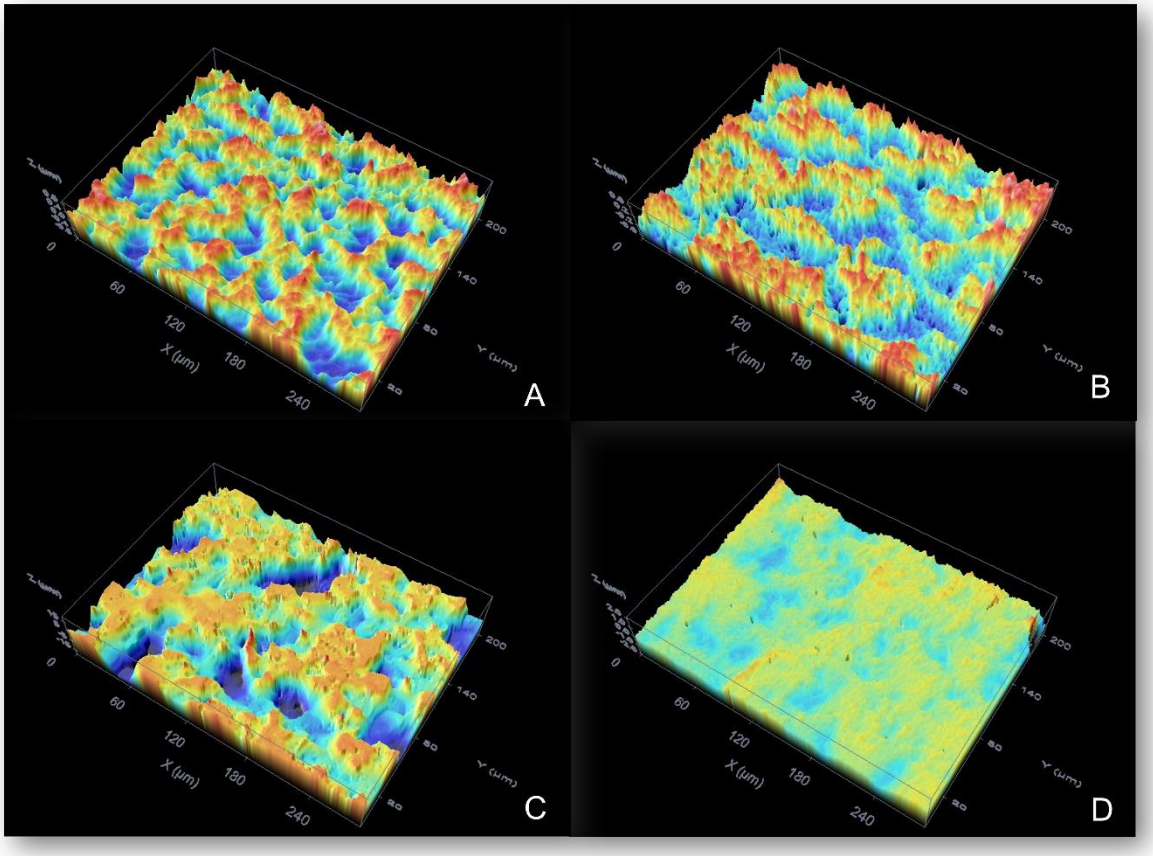

Figura 3.2. Imágenes topográficas de las superficies de titanio analizadas. A) Ti: Titanio. B) TiO: Superficie de titanio oxidada. C) TiHA: Superficie de titanio con precipitados de hidroxiapatita. D) PVA: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo.

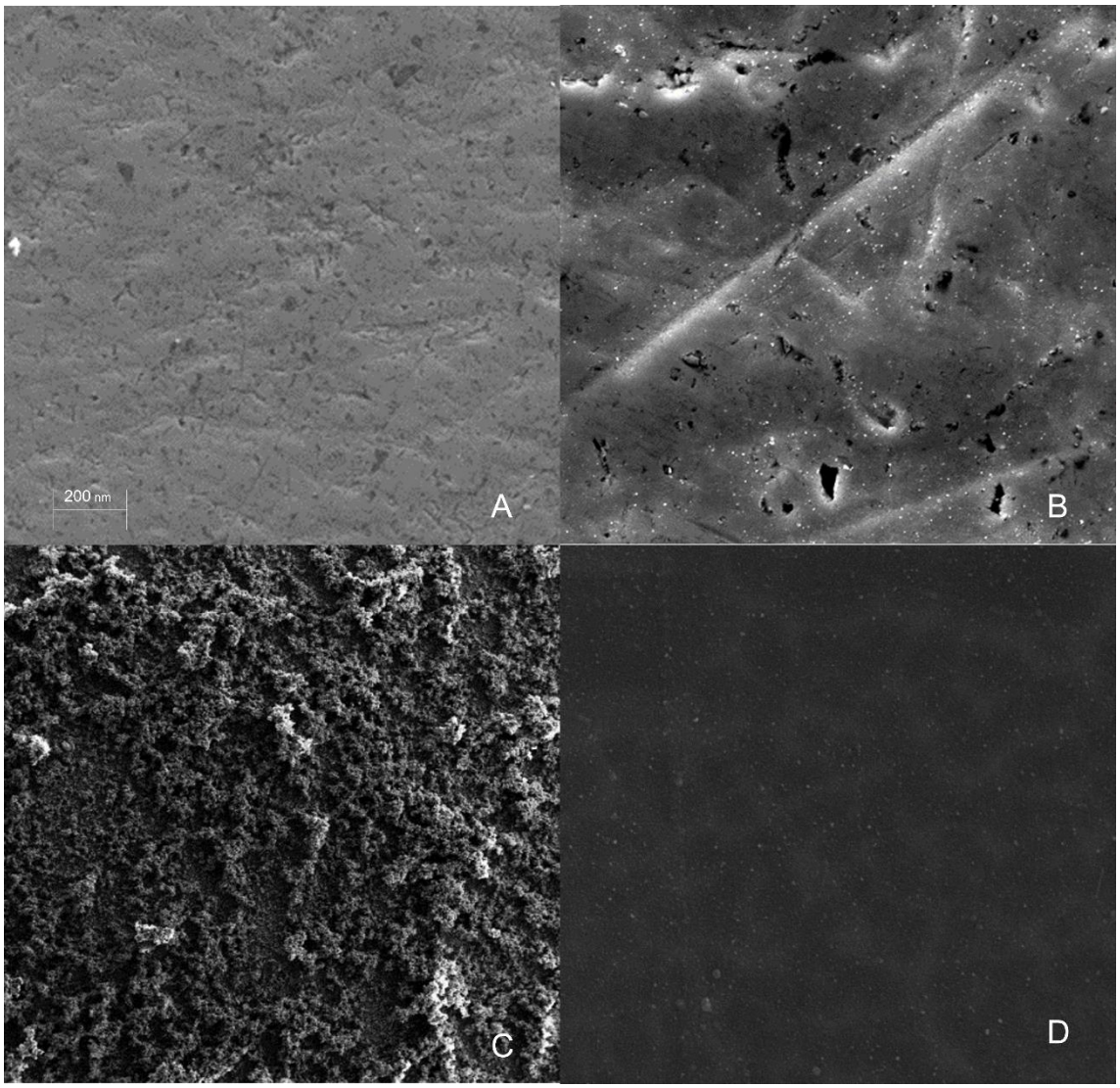

Figura 3.3. Imágenes SEM ilustrativa de los tratamientos superficiales. A) Ti: Titanio. B) TiO: Superficie de titanio oxidada. C) TiHA: Superficie de titanio con precipitados de hidroxiapatita. D) PVA: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo.

3.2.2 Determinación de la adsorción a la superficie

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 3.3, las superficies de titanio modificadas no adsorbieron ibuprofeno ni doxepina. Solo en la superficie de titanio mecanizado fue posible medir una baja dosis de ambos, ibuprofeno (0.8 µg/ml) y doxepina (0.77 µg/ml). En cuanto al paracetamol, fue posible detectar adsorción en las tres superficies bioactivas. La superficie de titanio mecanizo logró el mayor porcentaje de paracetamol detectado en la superficie (4.77 µg/ml), seguida de la superficie de titanio oxidada (4.36 µg/ml), mientras que la superficie con precipitados de hidroxiapatita presentó la dosis más baja de adsorción (<0.1 µg/ml).

En cambio, el recubrimiento de PVA fue cargado con éxito para todos los fármacos. Las superficies de titanio recubiertas con la matriz de alcohol polivinilo fueron cargadas con una concentración de 13.01 ± 1.4 µg para el paracetamol, 37.58 ± 3.3 µg para el ibuprofeno y 47.01 ± 4.2 µg para la doxepina.

Tabla 3.3 Capacidad de adopción de las superficies modificadas

Fármaco	Ti	TiO	TiHA	PVA
Paracetamol*	23 (2)	21 (2.5)	< 0.5	63 (9.6)
Ibuprofeno**	2 (1.1)	-	-	47 (4.1)
Doxepina***	1 (0.4)	-	-	47 (4.2)

Ti: Titanio. TiO: Titanio oxidado. TiHA: Titanio con precipitados de hidroxiapatita. PVA: Recubrimiento de alcohol polivinilo. Todas las mediciones están expresadas en porcentajes (%) con sus desviaciones estándar. Concentración del fármaco: * 20.77 µg/ml, ** 80 µg/ml and *** 100 µg/ml. n=3

3.2.3 Determinación *In vitro* del ensayo de liberación

Debido al bajo o nulo porcentaje de adsorción de las superficies modificadas, los perfiles de liberación no pudieron ser detectados debido a la baja dosis de fármaco adsorbido. Caso contrario a las superficies recubiertas con la matriz de PVA, donde el perfil de liberación si pudo ser detectado y los sistemas presentaron comportamientos similares en la liberación del fármaco (figura 3.4). Para entender el comportamiento de los sistemas liberadores de fármaco y de acuerdo con lo que se observa en la figura 3.4, el perfil de liberación se divide en dos fases. Una primera fase donde la liberación se aprecia de forma acelerada —Llamada fase liberación rápida—, seguido de un perfil de liberación lento, gradual y sostenido —considerada esta fase de liberación sostenida—. Durante los primeros 30 minutos menos del 40% de paracetamol y doxepina fue liberado desde el recubrimiento de PVA. La liberación de ibuprofeno en este punto sobrepaso este valor, liberando un poco más del 40 % a los 30 minutos. A partir de este punto dio inicio una liberación sostenida de los sistemas. Tanto el recubrimiento cargado con paracetamol como con ibuprofeno alcanzaron el pico máximo de liberación a los 120 minutos. Mientras que el recubrimiento cargado con doxepina alcanzó su pico máximo a los 180 minutos.

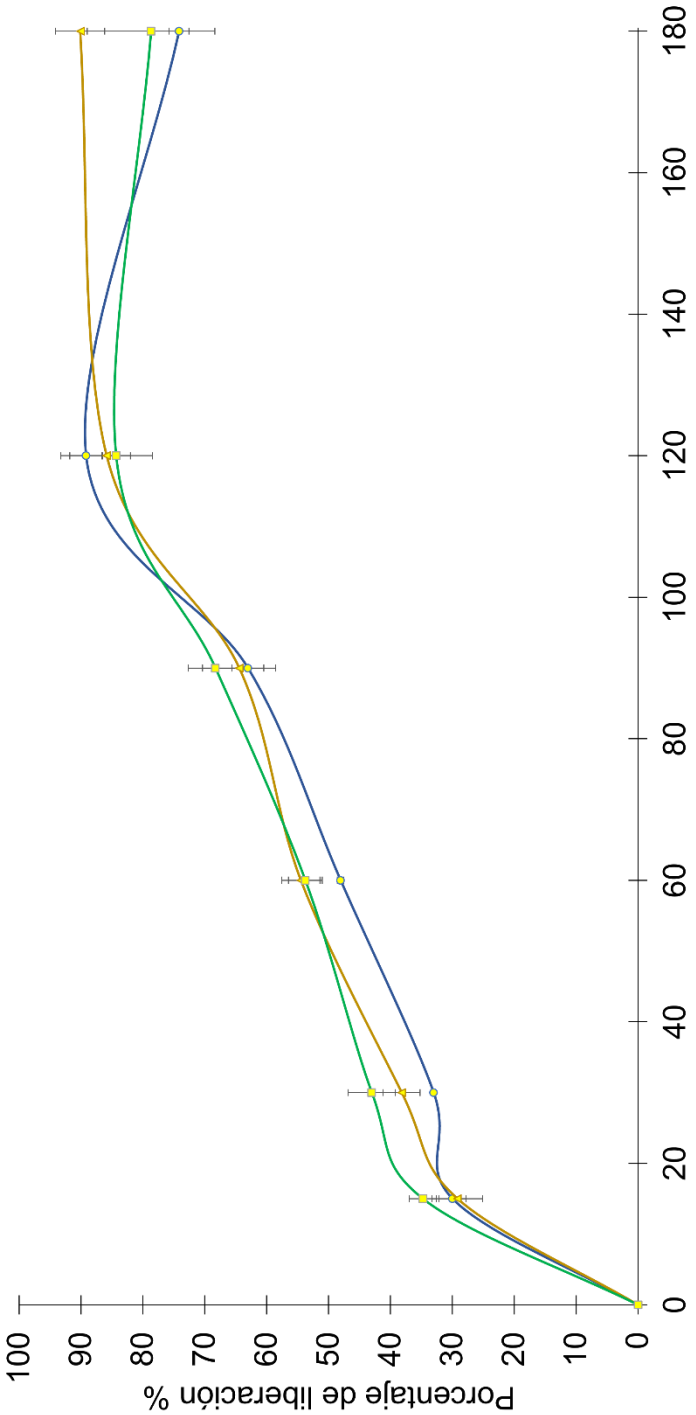

Figura 3.4. Ensayo *In vitro* del perfil de liberación de los recubrimientos de alcohol polivinilo. PVA: Alcohol polivinilo. El tiempo se encuentra expresado en minutos.

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 4

Nueva superficie de Ti recubierta con hidrogel de PVA y nanopartículas de chitosan con liberación de fármacos antimicrobianos

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Siguiendo la hipótesis de esta Tesis Doctoral y como se ha visto a lo largo del trabajo de campo en el **capítulo 3**, es necesario un vehículo de trasporte capaz de portar fármaco. Por ello, para este **capítulo 4**, se han diseñado y desarrollado dos sistemas liberadores de fármacos que sirvieron como recubrimiento de la superficie de titanio. Los sistemas fueron diseñados mediante el uso de polímeros; un polímero de origen natural como es el chitosan el cual fue utilizado para sintetizar nanopartículas (NP), así como el uso de un polímero sintético para crear una matriz de tres dimensiones a base de alcohol polivinilo (PVA). Tanto las nanopartículas como los recubrimientos de PVA constituyen matrices poliméricas que fueron cargadas con tres fármacos diferentes: doxiciclina, vancomicina y doxepina. Las muestras fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido y mediante dispersión dinámica de luz para determinar el tamaño, carga, polidispersidad y morfología de las partículas. Se evaluó la topografía y se analizó la eficacia de encapsulación, así como la liberación de los sistemas. Del mismo modo, se realizó un estudio *In vitro* para evaluar la eficacia antimicrobiana de los sistemas. Para ello, se recolectó un cultivo de placa dentobacteriana de pacientes que acudieron a la clínica universitaria para realizarse un raspado dental. En la figura 4.1 se puede observar la representación ilustrativa del desarrollo de los sistemas liberadores de fármacos y grupos de estudio.

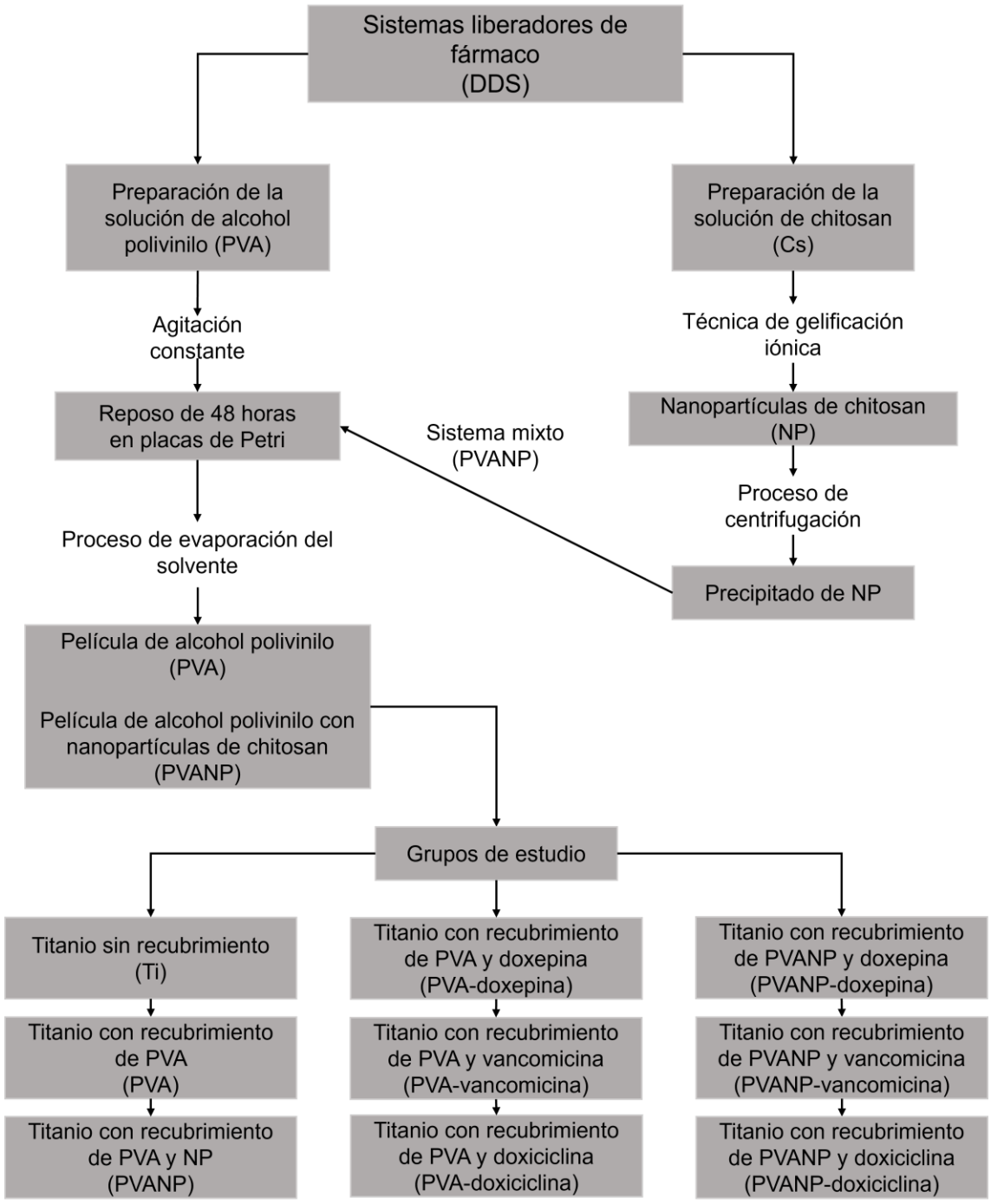

Figura 4.1. Representación ilustrativa del desarrollo de los sistemas liberadores de fármacos y grupos de estudio.

4.1 Material y método

4.1.1 Preparación de la superficie de titanio

Para este estudio, se utilizaron cilindros de titanio comercialmente puro ASTM Grado II (Manfredi, S. Secondo di Pinerolo, Italia). Los cilindros fueron cortados en discos de titanio con un diámetro de 15 mm y un espesor de 2 mm, una vez realizado el proceso de corte las muestras fueron seleccionadas y los discos de titanio fueron tratados mediante un protocolo de pulido metalográfico. La metodología para el tratamiento de las muestras se encuentra descrita en el apartado **3.1.1 Preparación de la superficie** del **Capítulo 3**.

4.1.2 Grupos de estudio

Para este **capítulo 4** se utilizaron tres enfoques para cargar la superficie de titanio en la entrega dirigida de medicamento.

- Titanio pulido (Ti).
- Matriz de alcohol polivinilo (PVA).
- Matriz de alcohol polivinilo con nanopartículas de chitosan (PVANP).

Por un lado, una superficie de titanio mecanizada (Ti), una matriz a base de alcohol polivinilo (PVA) y una matriz a base de PVA cargada con nanopartículas de chitosan (PVANP). Las matrices fueron utilizadas para recubrir la superficie de titanio mecanizado.

4.1.3 Método analítico

Los sistemas liberadores analizados en este capítulo fueron cargados con tres fármacos: Doxiciclina (Panreac, AppliChem, Bacerlona, España), Vancomicina (Pfizer, Madrid, España) y Doxepina Hidrocloruro (Fagron, Bacerlona, España). El método analítico seleccionado fue la espectrofotometría ultravioleta. Con la intención de validar dicho método analítico, se determinó si era exacto, preciso y lineal a partir de diferentes rectas de calibrado comprobando que el rango de concentraciones utilizado cumplía con la Ley de Beer-Lambert´s. Asimismo, se determinó experimentalmente la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los fármacos utilizados.

En concreto, estas longitudes de onda fueron: 270 nm para la doxiciclina, 280 nm para la vancomicina y 292 nm para la doxepina (λ_{max}). El dispositivo utilizado es UV-Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 40.

4.1.4 Carga de las superficies

4.1.4.1 Adsorción de la superficie de titanio

Para determinar si los antibióticos se adsorbían a la superficie. Las muestras de titanio fueron sumergidas en las concentraciones seleccionadas y se empleó la metodología explicada en la sección **3.1.5.1 Carga y determinación de la adsorción a la superficie.**

4.1.4.2 Síntesis y caracterización de las nanopartículas

4.1.4.2.1 Método de gelificación iónica

Como ya se ha mencionado en la sección **1.6.5.1 Nanopartículas orgánicas**, existen diferentes metodologías para la síntesis de nanopartículas a base de chitosan. Entre las cuales podemos encontrar, el método de gelificación iónica, método de coacervación complejo, método de coprecipitación, método de microemulsión, método micelar inverso y el método de evaporación de disolvente basado en emulsión. El amplio estudio de las diferentes metodologías para la síntesis de NP busca facilitar la síntesis, reducir costos y la optimización del sistema. Dependiendo del método de síntesis empleado, las características de las nanopartículas se verán condicionadas. Siendo el método de gelificación iónica la que ha atraído considerablemente la atención debido a que es un método de fácil preparación, no es tóxico, no utiliza solventes orgánicos fuertes y evita las altas temperaturas.(84,97)

El método de gelificación iónica fue descrito en 1997 por Calvo et al., esta metodología para la síntesis de NP de chitosan se basa en la interacción electroestática mediante agitación mecánica entre tipos de cargas opuestas como pueden ser el chitosan (catión) y el tripolifosfato sódico [TTP (anión)]. Para ello, es necesario liberar los cationes y aniones presentes en el Cs y el TTP. Esto se consigue disolviendo el Cs y el TTP en una solución acida, para lo que se utiliza ácido acético y agua destilada.(135–138)

Cuando los aniones libres del TTP se ponen en contacto con la solución de Cs, el polianión cargado negativamente se une a un grupo amino cargado positivamente produciéndose una interacción de cargas. Induciendo al chitosan a un proceso de gelificación, lo que lleva a la formación de NP.(98,139)

La síntesis de NP mediante gelación iónica por lo general da como resultado partículas que suelen oscilar en tamaño, estando este por encima de 100 nm y un potencial zeta que varía entre 20 a 60 mV. Sin embargo, es posible conseguir tamaños inferiores al modificar la relación masa Cs:TPP.(49,84,100,139) Por otro lado, el índice de polidispersión (PDI) de las NP, un valor que nos indica su dispersión en solución suele superar el 0,1, llegando en ocasiones hasta el 0,5 cuando las NP son sintetizadas mediante este método.(93,100)

El proceso consistió en dispersar 0.069% p/v de chitosan $(C_6H_{11}NO_4)_n$ de bajo peso molecular (Sigma Aldrich, Madrid, España) en agua desionizada. Posteriormente, se procedió a disolver el CS añadiendo 1% v/v de ácido acético mientras la solución se mantenía en agitación durante 15 min a temperatura ambiente. Por separado, se realizó una solución de tripolifosfato sódico (TTP) (Alfa Aesar, Kandel, Alemania). Para ello fue agregado 0.2% p/v de polvo de TTP en agua desionizada mientras la solución estaba en agitación constante hasta que el TTP fue disuelto. La solución de TTP se ajustó a pH 5 con HCL 37% (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia).

Para la síntesis de las NP se siguió la proporción Cs:TPP de 9:1 descrita por Almalik et al 2017.(93) La solución resultante se mantuvo en agitación a 500 rpm durante un tiempo de 4 horas a temperatura ambiente. Para cargar las NP de fármaco, las concentraciones de fármaco establecidas previamente fueron incorporadas en la solución de chitosan antes de agregar la solución de TPP. Transcurrido el tiempo establecido para la síntesis, la solución se centrifugó 14 x 1000 rpm durante 20 min. Por último, las muestras fueron re-dispersadas en 4.5 ml con la intención de obtener una concentración por volumen mayor.

4.1.4.2.2 Carga eléctrica superficial, tamaño y polidispersión

Para la caracterización del sistema se utilizó el método analítico de dispersión dinámica de luz (DSL). El dispositivo empleado fue un Malvern Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido), a 25,0 ± 0,5 °C. El

tamaño de las nanopartículas fue expresado en nanómetros (nm), fue obtenido mediante la medida de la dispersión dinámica de la luz con retrodispersión no invasiva óptica (NIBS). La carga eléctrica superficial del sistema fue expresada en milivoltios (mV) y fue analizada mediante el método analítico de dispersión de luz electroforética y un analizador de peso molecular con dispersión de luz estática. Las mediciones obtenidas fueron procesadas mediante el software Malvern Instruments.

4.1.4.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación (DEE%)

Un parámetro importante que se debe conocer de los sistemas trasportadores de fármaco es la capacidad de encapsular y trasportar el principio activo. Para ello, evaluamos la eficacia de encapsulación (DEE%) mediante un método indirecto. Las NP cargadas con doxiciclina, vancomicina y doxepina fueron centrifugadas mediante el mismo procedimiento descrito en la sección **4.1.4.2.1 Método de gelificación iónica**. Una vez obtenido el sobrenadante, la muestra fue analizada por el método analítico de espectrofotometría ultravioleta visible descrito en el apartado **4.1.3 Método analítico**.

La DEE% se determinó siguiendo la fórmula:

Eficacia de encapsulación (%) = (peso del fármaco en nanopartículas) /(peso del fármaco utilizado inicialmente) × 100

4.1.4.2.4 Propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas

Otra característica importante que se debe conocer del sistema es la capacidad de adhesión de las nanopartículas. La evaluación de la mucoadhesión puede realizarse *in vitro*, *ex vivo* o mediante métodos farmacocinéticos. Sin embargo, para esta Tesis Doctoral se utilizaron métodos *In vitro*, tales como el método turbidimétrico y el método indirecto. Para realizar la prueba de adhesión se utilizó una concentración de 0.5 mg mL^{-1} de mucina en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) — por sus siglas en ingles *Phosphate Buffered Saline*— con pH 6.4.

Posteriormente, la solución de NP se puso en contacto con la de mucina en una proporción 1:1 v/v bajo agitación constante y 37°C. Se incubaron muestras a

diferentes intervalos de tiempo de 1, 2, 3 y 4 h. Para el método turbidimétrico, la muestra fue centrifugada a 14 x 1000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue cuantificado a 255 nm mediante espectrofotometría. Para calcular el porcentaje de mucina adherida a la superficie de las NP, se utilizó la siguiente formula:

Eficacia de la unión a la mucina (%) = Mucina inicial (cantidad) - Mucina libre (cantidad)/ Mucina inicial (cantidad)x 100

Además, las propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas de chitosan (cargadas con y sin fármaco) fue evaluado mediante el potencial zeta (ζ-potential) utilizando el método analítico DLS descrito en el apartado **4.1.4.2.2 Carga eléctrica superficial, tamaño y polidispersidad**.(140)

4.1.4.3 Preparación de los recubrimientos PVA y PVANP

Los recubrimientos de PVA se diseñaron mediante el proceso de evaporación del solvente, siguiendo la metodología descrita en la sección **3.1.4.2 Diseño del recubrimiento a base de alcohol polivinilo** correspondiente al **capítulo 3**.

Mientras que, para el diseño del sistema mixto PVANP, se diseñó una matriz a base de PVA la cual fue cargada con NP. Para su preparación, se diseñaron matrices libres de fármacos siguiendo el proceso de evaporación de solvente explicado en el aparato **3.1.4.2 Diseño del recubrimiento a base de alcohol polivinilo**. Al mismo tiempo se sintetizaron NP de chitosan siguiendo la metodología explicada en el apartado **4.1.4.2.1 Método de gelificación iónica**. El precipitado resultante de las NP fue re-dispersado en una solución de PVA a 4.5 ml —Esta muestra fue nombrada PVANP—. Para evitar la posible aglomeración de las NP causado por el proceso de centrifugado, las muestras de PVANP se colocaron a ultrasonido durante 15 minutos. Finalmente, las soluciones de PVA y PVANP fueron vertidas cuidadosamente en placas de Petri y se dejaron secar durante 24 h a 37 °C. Se repitió el mismo proceso para las NP cargadas con los fármacos.

4.1.5 Caracterización de la superficie

4.1.5.1 Análisis de la topografía y humectabilidad

El análisis topográfico, así como las propiedades de humectabilidad de la superficie se encuentran descritos en el **capítulo 3**. En la sección **3.1.6 Caracterización de la superficie**.

4.1.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los sistemas transportadores de fármaco fueron analizados en tamaño, forma y propiedades superficiales mediante microscopía electrónica de barrido. (Hitachi S-5-10, Tokyo, Japón). Antes del análisis, las muestras se montaron en un soporte de aluminio usando una cinta adhesiva de doble cara y haciéndolo conductor de electricidad mediante el recubrimiento con una fina capa de oro (aproximadamente 20 nm) al vacío.(65)

4.1.6 Ensayo de liberación *In vitro*

Para los ensayos de liberación de los sistemas PVA y PVANP se siguió la metodología descrita en la sección **3.1.7. Determinación *In vitro* del ensayo de liberación**. Sin embargo, para comprender el comportamiento del perfil de liberación de las NP se realizaron pruebas de liberación antes de incorporarlas a la matriz de alcohol polivinilo. Para ello, como medio de liberación se utilizó 50 ml de saliva artificial a 37 °C. En dicho medio, se sumergieron bolsas de diálisis con 1.5 ml de muestra de NP. A intervalos de tiempo previamente predeterminados se procedió a retirar 1 ml de muestra e inmediatamente después la solución se repuso con un volumen igual de saliva artificial fresca. Las muestras recolectadas fueron determinadas mediante espectrofotometría a 270 nm, 280 nm y 292 nm (λ_{max}) para Doxiciclina, Vancomicina y Doxepina, respectivamente.

4.1.7 Actividad antimicrobiana

4.1.7.1 Cultivo de la placa dentobacteriana

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de la institución donde se realizó la investigación n° 2708/CEIH/2022. A todos los participantes se les informó de las características del estudio y aquellos participantes que estuvieron de acuerdo dieron su consentimiento informado antes de realizar el estudio.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sistemas transportadores de fármaco, se tomaron muestras clínicas de placa dental supragingival de 15 pacientes que acudieron a consulta para una limpieza dental en la clínica universitaria. Las muestras de placa dental fueron rápidamente depositadas en tubos de ensayo que contenían solución de caldo de soja enriquecido con Tryptic (TSB) — por sus siglas en inglés *Tryptic enriched Soy Broth solution* — y almacenadas a -20 °C para su futuro análisis.

4.1.7.2 Formación del cultivo sobre la superficie de titanio

Como primer paso se prepararon suspensiones bacterianas en TSB y se ajustaron a una concentración de 10^8 UFC/ml durante 4 días. Posteriormente, biopelículas naturales procedentes de la placa dental fueron cultivadas en la superficie de los discos. Para ello, se transfirieron discos de Ti estériles con y sin recubrimientos a una placa nueva de 12 pocillos (JET Biofil, Guangzhou, China). Inoculando los pocillos con 1 ml de la suspensión bacteriana. Las muestras fueron expuestas a las biopelículas durante un periodo de 4 y 24 h a 37ºC en condiciones anaeróbicas. Terminado el tiempo de exposición los discos de titanio fueron removidos y lavados con 2 ml de solución salina para eliminar las bacterias que se encontraran débilmente adheridas a la biopelícula depositada en la superficie de titanio. Los discos fueron posteriormente trasferidos a tubos que contenían 1 ml de TSB, se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se sometieron a ultrasonidos durante 10 minutos para recuperar las bacterias en el medio de cultivo.

4.1.7.3 Propiedades antimicrobianas de los sistemas trasportadores de fármaco

Para analizar las propiedades antimicrobianas de los sistemas se estudiaron 15 muestras por grupo y el tiempo de incubación evaluado fue de 4 y 24 h. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante tres métodos analíticos:

- Unidades Formadoras de Colonias (UFC): La biopelícula recuperada se diluyó en serie (10^{-1} - 10^{-5}) y se sembraron alícuotas de 10 µl de cada dilución en un medio de cultivo de agar sangre. Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 72 horas a 37ºC. Tras este periodo, se contaron las colonias y se calculó el número de UFC/ml. Se evaluaron tres muestras por grupo. Los resultados fueron expresados como Log_{10} (UFC).

- Ensayo de trifosfato de adenosina (ATP): Para el ensayo de ATP, se añadieron 100 µl de la suspensión bacteriana recuperada a 100 µl del reactivo BacTiter-Glow (BacTiter-Glo; Promega, Madison, WI) en una placa negra de 96 pocillos (Greiner, Monroe, NC) y se incubaron durante 5 minutos. La luminiscencia producida se midió con un luminómetro (GloMax; Promega, Madison, WI). Se calculó la media de las señales del cultivo bacteriano menos la media de la TSB enriquecida sola (control) y se expresó como unidades luminosas relativas (RLU).(141)

- CLSM: 3 muestras adicionales por grupo se contaminaron como se ha explicado anteriormente y se prepararon para su observación mediante microscopía confocal. Para ello, tras la incubación, las muestras se enjuagaron con solución salina y se tiñeron con el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Invitrogen, Eugene, OR).(142) El kit contiene Syto-9 el cual se une a bacterias con membrana intacta y yoduro de propidio (PI) que marca bacterias con membrana dañada. Los discos fueron teñidos con los colorantes durante 15 min protegidos de la luz y posteriormente observados bajo un microscopio confocal de barrido laser (Leica TCS-SP5 II, Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron 494/518 nm para Syto-9 y 536/617 nm

para PI. Se obtuvieron diez volúmenes confocales microscópicos (stacks) de áreas aleatorias de cada grupo utilizando un objetivo de aceite 40X con un tamaño de paso de 1 mm y una resolución de 512 x 512 píxeles.
Para el análisis cuantificativo de las imágenes, se procedió a utilizar el sofware bioimage_L (http://www.bioimageL.com/get_bioimage_L).(143) La variable evaluada en cada grupo fue el bio-volumen de células con membrana intacta.

- SEM: Tras el periodo de incubación, tres muestras por grupo se trataron con glutaraldehído al 2,5% en PBS (pH 7.2) durante 20 min para fijar las bacterias, a lo que siguió la deshidratación en alcoholes graduados, el secado en punto crítico y el recubrimiento de carbono. Por último, se examinó la superficie con un microscopio electrónico de barrido (Leo 1430-VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

4.1.8 Análisis estadístico

Para el tratamiento de los datos mediante el análisis estadístico se procedió de la siguiente forma:

- Los valores obtenidos del tamaño, carga superficial (ζ-potential) y la polidispersión (PDI) se analizaron mediante la prueba de Fisher, seguido de la prueba t-student. Los parámetros del ángulo de contacto y rugosidad fueron tratados mediante el análisis de la varianza y una prueba de comparación múltiple student-Newman Keuls. Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar y los resultados se señalaron como diferencia significativa cuando $p<0.05$. Para los ensayos antimicrobianos, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de las variables transformadas. Se confirmó que los datos no seguían una distribución normal, por lo que se procedió a realizar comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y comparaciones por pares entre grupos y entre tiempos de incubación (4 h frente a 24 h), mediante la prueba de Mann-Whitney. El nivel de significación se fijó en $p<0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 20.0.

4.2 Resultados

4.2.1 Caracterizaciones fisicoquímicas de las nanopartículas de chitosan

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 4.1, se puede observar una disminución en el diámetro hidrodinámico cuando las NP fueron cargadas con vancomicina y doxepina. El grupo NP-vancomicina presentó una disminución de tamaño de 5.09 nm, mientras que el grupo NP-doxepina disminuyó su tamaño 20.27 nm. La reducción del diámetro hidrodinámico para estos sistemas no presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$). Sin embargo, cuando las nanopartículas fueron cargas con doxiciclina se observó un incremento del diámetro hidrodinámico del 226.93%. En adición, otro parámetro importante para determinar la uniformidad del tamaño de las partículas es la PDI. De la misma forma que se observó en el diámetro hidrodinámico, el PDI de las NP-vancomicina y NP-doxepina no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$). Sin embargo, la muestra NP-doxiciclina presentó un parámetro elevado y en ambos casos (diámetro hidrodinámico y PDI) el sistema NP-doxiciclina si presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

Por otro lado, la carga superficial de las nanopartículas fue similar para casi todos los grupos. En concreto, el grupo NP-vancomicina mostró el valor de potencial zeta más alto. El sistema presentó un incremento de 3.78 mV cuando fue cargado con vancomicina, pudiéndose observar diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). Por otro lado, el potencial zeta de los sistemas fue estable en función del tiempo. Las mediciones de la carga superficial fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo, pudiéndose observar en la tabla 4.2 como los sistemas presentaron una carga superficial > 30 mV después de 15, 30 y 45 días.

Tabla 4.1 Caracterización de las nanopartículas a base de chitosan.

Grupos	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial-ζ (mV)	PDI
NP	354.57 (86.29)*	48.12 (7.23) *	0.556 (0.17)*
NP-doxepina	334.30 (98.15)	46.05 (9.25)	0.498 (0.13)
NP-vancomicina	349.48 (90.29)	51.90 (2.75) *	0.557 (0.13)
NP-doxiciclina	804.64 (121.83)*	47.10 (3.69)	0.646 (0.21)*
NP: Nanopartículas, nm: nanómetros, mV: milivoltios, PDI: índice de polidispersidad. La igualdad de varianzas se analizó con la prueba de Fisher. La comparación entre NP sin carga y con carga se determinó mediante la prueba t de Student. Todas las medidas se expresan con sus desviaciones estándar. Diferencia estadísticamente significativa. * $p < 0.05$. n=3			

Tabla 4.2 Prueba de estabilidad.

Tiempo	NP	NP-doxepina	NP-vancomicina	NP-doxiciclina
1	48.12 (7.23)	46.05 (9.25)	51.90 (2.75)	47.10 (3.69)
15	44.07 (1.93)	46.72 (2.05)	40.93 (2.84)	46.58 (1.89)
30	34.27 (3.22)	47.44 (1.01)	44.16 (1.70)	46.57 (1.66)
45	41.61 (3.32)	46.43 (1.82)	42.79 (1.47)	41.78 (3.09)
NP: Nanopartículas. El tiempo se expresa en días. Los valores se encuentran expresados en porcentajes (%) con su desviación estándar. n=3				

4.2.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación (DEE%) y evaluación *In vitro* de las propiedades adhesivas

Se alcanzó una eficiencia de encapsulación para todos los sistemas. Los porcentajes que presentaron los sistemas fueron del 26.88 % ± 1.51 % para el sistema NP-doxiciclina, 16.09 % ± 10.24 % para NP-vancomicina y de un 17.57 % ± 11.08 % para NP-doxepina.

De acuerdo con los resultados de adhesión mostrados en la tabla 4.3, las nanopartículas libres de fármaco presentaron las propiedades adhesivas de mayor valor. Así mismo, se puede observar cómo los sistemas NP-doxepina y NP-vancomicina presentaron una disminución de las propiedades adhesivas después de 4 horas. No obstante, el sistema NP-doxiciclina exhibió un incremento en sus propiedades adhesivas después de 4 horas.

Por último, destacar que los sistemas presentaron una reducción en su carga superficial cuando fueron expuestos a la mucina. Los sistemas libres de fármaco, así como los sistemas cargados con fármaco presentaron una carga superficial negativa demostrando la interacción chitosan/mucina (tabla 4.4).

Tabla 4.3 Propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas.

Tiempo	NP	NP-doxepina	NP-vancomicina	NP-doxiciclina
60	36.19 (1.47)	33.91 (0.28)	34.64 (9.87)	32.45 (1.40)
120	36.99 (3.87)	32.23 (1.37)	33.44 (9.71)	32.42 (1.09)
180	34.38 (2.91)	29.63 (1.16)	29.26 (11.27)	31.79 (0.30)
240	35.69 (2.05)	27.98 (6.38)	32.08 (3.63)	33.51 (0.05)
NP: Nanopartículas. El tiempo se expresa en minutos. Todas las mediciones se expresan en porcentaje (%) con sus desviaciones estándar. n=3				

Tabla 4.4 Propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas. Carga superficial.

Grupos	Potencial-ζ (mV)
NP	-15 (0.77)
NP-doxepina	-15.75 (0.79)
NP-vancomicina	-18 (0.70)
NP-doxiciclina	-15.56 (1.05)
NP: Nanopartículas. La carga superficial está expresada en milivoltios (mV). Todas las mediciones se expresan en porcentaje (%) con sus desviaciones estándar. n=3	

4.2.3 Topografía y humectabilidad de la superficie

Los valores de rugosidad y ángulo de contacto se muestran en la tabla 4.5. El parámetro Ra fue similar para las tres superficies. Los recubrimientos de PVA y PVANP obtuvieron valores de Rq similares, pero superiores a los del Ti. El valor Rsk fue casi 0 para Ti, pero significativamente negativo para PVA y PVANP. Rku fue cercano a 3 para el Ti y muy platikurtoico para los recubrimientos de PVA y PVANP. El valor Rp fue similar para las tres superficies. Sin embargo, Rv y Rmax fueron similares para las muestras PVA y PVANP, pero superiores a los valores obtenidos en la superficie de Ti. Las muestras Ti, PVA y PVANP mostraron una humectabilidad similar. La figura 4.2 muestra el perfil topográfico 3D de las superficies estudiadas.

Tabla 4.5 Parámetros de rugosidad y ángulo de contacto.

Grupos	R_p (µm)	R_v (µm)	R_a (nm)	R_q (nm)	Rmax (µm)	Rsk	Rku	Angulo de contacto
Ti	1.11 (0.28)	-1.06 (0.59)*	0.20 (0.05)	0.25 (0.05)*	2.17 (0.50)*	-0.19 (0.08)*	3.08 (0.94)*	54 (4)
PVA	1.31 (0.69)	-9.51 (4.22)	0.20 (0.05)	0.43 (0.13)	10.81 (3.77)	-15.51 (8.03)	304.23 (239.51)	54 (2)
PVANP	1.52 (0.58)	-9.20 (2.81)	0.22 (0.02)	0.39 (0.13)	11.79 (2.44)	-13.58 (4.96)	313.58 (170.5)	52 (2)

Ti: Titanio. PVA: Recubrimiento de alcohol polivinilo. PVANP: Recubrimiento de alcohol polivinilo cargado con nanopartículas. Parámetros analizados: Altura máxima de los picos (R_p). Profundidad máxima de valles (R_v). Altura máxima aritmética (R_a). Rugosidad cuadrática media (R_q). Altura máxima de perfil (R_{max}). Asimetría (Rsk). Curtosis (Rku). n=6. Los valores en cada fila con marca (*), fueron estadísticamente diferentes. ($p<0.05$).

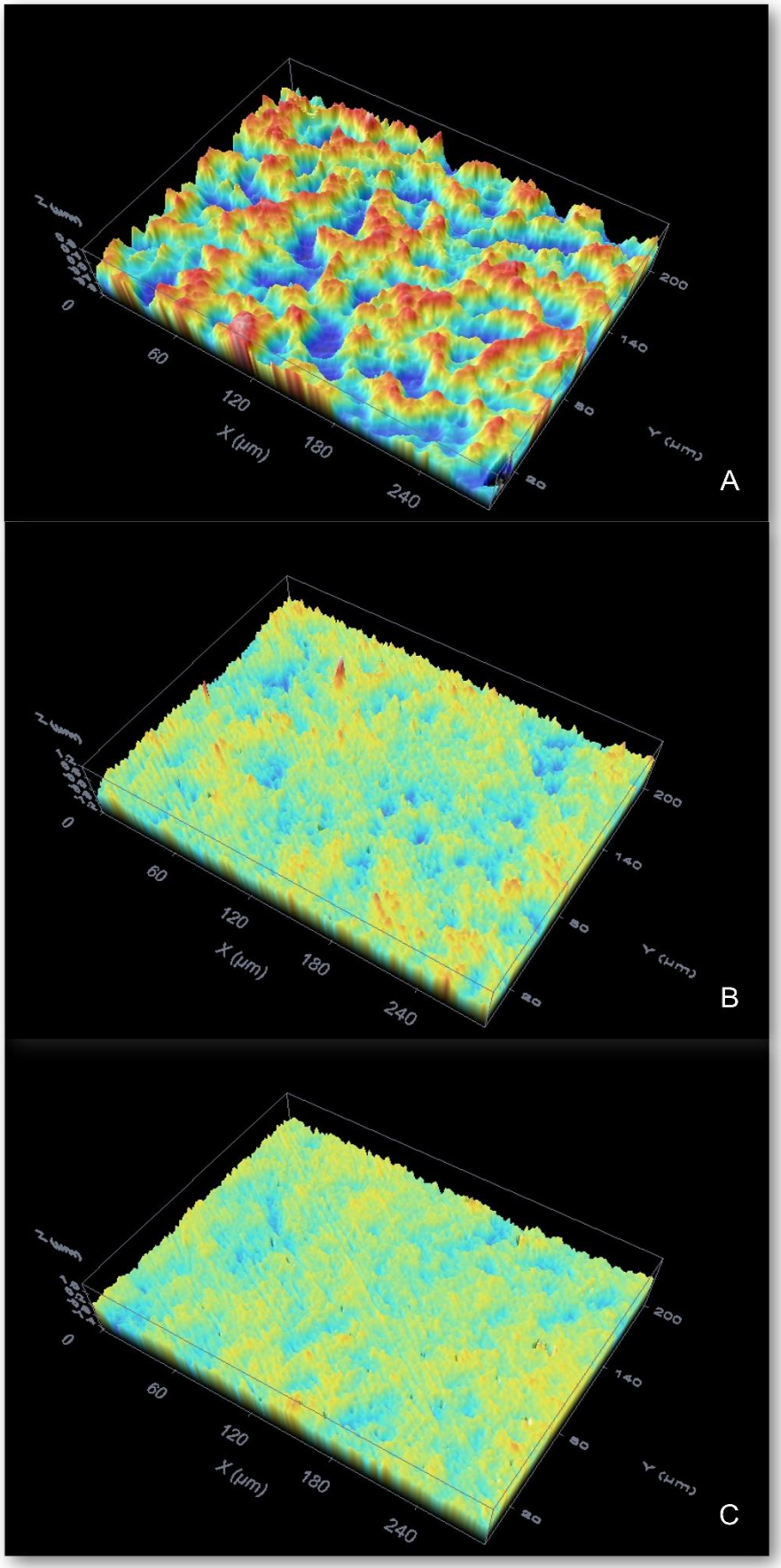

Figura 4.2. Imágenes topográficas de las superficies de titanio analizadas. A) Ti: Titanio. B) PVA: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo. C) PVANP: Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo cargadas con nanopartículas de chitosan.

4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

De acuerdo con la figura 4.3. En la figura 4.3A se puede apreciar una nanopartícula aislada con una forma esférica bien definida sin presencia de aglomeración de nanopartículas. En la figura 4.3B se puede apreciar la uniformidad del recubrimiento a base de alcohol polivinilo mientras que en la figura 4.3C se puede observar el sistema mixto, el recubrimiento de PVA vehiculizado con NP de chitosan. De acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica de barrido se puede apreciar que las nanopartículas presentan una forma esférica menos definida cuando están integradas en la matriz de PVA. Esto podría deberse a que la matriz de PVA se adhiere a las NP brindándole una morfología menos definida. La ruptura de la matriz de PVA podría deberse al tratamiento recibido antes de ser analizado mediante microscopia electrónica de barrido.

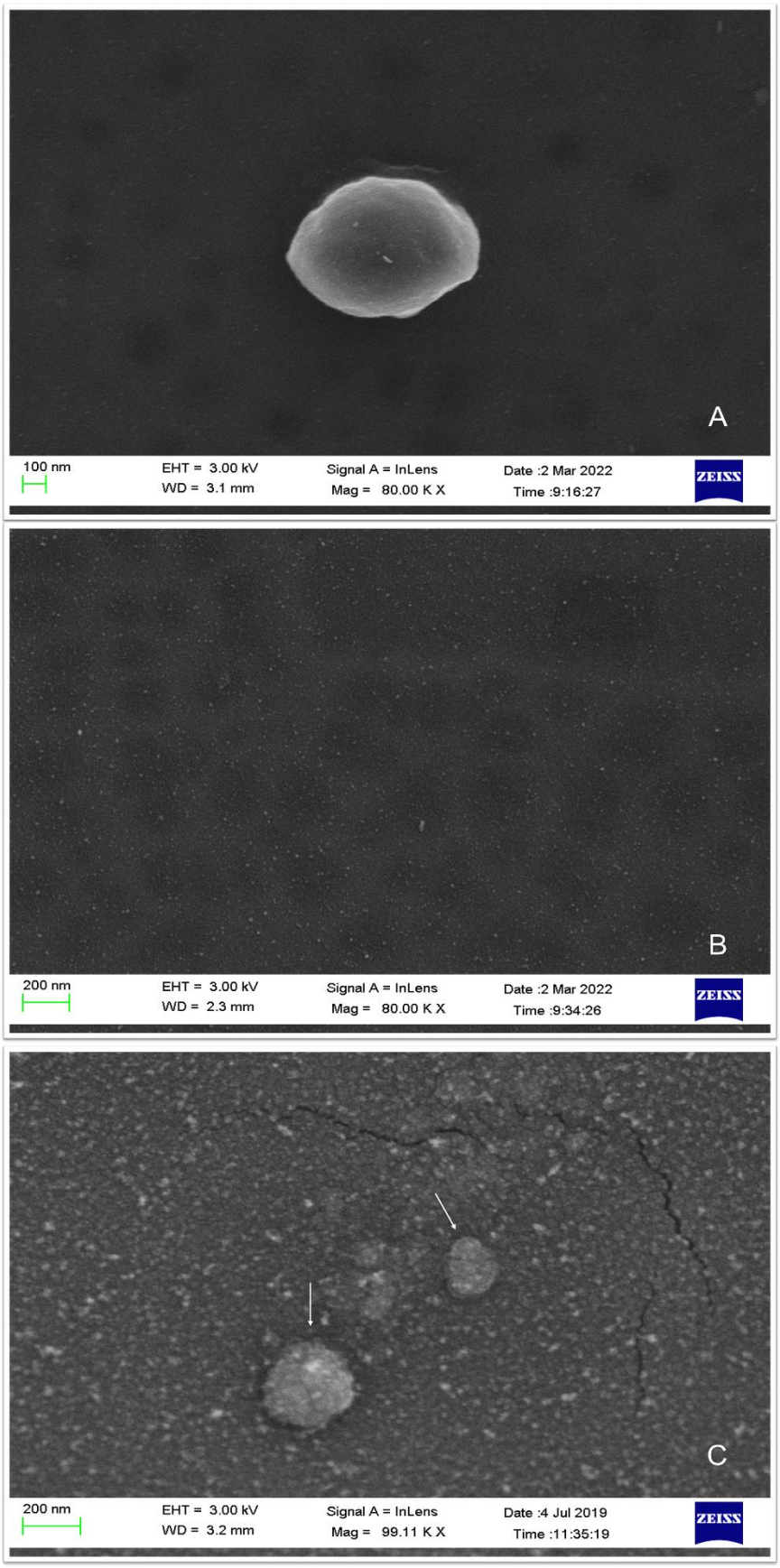

Figura 4.3. Imágenes SEM de los sistemas liberadores de fármaco. A) Nanopartícula. B) Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo. C) Titanio con recubrimiento de alcohol polivinilo cargado con nanopartículas de chitosan.

4.2.5 Evaluación del perfil de liberación. Ensayo *In vitro*

De acuerdo con los resultados mostrados en las figuras 4.4, 4.5 y 4.6, los sistemas PVA y PVANP presentaron dos fases de liberación de fármaco. Una primera fase de liberación rápida que ocurrió durante los primeros 60 y 90 min, respectivamente.

En la figura 4.4 se puede apreciar claramente en la gráfica de liberación las dos fases de liberación de los sistemas. Donde más del 60 % del fármaco fue liberado desde las superficies recubiertas con PVA a los 60 min. Trascurrido este tiempo se puede observar un cambio en el comportamiento del perfil de liberación del sistema, dando inicio en este punto con un perfil de liberación lento, gradual y sostenido. El recubrimiento de PVA cargado con doxiciclina presentó el perfil de liberación más lento seguido del grupo PVA-vancomicina, alcanzando sus picos máximos de liberación a 300 y 120 minutos, respectivamente. El recubrimiento de PVA-doxepina liberó más del 90% de fármaco durante los primeros 60 min. Sin embargo, fue posible detectar el fármaco remanente a un tiempo de 300 min.

Por otro lado, se analizó el perfil de liberación de las nanopartículas de chitosan para poder entender el comportamiento de las NP una vez que fueron integradas a la matriz de PVA (figura 4.5). La fase rápida de liberación se observó a los 60 minuntos para todos los grupos. En este punto, el grupo NP-doxiciclina presentó un porcentaje de liberación menor del 55%, seguido del grupo NP-vancomicina con un porcentaje de liberación mayor del 55% y, por último, el grupo NP-doxepina que presentó un porcentaje mayor del 60%. A partir de este punto, dio comienzo la fase de liberación lenta. El grupo NP-doxepina presentó su pico máximo de liberación a los 300 min, seguido de los grupos NP-doxiciclina y NP-vancomicina los cuales presentaron su pico máximo a los 240 min.

En general, los sistemas mostraron un retraso en sus perfiles de liberación cuando las NP se incorporaron a la matriz de PVA (figura 4.6). El porcentaje de doxepina liberado desde el recubrimiento PVANP a los 60 minutos fue < 20%, retrasando la concentración de fármaco liberado en un 43.22 %. Siendo el grupo PVANP-doxepina el recubrimiento que con diferencia presentó el mayor retraso.

Las NP cargadas con antibióticos también presentaron un retraso en su perfil de liberación. El porcentaje de liberación a los 60 minutos de vancomicina y doxiciclina desde los recubrimientos PVANP fue < 50%. Pudiéndose apreciar un retraso del 14.69 % y 6.06% en la liberación del fármaco en comparación con el perfil de liberación de los grupos NP-vancomicina y NP-doxiciclina, respectivamente.

Siguiendo con la fase rápida de liberación, los recubrimientos PVANP-doxiciclina y PVANP-doxepina presentaron un retraso de 60 minutos en sus perfiles de liberación. Alcanzando sus picos máximos de liberación a los 300 y 360 minutos, respectivamente. La liberación de vancomicina se retrasó 120 minutos cuando fue incorporada al recubrimiento PVANP. El sistema mostró su pico máximo de liberación a los 360 minutos. Una vez que los sistemas alcanzaron la dosis máxima de liberación, no se detectó fármaco en el medio.

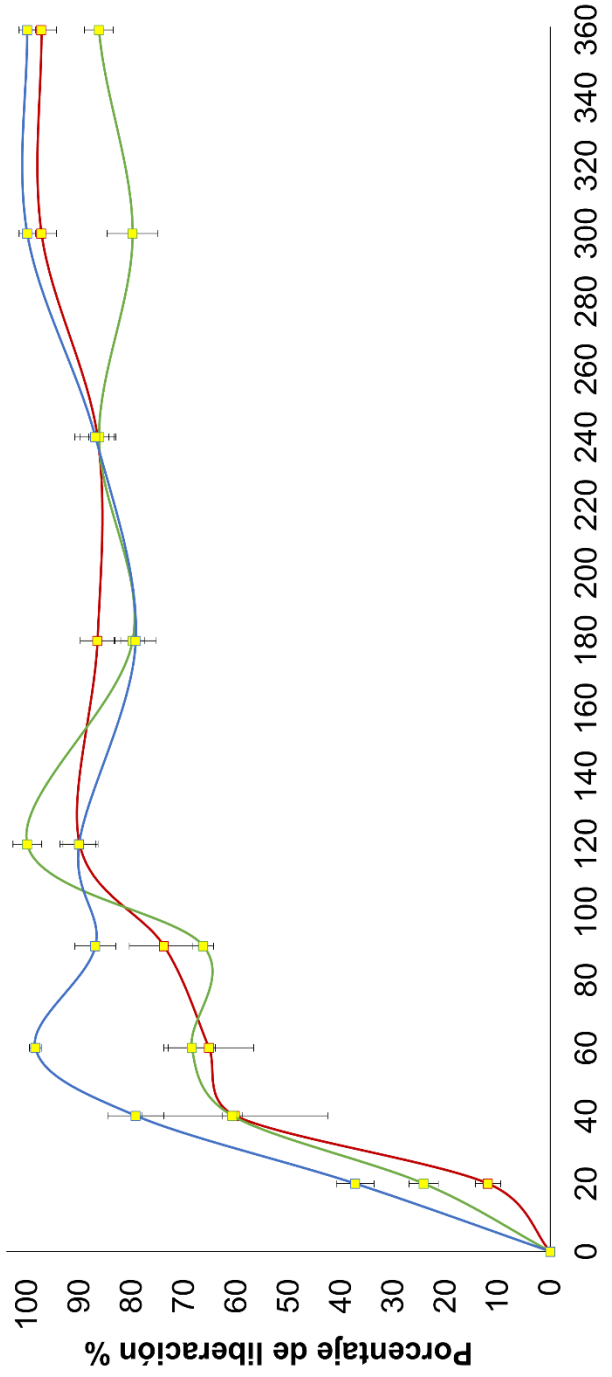

Figura 4.4. Ensayo *In vitro* del perfil de liberación de los sistemas liberadores de fármaco. Perfil de liberación desde las muestras recubiertas con la película de alcohol polivinilo. PVA: Alcohol polivinilo. El tiempo esta expresado en minutos.

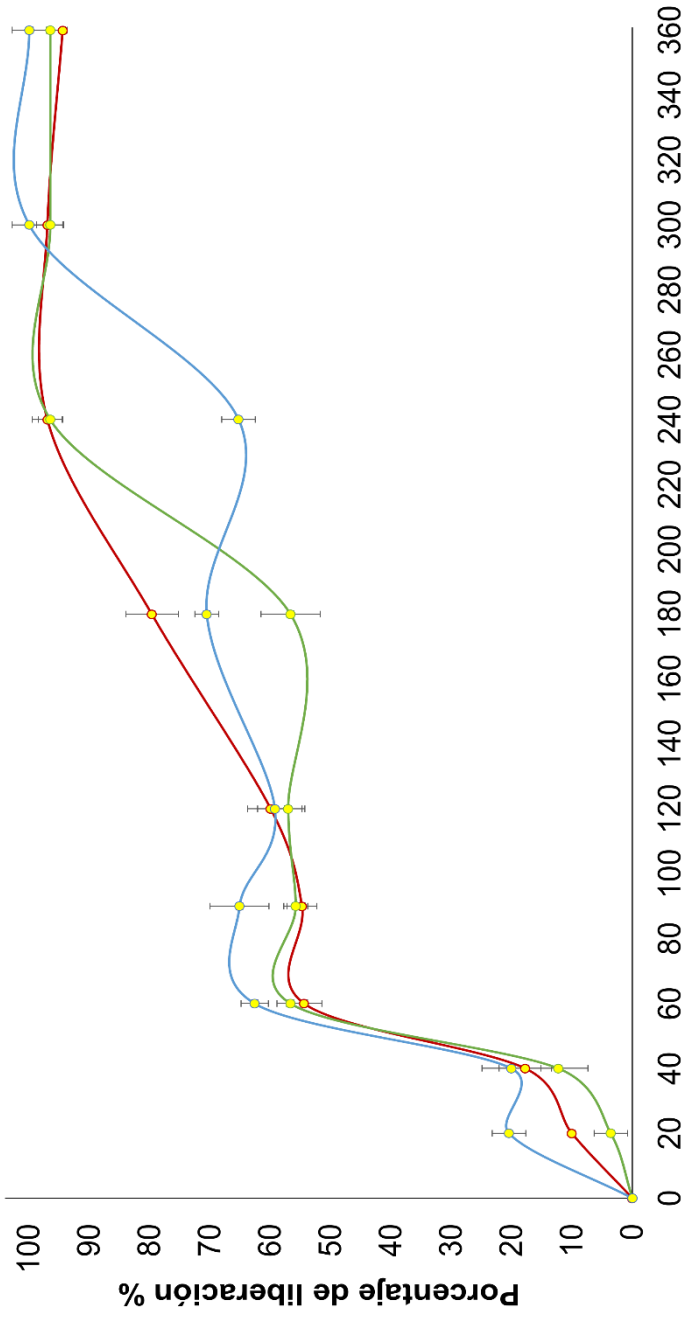

Figura 4.5. Ensayo *In vitro* del perfil de liberación de los sistemas liberadores de fármaco. Perfil de liberación desde las nanopartículas de chitosan. NP: Nanopartículas de chitosan. El tiempo esta expresado en minutos.

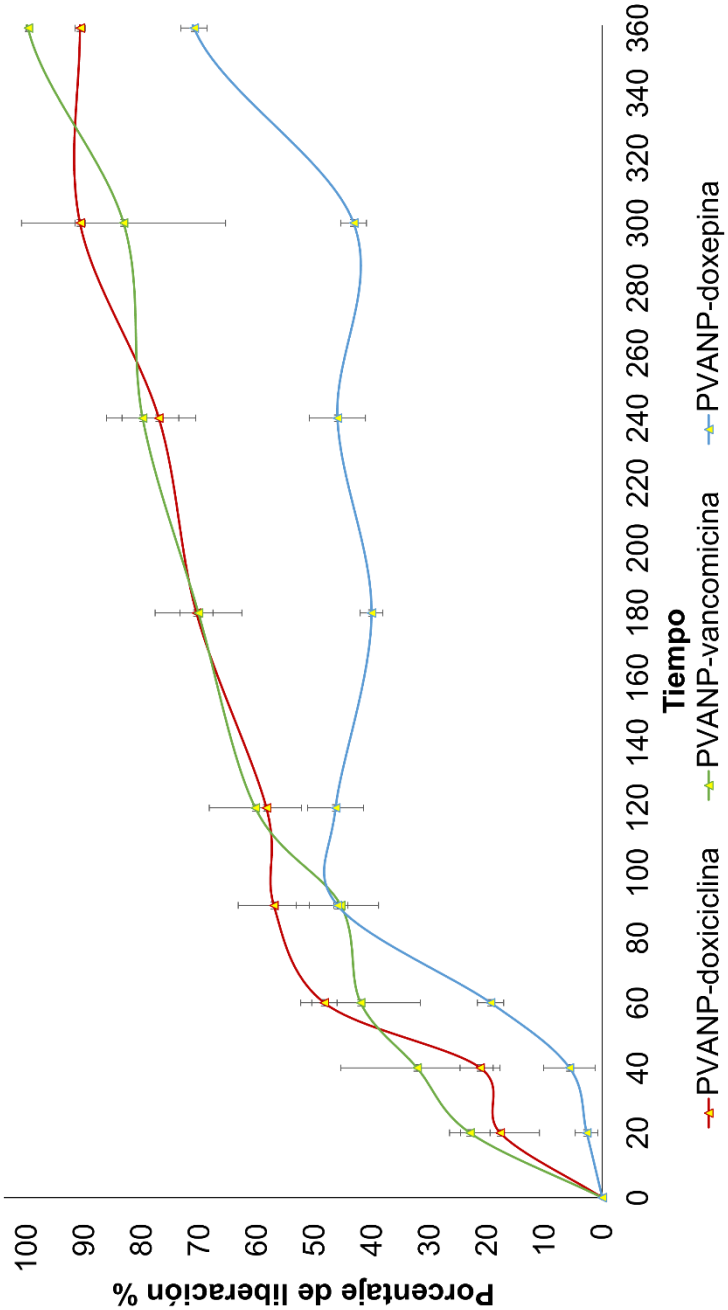

Figura 4.6. Ensayo *In vitro* del perfil de liberación de los sistemas liberadores de fármaco. Perfil de liberación desde las muestras recubiertas con la película de alcohol polivinilo cargadas con nanopartículas de chitosan. PVA: Alcohol polivinilo. NP: Nanopartículas de chitosan. El tiempo está expresado en minutos.

4.2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La tabla 4.6 muestra los resultados de Log10 (UFC). Los grupos que presentaron los valores bacterianos más altos a las 4 y 24 h fueron el grupo Ti, PVA y PVANP. Los grupos no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p>0.05$). Sin embargo, como era de esperar cuando los sistemas PVA y PVANP fueron cargados con vancomicina y doxiciclina. Después de 4 horas, las superficies de titanio que fueron recubiertos con los sistemas PVA y PVANP cargados con vancomicina y doxiciclina exhibieron una menor cantidad de bacterias viables en la superficie. Siendo el recubrimiento PVANP-doxiciclina el sistema que obtuvo el recuento más bajo de UFC ($p<0.05$). Los recubrimientos de PVA-doxepina y PVANP-doxepina obtuvieron resultados intermedios que no presentaron diferencia estadísticamente significativos a los grupos sin cargar ($p>0.05$). En general, después de 24 horas la actividad antimicrobiana de los sistemas fue reducida, todos los grupos presentaron un incremento significativo en el recuento de UFC respecto a las 4 horas. Solamente la superficie de titanio recubierta con PVA-doxiciclina mantuvo su efecto antibiótico y exhibió un recuento de UFC significativamente menor ($p<0.05$).

Para el ensayo de ATP se puede apreciar un comportamiento similar de los recubrimientos a las 4 horas (tabla 4.7). La superficie de titanio mecanizada mostró la menor actividad antimicrobiana seguido de los recubrimientos PVA y PVANP sin cargar. Cuando los sistemas PVA y PVANP fueron cargados con doxepina mostraron un resultado comparable sin diferencia estadísticamente significativa con los grupos PVA y PVANP sin cargar. Nuevamente, el mayor efecto antimicrobiano se produjo cuando los recubrimientos fueron cargados con antibióticos. La mayor actividad antimicrobiana se observó en el grupo PVANP-doxiciclina, seguido de los grupos PVA-vancomicina, PVANP-vancomicina y PVA-doxiciclina ($p<0.05$). Como se apreció en la prueba de conteo UFC y de igual forma, después de 24 horas los grupos dieron un alto valor de RLUs, indicando la pérdida del efecto antimicrobiano de los sistemas. Únicamente el recubrimiento PVA-doxiciclina fue el grupo que mantuvo su efecto antimicrobiano, teniendo coherencia con los valores obtenidos en el conteo de UFC.

Los resultados del biovolumen de células vidas se muestran en la tabla 4.8. El análisis mediante CLSM demostró que la superficie de titanio mecanizado presentó el mayor biovolumen de células con membrana intactas seguido del recubrimiento PVANP y PVA después de 4 horas. ($p<0.05$). Se pudo observar una reducción significativa en los biovolumenes cuando los recubrimientos fueron cargados, mostrando una actividad similar sin diferencia entre ellos.

Después de 24 horas, la superficie de titanio, así como el sistema PVA sin cargar obtuvieron un número significativamente de bacterias con membrana intacta. El grupo PVANP-vancomicina, presentó la mayor actividad antimicrobiana, seguido del resto de grupos ($p>0.05$). La caracterización de la biopelícula mediante SEM se muestra en la figura 4.7 mientras que la figura 4.8 muestra ilustraciones representativas de CLSM.

Tabla 4.6 Resultados del Log_{10} de las unidades formadoras de colonias se obtuvieron con cada uno de los grupos de estudio después de 4 y 24 horas.

Superficies		Log_{10} UFC		
		4 horas	24 horas	*Valor P***
		Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Ti		6,38 (1,35) [a]	7,32 (0,52) [a]	0,004
PVA	Sin cargar	5,58 (0,68) [a]	7,57 (0,48) [a]	<0,001
	Doxepina	5,34 (1,17) [a,b]	7,70 (0,55) [c]	<0,001
	Vancomicina	4,59 (1,15) [c]	6,84 (0,66) [b]	<0,001
	Doxiciclina	4,63 (2,17) [c]	3,71 (0,73) [c]	0,063
PVANP	Sin cargar	5,53 (1,44) [a,b]	7,30 (0,70) [a]	<0,001
	Doxepina	5,40 (2,20) [a,b]	7,45 (0,73) [a]	<0,001
	Vancomicina	4,70 (1,40) [c]	6,92 (0,16) [a]	<0,001
	Doxiciclina	3,90 (1,23) [d]	6,92 (0,66) [a]	<0,001
Valor P *		<0.001	<0.001	

Ti: Titanio. PVA: Película de alcohol polivinilo, PVANP: Película de alcohol polivinilo cargada con nanopartículas de chitosan, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, RI: Rango intercuartil.

* Comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Dentro de cada columna, la misma letra minúscula en superíndice muestra diferencias no estadísticas mediante la prueba de Mann-Whitney.

** Comparaciones 4 frente a 24 h mediante la prueba de Mann-Whitney.

Tabla 4.7 Resultados de las unidades luminosas relativas obtenidas con la prueba ATP con cada uno de los grupos de estudio después de 4 y 24 horas.

Superficies		Unidades de luz relativa		
		4 horas	24 horas	Valor P**
		Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Ti		12.799 (32.760,75) [a]	34.724,5 (58.926,38) [a]	0.043
PVA	Sin cargar	6.176 (5.609,25) [a,b]	90.903 (80.839,63) [a]	<0.001
	Doxepina	3.344,5 (7.376,5) [b,c]	80.999,5 (155.193,5) [a]	<0.001
	Vancomicina	2.218 (2.644,25) [c]	161.189,25 (306.817,75) [a]	<0.001
	Doxiciclina	4.811 (6.238,25) [c]	1.611,75 (2.615,75) [b]	0.105
PVANP	Sin cargar	5.615,5 (11.551,75) [b]	40.880,25 (57.704) [a]	<0.001
	Doxepina	5.603,5 (23.833,75) [b,c]	103.059,25 (88.132,5) [a]	<0.001
	Vancomicina	2.281,5 (4.460,5) [c,d]	99.911,75 (142.675,5) [a]	<0.001
	Doxiciclina	1.624 (1.727,75) [d]	68.366,75 (81.431,67) [a]	<0.001
Valor P *		0.002	<0.001	<0.001

PVA: Película de alcohol polivinilo, PVANP: Película de alcohol polivinilo cargada con nanopartículas de chitosan, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, RI: Rango intercuartil.

* Comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Dentro de cada columna, la misma letra minúscula en superíndice muestra diferencias no estadísticas mediante la prueba de Mann-Whitney.

** Comparaciones 4 frente a 24 h mediante la prueba de Mann-Whitney.

Tabla 4.8 Resultados del biovolumen de células vivas de los grupos de estudio tras 4 y 24 horas.

Superficies		Biovolumen µm 3		
		4 horas	24 horas	Valor P**
		Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Ti		10128,29 (15979,7) [a]	67381,55 (60214,83) [a]	<0.001
PVA	Sin cargar	1662,16 (1349,16) [b]	65774,48 (17649,42) [a]	<0.001
	Doxepina	830,70 (515,74) [c]	29233,88 (33742,76) [b]	<0.001
	Vancomicina	1157,27 (940,36) [c]	7491,41 (14895,39) [c]	<0.001
	Doxiciclina	471,70 (439,62) [c]	857,27 (1288,31) [c]	0.482
PVANP	Sin cargar	5881,95 (16260) [b,c]	11951,48 (24103,06) [d]	0.031
	Doxepina	573,91 (2254,85) [c]	11995,88 (7089,68) [d]	<0.001
	Vancomicina	1091,94 (1225,51) [c]	73,55 (23,61) [e]	<0.001
	Doxiciclina	721,8720 (1525,97) [c]	3177,40 (14192,85) [c]	0.002
Valor P*		<0.001	<0.001	

Ti: Titanio. PVA: Película de alcohol polivinilo, PVANP: Película de alcohol polivinilo cargada con nanopartículas de chitosan, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, RI: Rango intercuartil.

* Comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Dentro de cada columna, la misma letra minúscula en superíndice muestra diferencias no estadísticas mediante la prueba de Mann-Whitney.

** Comparaciones 4 frente a 24 h mediante la prueba de Mann-Whitney.

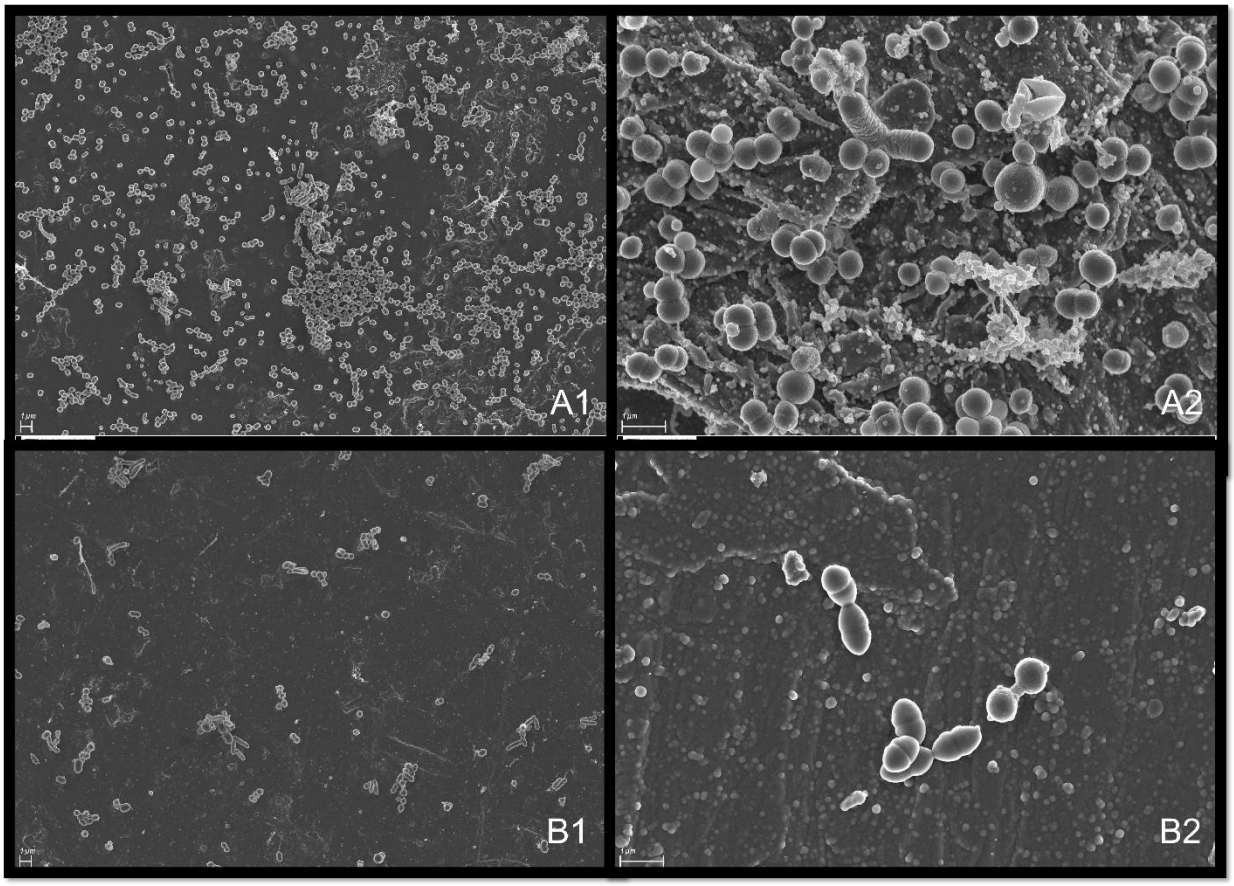

Figura 4.7. Imágenes representativas de microscopia electrónica de barrido (SEM) de dos superficies con diferente inhibición bacteriana. A: Alta inhibición. B: Baja inhibición.1) Magnificación original × 5,000. 2) Magnificación original × 20,000.

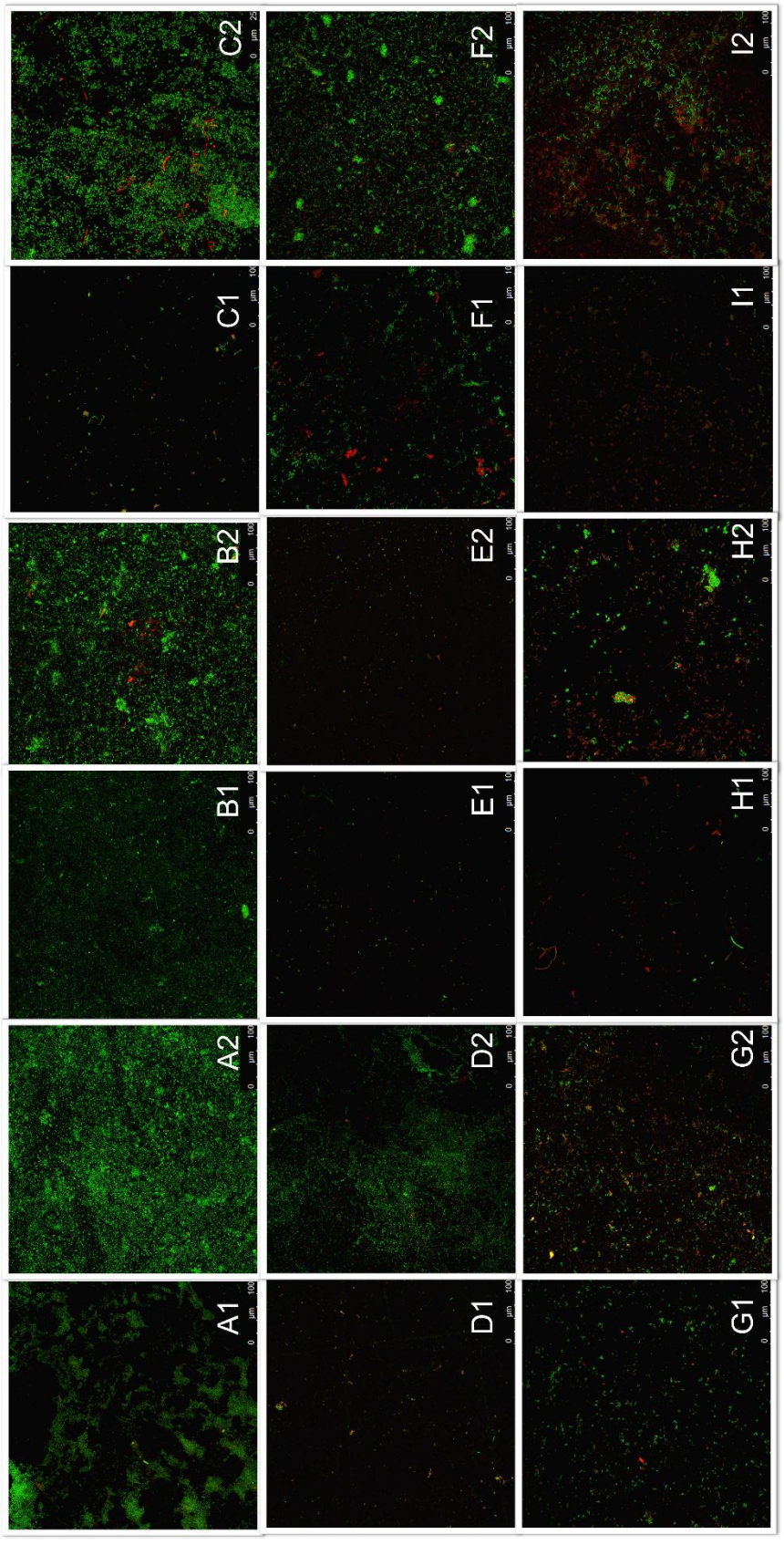

Figura 4.8. Imágenes representativas de microscopía confocal de barrido láser de biopelículas naturales multiespecíficas cultivadas en la superficie de los diferentes grupos de estudio. A) Ti. B) PVA. C) PVA-doxepina. D) PVA-vancomicina. E) PVA-doxiciclina. F) PVANP. G) PVANP-doxepina. H) PVANP-vancomicina. I) PVANP-doxiciclina. 1) 4 horas. 2) 24 horas. Las bacterias en verde son células con membranas intactas y las que aparecen en rojo son células con membranas dañadas tras la tinción Live/Dead (BacLight; Invitrogen, Eugene, OR, USA).

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

En este trabajo de investigación, se han realizado dos estudios experimentales encaminados a la carga de la superficie con fármacos capaces de provocar un efecto biológico. En el primer experimento, se intentó cargar las superficies siguiendo estrategias modificadoras de la superficie, pero sin medio de transporte. El resultado fue negativo, ni la oxidación, con la incorporación de cargas iónicas (grupos OH-), ni la creación de titanato de sodio con el aumento de las irregularidades de la superficie con precipitados de HA, lograron retener los distintos fármacos utilizados. Lo único que sí logro un efecto positivo liberador de fármaco fue recubrir la superficie con vehículos de transporte, como la lámina de PVA. Con estos resultados se planteó el segundo experimento donde se utilizaron matrices poliméricas como vehículos de transporte de fármacos (hidrogel y nanopartículas) y se evaluó la topografía, humectabilidad, carga, liberación, así como su efecto antimicrobiano.

5.1 Topografía y adsorción a la superficie

Las estrategias empleadas para analizar la adsorción de fármaco al titanio consistieron en la modificación de la topografía, humectación e hidrofilia de la superficie. El titanio comercialmente puro fue sometido a un tratamiento de oxidación mediante inmersión en una solución de NaOH. Tras la inmersión la superficie de titanio presenta una película compuesta principalmente por titanato sódico y tantanato sódico junto con óxidos de titanio y tantalio.(26) Esta nueva superficie no modifica la rugosidad, pero sí proporciona una mayor humectabilidad mejorando así la adsorción de agua y proteínas al sustrato.(131,144–146) Sin embargo, aunque en nuestro estudio fue posible conseguir un aumento de la humectabilidad, no fue suficiente para adsorber una cantidad significativa de fármaco. Los tres fármacos (paracetamol, ibuprofeno y doxepina) fueron detectados en la superficie de Ti pulida, y tras el tratamiento químico de oxidación, este no fue suficiente para mejorar la adsorción del fármaco. Solamente fue posible detectar un porcentaje de paracetamol, aunque en poca cantidad.

Esto podría explicarse debido a que algunos grupos funcionales superficiales afectan a las interacciones entre las capas de TiO y las moléculas de fármaco. Para resolver estos inconvenientes se ha reportado que es posible acoplar el fármaco a la superficie de metal mediante un enlace sulfhídrico unido a

recubrimientos derivados de polidimetilsilaxano (PDMS) como (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES), (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) y (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (MPTMS) en una superficie con capas nanoporosas de óxido de titanio anódico (ATO) puede aumentar considerablemente el control de la administración del fármaco. Estos recubrimientos forman una monocapa autoensamblada en la superficie, que porta una amina primaria, la cual puede ser utilizada para vehiculizar fármacos como, doxiciclina, vancomicina, tetraciclina e iburprofeno.(29,45,58,144)

Otra estrategia utilizada para aumentar la capacidad de adsorción de la superficie fue aumentar la rugosidad. Para ello, se recubrió la superficie de titanio oxidada con cristales de hidroxiapatita, haciendo que la superficie también fuera químicamente diferente pero parecida al hueso.(147) Este cambio de la superficie es posible mediante un proceso de inmersión de la muestra en una solución de fluido corporal simulado, la cual interactúa con la ionización de la superficie creando cristales de hidroxiapatita en esta.(34,35) En este trabajo de investigación, fue posible depositar cristales de hidroxiapatita en la superficie de titanio anodizada y quedó demostrado que, el recubrimiento de la superficie con depósitos de HA aumentan la rugosidad y la humectabilidad del Ti no tratado, como ya habían constatado otros investigadores.(37,131)

Aunque el recubrimiento de hidroxiapatita presentado en este trabajo presentó cambios fisicoquímicos, estos no fueron suficientes para facilitar la adsorción del fármaco y, por ende, su posterior liberación. No obstante, algunos investigadores han reportado la adsorción y liberación de fármacos desde un recubrimiento de HA. Sin embargo, estás superficies eran porosas y permitían la entrada de fármaco que se depositaba en su interior mediante inmersión. Además, el recubrimiento de la superficie con HA, así como la carga del recubrimiento con fármaco era posible mediante deposición electroquímica, un método de coprecipitación en la que el fármaco es mezclado con el SBF o, en algunos casos, con una solución sol-gel que fue depositada mediante un recubrimiento por centrifugado *“spin-coating”*.(67,147–152)

Es bien sabido que, la velocidad y la calidad de la osteointegración en los implantes de titanio están relacionadas con las propiedades de su superficie

como son la composición de la superficie, la hidrofilia o la rugosidad debido a que son parámetros que pueden desempeñar un papel en la interacción y la osteointegración implante-tejido.(5) Sin embargo, la superficie de titanio es propensa a procesos de adhesión microbiana constantes, siendo la formación de la biopelícula el principal factor etiológico en inducir infecciones relacionada con los implantes dentales, aumentando el riesgo de fracaso del implante.(9) Se ha descrito en la literatura que las superficies antiincrustantes tienen un efecto antibacteriano reducido debido a que presentan un impacto negativo para la adsorción inicial de proteínas y, lo que es más importante, para los procesos de adhesión de las células huésped.(9)

Así pues, el alisado de la superficie puede reducir la formación de biopelículas. Por lo que, debido a las limitaciones que presentaron los tratamientos superficiales para la adsorción de fármacos fue necesario la búsqueda de otro enfoque para la entrega dirigida de fármaco. En este sentido, se evaluaron matrices poliméricas capaces de vehiculizar los principios activos. Por lo que, se midió la topografía y la humectabilidad de los recubrimientos PVA y PVANP para analizar si estos parámetros eran determinantes de la actividad bacteriana. Se ha observado que un valor de rugosidad R_a próximo a 0.2 µm es el umbral para la reducción máxima de la adhesión bacteriana en la superficie de titanio.(153)

Tanto en el primer como en el segundo ensayo presentado en este trabajo de investigación, la rugosidad de la superficie se vio reducida cuando el titanio fue recubierto con la película de PVA y PVANP. El valor R_a de la superficie de titanio pulida metalográficamente, así como los recubrimientos de PVA y PVANP se encontraron cerca de este valor crítico (para ambos ensayos). Aunque existen algunos parámetros con diferencias entre estos grupos, el efecto de la topografía se minimizó. En cuanto a la humectación, el efecto no fue significativo para la formación de biopelículas, ya que la actividad bacteriana fue similar en las superficies de titanio pulida y recubierta con la película de PVA libre de fármaco. Los valores del ángulo de contacto no se vieron alterados cuando los sistemas fueron cargados con fármaco. Por lo tanto, el efecto de la superficie sobre la actividad bacteriana se centra únicamente en el efecto del fármaco y las NP, y no en las características topográficas o de humectación de las superficies con y sin recubrimiento con la lámina de PVA.

5.2 Nanopartículas: Tamaño, carga, DEE%, estabilidad y adhesión

De acuerdo con la literatura, se ha descrito que tanto el tamaño como la distribución de las nanopartículas son factores importantes para la estabilidad y la capacidad de encapsulación del sistema; debido a que un desajuste en estos valores podría condicionar el perfil de liberación del fármaco.(92) Dichos parámetros pueden verse condicionados por un cambio en la proporción del polímero con el agente reticulante (Cs:TTP), por el grado de acetilación del polímero, por el peso molecular del chitosan, modificando el pH y/o la proporción del ácido acético durante la síntesis.(49,84,85,139)

La alteración de alguno de estos parámetros puede resultar en la modificación del diámetro hidrodinámico, la carga superficial del sistema, la morfología y la estructura interna de las nanopartículas, afectando así su eficiencia de encapsulación y la habilidad de penetrar o no el tejido diana.(49,84,92,99) En consecuencia, el destino biológico, la eficacia, la toxicidad y la distribución *In vivo* de los sistemas de administración se ven afectados.(92) Por lo tanto, es crucial optimizar estos parámetros para lograr un rendimiento óptimo de los sistemas de administración basados en nanopartículas.

De acuerdo con algunos investigadores, se ha reportado que el aumento en la proporción Cs:TTP da como resultado un incremento en el diámetro hidrodinámico de las NP (508.1 nm), alterando al mismo tiempo su carga superficial (57.3 mV).(84) Esto fue confirmado por Pawar et al 2018 al evaluar diferentes proporciones de Cs:TPP. En el estudio se reportó que una concentración de Cs:TTP de 0.1%:0.5% daba como resultado un tamaño de partícula de 276,4 ± 16,48 nm y una carga superficial de 37,13 ± 3,18 mV mientras que, aumentando la concentración de Cs con relación al TTP, esto es de 0.2%:0.5%, el tamaño y la carga superficial de las NP se veían alterados. Obteniendo un diámetro hidrodinámico de 389 ± 13,15 nm y una carga superficial de 63,42 ± 3,21 mV.(49)

De la misma forma, Quan Gan et al 2005 confirmó que el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas aumentaba cuando la relación Cs: TTP era mayor. Sin embargo, en el mismo estudio se reportó que una concentración mayor de chitosan provocaba un aumento en el tamaño del sistema, pero una

disminución en su carga superficial.(85) Estos resultados ponen en perspectiva la importancia del tamaño y el potencial-ζ de las nanopartículas en cuanto a su comportamiento biológico, así como el impacto significativo que tiene la relación Cs:TTP en las propiedades de las mismas.

Estos parámetros son importantes al momento de diseñar el sistema, ya que, al determinar un tamaño y carga superficial deseado se verá condicionada la forma de distribución, el sitio de acción, así como la permeabilidad del sistema en el tejido diana.(81,84,85) Esto reafirma uno de los propósitos en este trabajo de investigación, al buscar una entrega focalizada sin la permeabilidad del sistema en el lugar de acción. Por lo que, aunque el grupo NP-doxiciclina presentó un tamaño significativamente mayor en comparación con el resto de los grupos. El tamaño de las NP fue considerado adecuado en todos los casos, ya que uno de los objetivos de este trabajo fue conseguir una liberación controlada y un efecto focalizado en la zona diana.

Otra propiedad para tener en cuenta en la síntesis de nanopartículas es la estabilidad del sistema. Es necesario un sistema que sea estable y garantice las propiedades de las nanopartículas. Diferentes autores han reportado que para mantener una continuidad de las propiedades del sistema es importante conseguir un carga superficial > 30 mV, debido a que por encima de este valor el sistema presenta mayor estabilidad y una menor tendencia a la agregación de las NP.(84,92,129) La prueba de estabilidad confirmó que las NP diseñadas en este trabajo fueron un sistema estable a lo largo del tiempo, manteniendo una carga superficial mayor a 30 mV durante un periodo de 45 días, lo que supone la estabilidad de las NP en todos los casos.

De la misma forma que el diámetro hidrodinámico y la carga superficial influyen en el rendimiento del sistema, el porcentaje de encapsulación condiciona el desempeño de liberación y el efecto terapéutico del sistema. Por consiguiente, un alto porcentaje de encapsulación es esencial para optimizar el perfil de liberación y la eficacia terapéutica del sistema.(81) La eficacia de encapsulación se ve condicionada por el diámetro hidrodinámico del sistema, así como el tipo de nanopartícula diseñada (nanocapsulas o nanoesferas). Y se puede afirmar que las nanopartículas con un mayor diámetro hidrodinámico tienen la capacidad

de conseguir una mayor eficiencia de encapsulación ya que NP de mayor tamaño presentan un núcleo mayor capaz de encapsular mayor cantidad de fármaco.(49,92)

Pawar et al 2018 reportaron que la eficacia de encapsulación de vancomicina se veía condicionada por el tamaño de partícula, la proporción Cs:TPP, así como, la concentración Cs:fármaco, logrando obtener diferentes porcentajes de encapsulación al modificar alguno de estos parámetros. Las eficacias de encapsulación conseguidas fueron 46.4 % ± 2.1 %, 52.1 % ± 1 %, 55 % ± 3.4 % y 65.3 % ± 1.9 %.(49) De igual forma, Cerchiara et al 2017 evaluaron la eficacia de encapsulación de vancomicina al cambiar algunos parámetros antes de la síntesis de NP mediante gelificación iónica. Sin embargo, no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con la modificación de los parámetros anteriormente mencionados, dando valores de DEE% de 22.74 % ± 7.61 %, 22.86 % ± 7.69 % y 24.13 % ± 5.90 %.(154)

En otros estudios, se han observado eficiencias de encapsulación del 20% ± 1,2% de albúmina sérica bovina (BSA) para un tamaño de nanopartícula de 415 ± 8.66 nm, así como una eficacia de encapsulación de doxiciclina del 53 % ± 19% y 56 % ± 10 % para un rango de tamaño hidrodinámico entre 30 a 220 nm y 200 a 320 nm, respectivamente.(99,155) Esto pone de manifiesto que la eficacia de encapsulación puede verse condicionada por diferentes parámetros. Por lo tanto, la elección del tamaño, carga superficial, método de síntesis, concentraciones y proporciones, así como el pH se deben tener en consideración al momento de diseñar nanopartículas poliméricas.

Además de lo mencionado anteriormente, un conocimiento profundo de las propiedades adhesivas de un material puede ser una estrategia valiosa para predecir y planificar la fijación del polímero al lugar deseado. Vieira et al 2018 compararon nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) con SLNs recubiertas de chitosan (C-SLNs) en términos de sus propiedades de adhesión a la mucina. Los resultados revelaron que las C-SLN mostraron una mayor adhesión a la mucina que las SLN.(140) Esto es debido a que se produce una interacción iónica cuando el grupo amino de carga positiva del chitosan entra en contacto con los grupos carboxilo y sulfato de carga negativa de la mucina.(81,123,140,156) Esta

interacción da lugar a un cambio de tamaño, en el potencial zeta (ζ) e índice de polidispersión. Las propiedades adhesivas de las NP se validaron observando cambios en el tamaño de las partículas y en la carga superficial tras la interacción NP-mucina. Estos cambios confirman las propiedades adhesivas del sistema.

5.3 Liberación desde los sistemas estudiados

Una vez optimizados los sistemas de liberación de fármacos, es importante conocer el tiempo y el perfil de liberación del sistema para evaluar su comportamiento. Lo cual condicionará el propósito y objetivo ya que, una liberación lenta y sostenida podrá buscar intereses distintos a una liberación rápida. Por lo que, es posible diseñar sistemas (hidrogeles, nanotubos, nanopartículas, etc.) capaces de acelerar o retrasar la liberación ya sea en minutos, horas o, incluso, días.(29,65,99,157–159)

En este trabajo de investigación, las superficies bioactivas no fueron capaces de adsorber y liberar el agente terapéutico al cual fueron expuestos. Los resultados aquí presentes, muestran similitud con los presentados por Sundblom et al 2019, quienes evaluaron la adsorción y liberación de gentamicina de tres materiales quirúrgicos de uso común, como son las baldosas de cemento haxagonales de CaP compuestas de monetita, pirofosfato cálcico y beta fosfato tricálcico (CaP), así como discos de grado médico de polieteretercetona (PEEK) y titanio de grado V (Ti). Sin embargo, aunque fue posible detectar < 1% de gentamicina adsorbido a las muestras PEEK y Ti, el perfil de liberación de las muestras fue mínimo o nulo, respectivamente.(160)

Por el contrario, se evaluó el perfil de liberación de ibuprofeno desde una superficie nanoporosa anodizada con hidróxido de sodio (NaHO) y recubierta con un derivado de polidimetilsiloxano como es el 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES). Los resultados presentados mostraron que el recubrimiento con APTES retrasaba la liberación del fármaco en comparación con aquellas superficies que no fueron modificadas con APTES.(29) Esto podría explicarse debido a que el APTES es una molécula biofuncional que se une covalentemente al óxido metálico, proveyendo de grupos amino terminales (-NH_2) a la superficie. Esto podría tener un impacto significativo en la funcionalización tanto de carga como en la liberación de fármaco desde la superficie.(29,45,58,144,161)

Por otro lado, si bien es cierto que solo el paracetamol fue detectable en la superficie bioactiva con precipitados biomiméticos, la cantidad adsorbida no fue suficiente para ser detectada en el ensayo de liberación. Estos resultados difieren con los presentados por algunos autores, quienes han reportado metodologías eficaces para cargar los precipitados biomiméticos. Sin embargo, estos métodos son complejos y es imprescindible la utilización de equipos de laboratorio caros.(67,147–152) De modo que, ante la imposibilidad de cargar las superficies bioactivas, buscamos un enfoque distinto que permitieran cargarlas con los fármacos deseados. Con esta intención, fueron diseñados los recubrimientos de PVA y PVANP, que sí permitieron la vehiculización de fármacos con éxito.

Se ha reportado que una variación en la concentración de PVA para diseñar un hidrogel mediante el método de evaporación de solvente condiciona el perfil de liberación. El resultado mostró que unas concentraciones de PVA del 5% y del 7.5% p/v presentaron un perfil de liberación rápido de ibuprofeno durante los primeros 15 minutos. En este periodo de tiempo, las muestras liberaron más del 72% del total del fármaco vehiculizado.(159) De la misma forma, Salehi et al 2017 reportaron que el perfil de liberación de benzonato de rizatriptán diferia en función de las concentraciones empleadas para la fabricación de un hidrogel compuesto de alchol polivinilo, oxido de polietileno e hidroxipropilmetilcelulosa, alcanzandose que la concentración máxima de liberación entre los 40 y 80 minutos.(133)

Zuluaga et al 2018 diseñaron parches de hidrogel compuestos de PVA/dextrano para la liberación de astaxantina. Las muestras seleccionadas en el estudio para evaluar el perfil de liberación demostraron que el hidrogel de PVA/dextrano liberó toda la astaxantina a las 5 y 8 horas.(158) En otro estudio, se reportó el diseño de hidrogel líquido a base de PVA/Cs como sistema de liberación de bromuro de benzalconio (BZL). Los autores demostraron que la liberación del bromuro de benzalconio se veía condicionada por la concentración de PVA en el diseño del hidrogel, de modo que una concentración del 0 % PVA y 1% Cs liberaba el 90 % de BZL a las 36 horas, y cuando la concentración de PVA aumentaba al 10% y la de Cs se mantenía al 1%, el sistema liberaba el 90% de BZL a las 60 horas.(162)

Por otro lado, otros autores han investigado el uso de un recubrimiento de polímeros similares para liberar doxepina. Reportando que las matrices de chitosan (Cs), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)y carboximetilcelulosa (SCMC) presentaron comportamientos similares entre ellos, presentando una fase rápida de liberación, seguida de una liberación sostenida del fármaco durante 6 horas.(65) Estos perfiles de liberación fueron muy similares a los presentados en este trabajo de investigación.

Para el primer ensayo de liberación de este trabajo de investigación, mostrado en el **capítulo 3**, los volúmenes fueron determinados en función de la baja o nula dosis adsorbida a las superficies bioactivas. Por el contrario, para el segundo ensayo de liberación mostrado en el **capítulo 4**, los volúmenes fueron mayores debido a la mayor concentración de fármaco vehiculizada en los recubrimientos y su fácil detección mediante el método analítico propuesto. En ambos casos, el comportamiento de liberación de los recubrimientos de PVA fue muy similar entre los distintos fármacos analizados. Sin embargo, una concentración del 3% p/v de PVA mostró una fase rápida de liberación a los 30 minutos de iniciarse el ensayo en el primer caso y de 60 minutos para el segundo ensayo de liberación. Las muestras de PVA cargadas con paracetamol, ibuprofeno y doxepina liberaron menos del 40% del fármaco en este periodo de tiempo. De igual forma, los recubrimientos de PVA cargados con doxiciclina, vancomicina y doxepina liberaron menos del 45% del fármaco en el mismo periodo. No obstante, los picos máximos de liberación del sistema se vieron retrasado en el ensayo descrito en el **capítulo 4** como consecuencia de la mayor dosis vehiculizada por las superficies.

Por último, la matriz de PVA fue vehiculizada con NP cargadas. Pudiéndose observar un retraso en los perfiles de liberación del fármaco cuando las NP se encontraban incorporadas en el recubrimiento de PVA. Pawar et al 2018 estudiaron un hidrogel a base de alginato para vehiculizar NP de chitosan cargadas con vancomicina y observaron que el perfil de liberación de las NP con vancomicina se retrasaba significativamente cuando el sistema coloidal era incorporado al hidrogel, alcanzado los picos máximos de liberación a las 80 horas para las NP con vancomicina y 400 horas cuando las NP cargadas se incorporaron al hidrogel.(49)

Azizian el at 2018 evaluaron el comportamiento de liberación de NP cargadas con albumina sérica bovina (BSA) desde un andamio a base de chitosan/gelatina y comprobaron que el sistema presentaba una liberación rápida, liberando más del 80% transcurridas 4 horas.(155) Cover et al 2012 analizaron diferentes formulaciones para la síntesis de NP de chitosan mediante gelificación iónica para encapsular doxiciclina. Las muestras seleccionadas para el ensayo de liberación fueron las nombradas como DCNP4 y DCNP6 (DEE%, 53% y 56%, respectivamente). Ambos sistemas, presentaron una fase de liberación rápida, seguida de una liberación lenta. DCNP4 liberó < 60 % a las 5 horas y DCNP6 liberó > 60 % a las 4 horas de haber iniciado el ensayo. La liberación se mantuvo durante 24 horas, después de este periodo, no se detectó doxiciclina en el medio.(99)

El comportamiento de liberación de los recubrimientos de PVA y PVANP puede explicarse por la biodegradabilidad del material. Cuando la matriz de alcohol polivinilo entra en contacto con el medio, comienza la biodegradación del sistema, que corresponde a la fase de liberación rápida del mismo. A ésta le sigue la fase de liberación sostenida, en la que el sistema (hidrogel y nanopartículas) necesita degradarse completamente para liberar el fármaco restante. Este comportamiento se retrasa cuando las nanopartículas están incorporadas en la matriz de PVA, ya que el hidrogel de PVA sirve como barrera protectora. La rápida solubilidad del recubrimiento se debe a la alta hidrofilia del PVA. Una vez que las NP se liberan de la matriz, comienza su degradación y, con ella, la liberación del fármaco. Además, la solubilidad del fármaco y la difusión a través del polímero se convierte en un factor determinante en la liberación del este.(92,109,163–165)

5.4 Efecto antimicrobiano

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a nivel mundial debido al uso indebido y excesivo de este tipo de medicamentos.(166) Esta resistencia a los medicamentos se puede caracterizar y clasificar por dos signos: resistencia interna y resistencia adquirida. La resistencia interna es la capacidad genética de un microorganismo de codificar en los cromosomas y propagar la información en la línea de tipo dado de microorganismo. Por otro

lado, la resistencia adquirida, es la capacidad del microorganismo de oponerse al fármaco expuesto. Esta resistencia implica un cambio en su ADN, resultando en la aparición de nuevos rasgos característicos. Esto mediante la mutación de cromosomas o la adquisición de nuevas piezas de ADN (plásmido) que codifican para una función de resistencia.(167)

Es por esta razón que, vinculado al concepto de resistencia antimicrobiana, en este trabajo de investigación evaluamos dos sistemas en la entrega dirigida de medicamentos. Un primer sistema donde el fármaco era liberado desde una matriz de PVA y un segundo sistema de liberación en donde el fármaco se encontraba encapsulado en NP a base de chitosan y que a su vez estas se encontraban vehiculizadas en el hidrogel de PVA. Para tal efecto, se analizó la actividad antimicrobiana de los sistemas liberadores de fármacos. Con esta intención, se optó por utilizar una biopelícula multiespecífica procedente de la placa dental de pacientes debido a que sus características biológicas se aproximan más a una situación *in vivo* que nos podemos encontrar en el día a día de la clínica dental en comparación con una biopelícula monoespecífica.(128,168,169) Para estudiar la actividad antimicrobiana de los DDS se utilizaron diferentes métodos analíticos, ya que no existe ninguna técnica analítica de referencia.(141) Por ello, es necesario conocer las ventajas y desventajas que proporcionan las diferentes técnicas empleadas en el análisis.

El recuento de UFC recupera los microorganismos viables, pero no detecta las bacterias viables pero no cultivables (VBNC), lo que da lugar a errores de cálculo en las biopelículas orales, puesto que aproximadamente el 50% de la población oral se encuentra en este estado de VBNC.(141) Por el contrario, el ensayo de ATP cuantifica la producción microbiana de ATP de toda la comunidad, incluidas las bacterias viables y VBNC.(168) (141,170) Sin embargo, la cantidad de ATP generado puede variar en función de la especie y, por tanto, estimar el número de células microbianas en una biopelícula multiespecífica a partir de la producción de ATP puede resultar complicado.(168) Además, se incluyeron el CLSM y la técnica LIVE/DEAD porque clasifica las células según el estado de la membrana, de modo que las bacterias con membrana intacta podrían considerarse vivas y las células dañadas, muertas. La principal limitación de esta técnica es que las células de membrana intacta pueden estar metabólicamente

inactivas y, por tanto, muertas, mientras que las células de membrana dañada pueden seguir vivas, lo que puede dar lugar a falsos positivos o falsos negativos.(141,170)

La actividad antimicrobiana de los sistemas se probó a tiempos de 4 y 24 h, ya que mantener una liberación controlada de la dosis durante las primeras horas es crucial para garantizar un entorno aséptico con el objetivo de evitar la adhesión bacteriana. Existe un "periodo crítico" durante las primeras 6 h tras la implantación en las cuales es esencial evitar la adhesión bacteriana para poder garantizar el éxito a largo plazo de un implante.(40,44,46,49,171) Los sistemas de liberación investigados en este trabajo presentaron un perfil de liberación durante un periodo de 6 h. Sin embargo, aunque los recubrimientos de PVA y PVANP se disolvieron y los fármacos fueron liberados durante las primeras 6 horas, las muestras se evaluaron después de 24 horas para verificar los efectos de cualquier fármaco residual a medio plazo y sus efectos sobre las bacterias.

En general, los resultados obtenidos de los diferentes ensayos (UFC, ATP y CLSM) fueron coherentes para los distintos grupos de estudio. Como era de esperar, los discos de titanio no inhibieron el crecimiento bacteriano y se obtuvieron resultados similares para las muestras recubiertas con la muestra PVA, como se demostró en un estudio anterior.(128) Sin embargo, cuando el hidrogel de PVA fue cargado con las NP de chitosan, se observó cierta actividad. Se han reportado estudios donde el chitosan ha mostrado actividad antibiofilm y la capacidad de inhibir la adhesión bacteriana a la superficie.(62,99,129,162) Esta propiedad del Cs es conferida por el peso molecular, la concentración y la naturaleza policatiónica del polímero, debido a la presencia de grupos amino funcionales ($-NH_2$) en unidades de N-acetilglucosamin.(94,102,129) La actividad antimicrobiana de esta biomolécula catiónica podría atribuirse a sus interacciones electroestáticas con las membranas bacterianas cargadas negativamente, pudiendo desplazar algunos componentes que estabilizan a los lipopolisacáridos (cationes Ca^{++} y Mg^{++}) ubicados en la membrana externa de las bacterias. Esta interacción entre el chitosan y los componentes negativos de la membrana como las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la pared celular, produciría un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la fuga de componentes bacterianos.(40,62,68,121,129)

La inhibición bacteriana aumentó cuando los sistemas PVA y PVANP se cargaron con los antibióticos. La doxiciclina ejerció una mayor actividad antibacteriana y con un efecto más prolongado que la vancomicina, especialmente el grupo PVANP-doxiciclina. Esto se puede deber a que la doxiciclina tiene una actividad de amplio espectro y es eficaz contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como espiroquetas y micoplasmas.(99,172) Su mecanismo de acción está asociado con la inhibición de la síntesis de proteínas. También puede causar alteración en la membrana citoplasmática permitiendo la fuga de nucleótidos y otros componentes celulares.(68,173,174) La vancomicina, por el contrario, es un antibiótico glicopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana y es particularmente eficaz contra bacterias Gran-positivas como *Staphylococcus aureus*, que se encuentra comúnmente en infecciones asociadas a implantes.(49,154) A pesar de sus beneficios, la vancomicina tiene algunos inconvenientes, como el desarrollo de resistencia en organismos Gram-negativos relacionados con la incapacidad del fármaco para penetrar la barrera bacteriana de la membrana externa.(167)

Aunque sin diferencias significativas, después de 4 horas los grupos PVANP-doxiciclina y PVANP-vancomicina dieron mejores resultados en comparación con los grupos PVA-doxiciclina y PVA-vancomicina. Una posible explicación podría ser que, una vez que se inicia la degradación de la lámina de PVA, las NP se liberan de la matriz, adhiriéndose a la pared celular gracias a la interacción electroestática y propiedades adhesivas del sistema, alterando la permeabilidad y dejando a las bacterias más susceptibles a la presencia del antibiótico.(84) Curiosamente, el PVANP-doxiciclina dio RLUs significativamente más bajas que las UFC. Es posible que el metabolismo bacteriano se viera más afectado en este grupo, aunque las bacterias todavía estuvieran vivas.

El recuento microbiano y la producción de ATP más bajos a las 4 horas se observaron con la muestra PVANP-doxiciclina, seguida de PVA-vancomicina, PVANP-vancomicina y PVA-doxiciclina. Trascurridas 24 horas, la eficacia de casi todos los sistemas se redujo significativamente, lo que puede ser una consecuencia del perfil de liberación de los sistemas —el cual se produce dentro de las primeras 6 horas—. Además, la dosis y la cantidad de partículas de

chitosan incorporadas en los sistemas también podrían haber influido en la reducción o perdida de efecto. La reducción del agente antimicrobiano con el tiempo podría haber permitido que las bacterias crecieran en las superficies de titanio recubiertas. Además, cuanto más maduro es el biofilm, más resistente se vuelve a la acción de los antimicrobianos residuales como consecuencia de varios mecanismos, como el desarrollo de la matriz EPS y otros factores como la presencia de células persistentes.(141,169)

Después de 24 h el PVA-doxiciclina fue el único sistema que mantuvo su efecto antibacteriano. Esta actividad a lo largo del tiempo puede estar relacionada con un efecto post-antibiótico más largo —el tiempo expresado en horas que las bacterias tardan en recuperar su crecimiento normal tras la exposición a antibióticos— de la doxiciclina frente a la vancomicina.(173) De hecho, se ha informado que el efecto post-antibiótico de doxiciclina encapsulada en nanopartículas contra dos cepas de *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* (MRSA), MRSA-S1 y MRSA-S2, fueron de 3 h y 3,5 h, respectivamente.(173) Por el contrario, se ha reportado que el efecto post-antibiótico de la vancomicina demostró ser más corto frente al MRSA entre 1 y 2 h, lo que podría justificar la pérdida de actividad de los sistemas después de 6 h. Finalmente, la efectividad del sistema PVA-doxiciclina después de 24 horas también puede atribuirse a la dosis terapéutica más alta del fármaco cuando este se encuentra integrado en la matriz de PVA en comparación con la dosis encapsulada en las nanopartículas (124.80 µg en PVA-doxiciclina vs 67.01 µg en PVANP-doxiciclina).

Sorprendentemente, los grupos cargados con doxepina mostraron una baja actividad antibacteriana, especialmente cuando se incorporó a la matriz de PVA. La doxepina es un antidepresivo tricíclico (ATC) y es un derivado de la dibenzoxepina. Sin embargo, se ha reportado el uso de doxepina como tratamiento alternativo a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) para el control del dolor dérmico o mucoso. Esto es debido a que presenta propiedades analgésicas y anestésicas locales cuando es administrada en pequeñas dosis.(65,175–178) Además, se ha reportado que los ATC han mostrado efectos antifúngicos y antimicrobianos sobre patógenos intestinales como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Giardia lamblia*.(179–181)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

El mecanismo de acción de los TAC contra las bacterias no es muy bien conocido y genera confusión. Se ha informado que algunos inhibidores post-selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) ejercen doble acción como inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (IRSN), esta es una propiedad que también poseen uno o más de los ATC, como es la doxepina.(182,183) Algunas hipótesis sugieren que los ATC inhiben la replicación del plásmido de ADN y la enzima ADN girasa, así como la bomba de eflujo bacteriano.(179–181) Además, se ha informado que los medicamentos con dos o más anillos de benceno en su estructura química poseen actividad antimicrobiana.(184) El mecanismo de recaptación de serotonina y norepinefrina de doxepina, así como su estructura química con dos anillos de benceno, puede ser responsable de su efecto bacteriostático.(65,183)

5.5 Limitaciones del trabajo

En definitiva y considerando las afirmaciones de diferentes investigadores, así como, de la Organización Mundial de la Salud en referencia a la adhesión temprana y el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos, en este trabajo de investigación se desarrollaron sistemas que fueran capaces de transportar y liberar fármaco localmente en el lugar de administración. Únicamente ha sido posible vehiculizar los agentes terapéuticos en matrices poliméricas. Con el propósito de brindarle protección antimicrobiana a la superficie durante las primeras 6 horas, lapso crítico para la adhesión y proliferación celular del huésped, se buscó la liberación rápida y sostenida en un periodo de tiempo corto.

Sin embargo, debido a la evidencia de resistencia bacteriana. En algunos casos estos agentes antimicrobianos pueden presentar una disminución o inhibición de su efecto. De acuerdo con la OMS, en 2019 fueron determinados 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico capaces de combatir los patógenos resistentes de la lista de patógenos prioritarios de la OMS, indicando que solo seis de los fármacos se consideran innovadores. En esta línea, es importante comprender no solo el efecto terapéutico por el cual han sido comercializados los fármacos ya que se ha demostrado que fármacos con propósitos terapéuticos diferentes a buscar la inhibición bacteriana pueden poseer más o menos actividad ante este tipo de microorganismos. En este trabajo de investigación, se confirmó que la

doxepina presenta una pequeña actividad antimicrobiana. Sin embargo, esta no fue significativamente determinante para la inhibición de la muestra.

Por último, al incorporar las nanopartículas de chitosan en la matriz de PVA, podemos lograr la administración de fármacos dirigidos a sitios específicos. El desarrollo de este sistema de administración de fármacos puede proporcionar nuevas oportunidades para el tratamiento de diversas enfermedades y puede conducir a mejoras significativas en los resultados de los pacientes. A pesar de las pruebas realizadas en este trabajo de investigación, no considera factores del huésped como la presencia de saliva y células inmunes al ser un estudio *in vitro*, por lo que se espera un efecto diferente *in vivo*. Por lo tanto, es necesario seguir desarrollando métodos para recubrir superficies de implantes, capaces de liberar fármacos. El objetivo para el futuro será utilizar los conocimientos sobre el PVA y Cs para incorporarlos a los implantes dentales. Los primeros minutos tras la implantación son cruciales para obtener un tejido sano. Los sistemas de administración de fármacos podrían evitar la colonización de bacterias alrededor del implante dental y mejorar el proceso de cicatrización en los primeros minutos tras la cirugía. En próximos trabajos, sería interesante evaluar el efecto biológico de las superficies cargadas de fármacos utilizando PVANP como sistema de liberación de fármaco.

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

6.1 Conclusiones generales

En base a todo lo expuesto en el presente trabajo de investigación, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La superficie de titanio anodizada fue recubierta exitosamente con los precipitados de hidroxiapatita mediante la formulación de fluido corporal simulado.
- Una superficie de titanio más rugosa o hidrofílica no garantiza la adsorción del fármaco.
- El recubrimiento a base de alcohol polivinilo demostró ser una matriz eficaz en la vehiculización de fármacos y nanopartículas.
- El sistema de nanopartículas coloidales a base de chitosan, demostró ser estable en su preparación y conservación.
- La carga y encapsulación de los sistemas liberadores para todos los fármacos fue eficaz, demostrando la versatilidad de los sistemas para vehiculizar el agente terapéutico deseado.
- La fácil preparación y caracterización de los sistemas transportadores de fármacos evaluados en este trabajo de investigación demostraron propiedades antimicrobianas y adhesivas adecuadas, por lo que, podrían ser una interesante opción en la modificación de la superficie de implantes de titanio en la entrega dirigida de fármacos (doxiciclina, vancomicina, etc.). En adición, el enfoque terapéutico de los sistemas podría ser modificado ya que se comprobó que el recubrimiento de PVA no solo fue exitosamente cargado con antibióticos, sino que, además, fue posible vehiculizar fármacos como paracetamol, ibuprofeno y doxepina.
- Los sistemas liberadores de fármacos presentaron una mayor eficacia y un mayor efecto prolongado en sus propiedades antibacterianas cuando fueron cargados con doxiciclina.

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

BIBLIOGRÁFIA

1. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. J Investig Clin Dent [Internet]. 2018 Nov 4;9(4):e12349. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29971928

2. Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudré C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. Acta Biomater [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Apr 13];83:37–54. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706118306354

3. Sánchez Treviño AY. Osteoblastic cell response of biomimetic coatings formed on titanium surfaces mediated by self-assembled films [Internet]. Editorial de la Universidad de Granada; 2014 [cited 2023 Nov 16]. Available from: http://hdl.handle.net/10481/34099

4. Zahran R. El efecto del tiempo del HF grabado en la topografía, humectabilidad, química de la superficie del TI, y la respuesta celular [Internet]. Universidad de Granada; 2017 [cited 2024 Mar 6]. Available from: http://hdl.handle.net/10481/45901

5. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y, Guéhennec L Le, Soueidan A, et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater [Internet]. 2007 Jul;23(7):844–54. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564106001850

6. Steinemann SG. Titanium — the material of choice? Periodontol 2000 [Internet]. 1998 Jun 23 [cited 2023 Nov 13];17(1):7–21. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.1998.tb00119.x

7. Silva RCSS, Agrelli A, Andrade AN, Mendes-Marques CL, Arruda IRSS, Santos LRLL, et al. Titanium Dental Implants: An Overview of Applied Nanobiotechnology to Improve Biocompatibility and Prevent Infections. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Mar 22];15(9). Available from: /pmc/articles/PMC9104688/

8. ASTM. ASTM compass [Internet]. 2017 [cited 2024 Mar 6]. Available from: https://compass.astm.org/document/?contentCode=ASTM%7CF0067-

00%7Cen-US&proxycl=https%3A%2F%2Fsecure.astm.org&fromLogin=true

9. Barão VAR, Costa RC, Shibli JA, Bertolini M, Souza JGS. Emerging titanium surface modifications: The war against polymicrobial infections on dental implants. Braz Dent J [Internet]. 2022 Feb 7 [cited 2022 Jul 14];33(1):1–12. Available from: http://www.scielo.br/j/bdj/a/dMWZDkVqHSWCD8qCBF5XmNy/?lang=en

10. Albrektsson T, Chrcanovic B, Jacobsson M, Wennerberg A. Osseointegration of Implants – A Biological and Clinical Overview. JSM Dent Surg. 2017;2(3):1022.

11. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. Clin Implant Dent Relat Res [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Nov 12];21(S1):4–7. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cid.12742

12. Brånemark PI, Hansson B, Adell R, Breine U, Lindström J, O H. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Scand J Plast Reconst Surg. 1977;16:1–132.

13. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta orthop scand. 1981;52(2):155–70.

14. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, et al. The interface zone of inorganic implants In vivo: Titanium implants in bone. Ann Biomed Eng [Internet]. 1983;11(1):1–27. Available from: https://doi.org/10.1007/BF02363944

15. Donath K, Laass M, Günzl HJ, Laaß M, Günzl HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol [Internet]. 1992 Feb [cited 2023 Nov 13];420(2):131–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1549902/

16. Yeo ISL. Modifications of Dental Implant Surfaces at the Micro- and Nano-Level for Enhanced Osseointegration. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Nov 14];13(1):89. Available from: /pmc/articles/PMC6982017/

17. Davies JE. Is osseointegration a foreign body reaction? Int J Prosthodont. 2019;32(2):133–6.

18. Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness parameters. J Mater Process Technol [Internet]. 2002;123(1):133–45. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924013602000602

19. Mendoza-Arnau A, Vallecillo-Capilla MFMF, Cabrerizo-Vílchez MÁMÁ, Rosales-Leal JIJI. Topographic characterisation of dental implants for commercial use. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Mar 5];21(5):e631-6. Available from: /pmc/articles/PMC5005103/

20. Zhang Y;, Gulati K;, Li Z;, Di P;, Liu Y, Zhang Y;, et al. Dental Implant Nano-Engineering: Advances, Limitations and Future Directions. Nanomater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021 Sep 24 [cited 2023 Nov 14];11(10):2489. Available from: https://www.mdpi.com/2079-4991/11/10/2489/htm

21. Mendoza Arnau A. Caracterización topográfica de implantes de uso comercial [Internet]. Universidad de Granada; 2016 [cited 2024 Mar 5]. Available from: http://hdl.handle.net/10481/43610

22. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res [Internet]. 1991 Jul [cited 2024 Mar 7];25(7):889–902. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918105

23. Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzaglia G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet]. 2010 Aug;365(1–3):222–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709007274

24. Janssen MI, van Leeuwen MBM, van Kooten TG, de Vries J, Dijkhuizen L, Wösten HAB. Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. Biomaterials [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2024 Mar 7];25(14):2731–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962552

25. Kim C, Kendall MR, Miller MA, Long CL, Larson PR, Humphrey MB, et al. Comparison of titanium soaked in 5 M NaOH or 5 M KOH solutions. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl [Internet]. 2013 Jan;33(1):327–39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.047

26. Hulka I, Mirza-Rosca JC, Buzdugan D, Saceleanu A. Microstructure and Mechanical Characteristics of Ti-Ta Alloys before and after NaOH Treatment and Their Behavior in Simulated Body Fluid. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Sep 22];16(5). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36903057/

27. George E Aninwene Il, Yao C, Webster TJ. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces. Int J Nanomedicine [Internet]. 2008;3(2):257–64. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527662/

28. Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. Biomaterials [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2019 May 17];29(28):3822–35. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208003499?via%3Dihub

29. Pawlik A, Socha RP, Hubalek Kalbacova M, Sulka GD. Surface modification of nanoporous anodic titanium dioxide layers for drug delivery systems and enhanced SAOS-2 cell response. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2018 Nov 1;171:58–66. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776518304594

30. Jiang P, Zhang Y, Hu R, Shi B, Zhang L, Huang Q, et al. Advanced surface engineering of titanium materials for biomedical applications: From static modification to dynamic responsive regulation. Bioact Mater [Internet]. 2023 Sep;27:15–57. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X2300083X

31. Textor M, Sittig C, Frauchiger V, Tosatti S, Brunette DM. Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. In: Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. p. 171–230. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-56486-4_7

32. Xia W, Lindahl C, Lausmaa J, Engqvist HHH. Biomimetic Hydroxyapatite Deposition on Titanium Oxide Surfaces for Biomedical Application. In: Advances in Biomimetics. InTech: New York; 2011. p. 429–52.

33. Kokubo T, Yamaguchi S. Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys. Acta Biomater [Internet]. 2016 Oct 15 [cited 2024 Mar 10];44:16–30. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116304007

34. Xie Y, Liu X, Chu PK, Ding C. Nucleation and growth of calcium–phosphate on Ca-implanted titanium surface. Surf Sci [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2023 Nov

18];600(3):651–6. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039602805013075

35. Pham MT, Matz W, Reuther H, Richter E, Steiner G, Oswald S. Ion beam sensitizing of titanium surfaces to hydroxyapatite formation. Surf Coatings Technol [Internet]. 2000 [cited 2023 Nov 18];128:313–9. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897200005934

36. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials [Internet]. 2006 May 1 [cited 2019 May 17];27(15):2907–15. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206000457?via%3Dihub

37. Jalota S, Bhaduri SB, Tas AC. Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. J Mater Sci Mater Med [Internet]. 2006 Aug;17(8):697–707. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10856-006-9680-1

38. Kokubo T, Yamaguchi S. Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it. J Biomed Mater Res A [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Mar 10];107(5):968–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30684387

39. Akshaya S, Rowlo PK, Dukle A, Nathanael AJ. Antibacterial Coatings for Titanium Implants: Recent Trends and Future Perspectives. Antibiot (Basel, Switzerland) [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Apr 14];11(12). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9774638/

40. Akay S, Yaghmur A. Recent Advances in Antibacterial Coatings to Combat Orthopedic Implant-Associated Infections. Molecules [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2024 Mar 21];29(5). Available from: /pmc/articles/PMC10935003/

41. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2022 Jul 13];91(1):470–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637369

42. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SFF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Mar 1];185:110627. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31732391/

43. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 Apr [cited 2021 Oct 6];15(2):167–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229/

44. Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. Chem Soc Rev [Internet]. 2006 Aug 23 [cited 2022 Jul 13];35(9):780–9. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2006/cs/b515219b

45. Hickok NJ, Shapiro IM, Chen AF. The Impact of Incorporating Antimicrobials into Implant Surfaces. J Dent Res [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Mar 22];97(1):14–22. Available from: /pmc/articles/PMC5755811/

46. Minkiewicz-Zochniak A, Jarzynka S, Iwańska A, Strom K, Iwańczyk B, Bartel M, et al. Biofilm Formation on Dental Implant Biomaterials by Staphylococcus aureus Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2024 Mar 15];14(8). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8073800/

47. Silva-Santana G, Cabral-Oliveira GG, Oliveira DR, Nogueira BA, Pereira-Ribeiro PMA, Mattos-Guaraldi AL. Staphylococcus aureus biofilms: an opportunistic pathogen with multidrug resistance. Rev Res Med Microbiol [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Mar 15];32(1):12–21. Available from: https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/fulltext/2021/01000/staphylococcus_aureus_biofilms__an_opportunistic.3.aspx

48. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2020 Aug 19 [cited 2024 Mar 15];84(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792334/

49. Pawar V, Topkar H, Srivastava R. Chitosan nanoparticles and povidone iodine containing alginate gel for prevention and treatment of orthopedic implant associated infections. Int J Biol Macromol [Internet]. 2018 Aug;115:1131–41. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018307359

50. Kennedy DG, O'Mahony AM, Culligan EP, O'Driscoll CM, Ryan KB, O'Mahony AM, et al. Strategies to Mitigate and Treat Orthopaedic Device-Associated Infections. Antibiot (Basel, Switzerland) [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Mar 26];11(12). Available from: /pmc/articles/PMC9774155/

51. Yu J, Zhou M, Zhang L, Wei H. Antibacterial Adhesion Strategy for Dental Titanium

Implant Surfaces: From Mechanisms to Application. J Funct Biomater [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Mar 22];13(4). Available from: /pmc/articles/PMC9589972/

52. Braem A, Kamarudin NHN, Bhaskar N, Hadzhieva Z, Mele A, Soulié J, et al. Biomaterial strategies to combat implant infections: new perspectives to old challenges. Int Mater Rev [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2024 Mar 25];68(8):1011–49. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1080/09506608.2023.2193784

53. Barik A, Chakravorty N. Targeted Drug Delivery from Titanium Implants: A Review of Challenges and Approaches. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 16];1251:1–17. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/5584_2019_447

54. Mahanta U, Khandelwal M, Deshpande AS. Antimicrobial surfaces: a review of synthetic approaches, applicability and outlook. J Mater Sci [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 Mar 27];56(32):17915–41. Available from: /pmc/articles/PMC8354584/

55. Wang Y, Yang Y, Shi Y, Song H, Yu C, Wang Y, et al. Antibiotic-Free Antibacterial Strategies Enabled by Nanomaterials: Progress and Perspectives. Adv Mater [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Mar 27];32(18):e1904106. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.201904106

56. Arango-Santander S. Bioinspired Topographic Surface Modification of Biomaterials. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Mar 27];15(7). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35407716/

57. Chen X, Zhou J, Qian Y, Zhao LZ. Antibacterial coatings on orthopedic implants. Mater today Bio [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Mar 27];19:100586. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36896412/

58. Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2012 Sep;64(12):1165–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512927

59. Kravanja KA, Finšgar M. A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients. Mater Des [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Mar 27];217:110653. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026412752200274X

60. Aoki K, Saito N. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone

Regeneration. Pharmaceutics [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2024 Mar 28];12(2):95. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4923/12/2/95/htm

61. Wassif RK, Elkayal M, Shamma RN, Elkheshen SA. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis. Drug Deliv [Internet]. 2021 Jan 10;28(1):2392–414. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2021.1998246

62. Helander I. M, Nurmiaho-Lassila ELL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. Int J Food Microbiol [Internet]. 2001 Dec 30 [cited 2023 Apr 13];71(2–3):235–44. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006092

63. Rivera-Hernández G, Antunes-Ricardo M, Martínez-Morales P, Sánchez ML. Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. Int J Pharm [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Nov 27];600:120478. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517321002830

64. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. J Control Release [Internet]. 2004 Nov 5 [cited 2021 Feb 4];100(1):5–28. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904003803

65. Castán H, Ruiz MA, Clares B, Morales ME. Design, development and characterization of buccal bioadhesive films of Doxepin for treatment of odontalgia. Drug Deliv [Internet]. 2015;22(6):869–76. Available from: https://doi.org/10.3109/10717544.2014.896958

66. Sanz R, Clares B, Mallandrich M, Suñer-Carbó J, Montes MJ, Calpena AC. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. Int J Pharm [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2023 May 8];535(1–2):393–401. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317310827

67. Ionita D, Bajenaru-Georgescu D, Totea G, Mazare A, Schmuki P, Demetrescu I. Activity of vancomycin release from bioinspired coatings of hydroxyapatite or TiO(2) nanotubes. Int J Pharm [Internet]. 2017 Jan 30;517(1–2):296–302. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27913240

68. Misra R, Sahoo SK. Antibacterial activity of doxycycline-loaded nanoparticles. Methods Enzymol [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Mar 3];509:61–85. Available

from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22568901

69. Ma M, Kazemzadeh-Narbat M, Hui Y, Lu S, Ding C, Chen DDY, et al. Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO2 nanotube arrays for peri-implant infections. J Biomed Mater Res A [Internet]. 2012 Feb;100(2):278–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045618

70. Wu B, Tang Y, Wang K, Zhou X, Xiang L. Nanostructured Titanium Implant Surface Facilitating Osseointegration from Protein Adsorption to Osteogenesis: The Example of TiO2 NTAs. Int J Nanomedicine [Internet]. 2022 [cited 2024 Mar 29];17:1865–79. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35518451

71. Pawlik A, Jarosz M, Syrek K, Sulka GD. Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2017 Apr 1;152:95–102. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28088017

72. Fathi M, Akbari B, Taheriazam A. Antibiotics drug release controlling and osteoblast adhesion from Titania nanotubes arrays using silk fibroin coating. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl [Internet]. 2019 Oct;103(May):109743. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31349530

73. Corobea MS, Albu MG, Ion R, Cimpean A, Miculescu F, Antoniac IV, et al. Modification of titanium surface with collagen and doxycycline as a new approach in dental implants. J Adhes Sci Technol [Internet]. 2015 Dec 2 [cited 2024 Mar 29];29(23):2537–50. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01694243.2015.1073661

74. Cortizo MC, Oberti TG, Cortizo MS, Cortizo AM, Fernández Lorenzo De Mele MA. Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion. J Dent. 2012 Apr 1;40(4):329–37.

75. Motta I, Soccio M, Guidotti G, Lotti N, Pasquinelli G. Hydrogels for Cardio and Vascular Tissue Repair and Regeneration. Gels (Basel, Switzerland) [Internet]. 2024 Mar 13 [cited 2024 Mar 29];10(3):196. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38534614/

76. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2024 Mar 29];64(SUPPL.):18–23. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002700

77. Khan SA, Ahmad H, Zhu G, Pang H, Zhang Y. Three-Dimensional Printing of Hydrogels for Flexible Sensors: A Review. Gels (Basel, Switzerland) [Internet]. 2024 Mar 8 [cited 2024 Mar 29];10(3):187. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38534605/

78. Sosnik A, Seremeta KP. Polymeric Hydrogels as Technology Platform for Drug Delivery Applications. Gels (Basel, Switzerland) [Internet]. 2017 Jul 3 [cited 2024 Mar 29];3(3):25. Available from: https://www.mdpi.com/2310-2861/3/3/25/htm

79. Nathan KG, Genasan K, Kamarul T. Polyvinyl Alcohol-Chitosan Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Application: A Review. Mar Drugs [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Nov 27];21(5). Available from: /pmc/articles/PMC10222047/

80. Ribeiro M, Simões M, Vitorino C, Mascarenhas-Melo F. Hydrogels in Cutaneous Wound Healing: Insights into Characterization, Properties, Formulation and Therapeutic Potential. Gels (Basel, Switzerland) [Internet]. 2024 Mar 8 [cited 2024 Mar 29];10(3):188. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38534606/

81. Cerchiara T, Abruzzo A, di Cagno M, Bigucci F, Bauer-Brandl A, Parolin C, et al. Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2015 May [cited 2021 Mar 15];92:112–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641115001356

82. Kohane DS. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. Biotechnol Bioeng [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2024 Mar 30];96(2):203–9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.21301

83. Arshad I, Kanwal A, Zafar I, Unar A, Mouada H, Razia IT, et al. Multifunctional role of nanoparticles for the diagnosis and therapeutics of cardiovascular diseases. Environ Res [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2024 Mar 30];242:117795. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38043894

84. de Pinho Neves AL, Milioli CC, Müller L, Riella HG, Kuhnen NC, Stulzer HK. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet]. 2014;445:34–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775713009758

85. Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for

gene delivery. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2005 Aug;44(2–3):65–73. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776505001682

86. Conde J, Dias JT, Grazú V, Moros M, Baptista P V., de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. Front Chem [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2024 Mar 31];2(JUL):48. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077142

87. Fernández-Álvarez F, Caro C, García-García G, García-Martín ML, Arias JL. Engineering of stealth (maghemite/PLGA)/chitosan (core/shell)/shell nanocomposites with potential applications for combined MRI and hyperthermia against cancer. J Mater Chem B [Internet]. 2021 Jun 23 [cited 2024 Mar 31];9(24):4963–80. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/tb/d1tb00354b

88. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2024 Mar 31];66:2–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270007

89. Kumar S, Dilbaghi N, Saharan R, Bhanjana G. Nanotechnology as emerging tool for enhancing solubility of poorly water-soluble drugs. Bionanoscience [Internet]. 2012 Sep 29 [cited 2024 Mar 30];2(4):227–50. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s12668-012-0060-7

90. Liu Z, Zhu Y, Liu X, Yeung KWK, Wu S. Construction of poly (vinyl alcohol)/poly (lactide-glycolide acid)/vancomycin nanoparticles on titanium for enhancing the surface self-antibacterial activity and cytocompatibility. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2017 Mar 1;151:165–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28011439

91. Mattioli-Belmonte M, Cometa S, Ferretti C, Iatta R, Trapani A, Ceci E, et al. Characterization and cytocompatibility of an antibiotic/chitosan/cyclodextrins nanocoating on titanium implants. Carbohydr Polym [Internet]. 2014 Sep 22;110:173–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906744

92. Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Exp Mol Pathol [Internet]. 2009;86(3):215–23. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448000800141X

93. Almalik A, Alradwan I, Kalam MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle

size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. Saudi Pharm J [Internet]. 2017 Sep;25(6):861–7. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016417300014

94. Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. Carbohydr Polym [Internet]. 2014;100:166–78. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712012660

95. Labhasetwar V, Song C, Levy RJ. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 1997 Feb 15 [cited 2024 Mar 31];24(1):63–85. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X96004838

96. Cheng Y, Mei S, Kong X, Liu X, Gao B, Chen B, et al. Long-term antibacterial activity of a composite coating on titanium for dental implant application. J Biomater Appl [Internet]. 2021 Jan;35(6):643–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33045872

97. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. Colloids Surf B Biointerfaces [Internet]. 2012;90:21–7. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511005650

98. Rashki S, Asgarpour K, Tarrahimofrad H, Hashemipour M, Ebrahimi MS, Fathizadeh H, et al. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. Carbohydr Polym [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Apr 1];251:117108. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861720312819

99. Cover NF, Lai-Yuen S, Parsons AK, Kumar A. Synergetic effects of doxycycline-loaded chitosan nanoparticles for improving drug delivery and efficacy. Int J Nanomedicine [Internet]. 2012 [cited 2023 Apr 13];7:2411–9. Available from: /pmc/articles/PMC3394463/

100. Suryani S, Chaerunisaa AY, Joni IM, Ruslin R, Anton A, Sartinah A, et al. The Chemical Modification to Improve Solubility of Chitosan and Its Derivatives Application, Preparation Method, Toxicity as a Nanoparticles. Nanotechnol Sci Appl [Internet]. 2024 [cited 2024 Mar 25];17:41. Available from: /pmc/articles/PMC10926861/

101. Tavakoli S, Klar AS. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. Biomolecules [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2024 Apr 1];10(8):1169. Available from:

https://www.mdpi.com/2218-273X/10/8/1169/htm

102. Zhang K, Liu Y, Shi X, Zhang R, He Y, Zhang H, et al. Application of polyvinyl alcohol/chitosan copolymer hydrogels in biomedicine: A review. Int J Biol Macromol [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2023 Jul 21];242(Pt 4):125192. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181302302086X

103. Yang Y, Liang Z, Zhang R, Zhou S, Yang H, Chen Y, et al. Research Advances in Superabsorbent Polymers. Polymers (Basel) [Internet]. 2024 Feb 12 [cited 2024 Mar 25];16(4):501. Available from: /pmc/articles/PMC10892691/

104. Gao H, He J, Yang R, Yang L. Characteristic rheological features of high concentration PVA solutions in water with different degrees of polymerization. J Appl Polym Sci [Internet]. 2010 Jun 5 [cited 2023 Nov 27];116(5):2734–41. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.31900

105. Poli(vinil alcohol) Mw ~67,000 | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2024 Apr 26]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/81383

106. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). Food Chem Toxicol [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2024 Apr 11];41(3):319–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504164

107. Song SI, Kim BC. Characteristic rheological features of PVA solutions in water-containing solvents with different hydration states. Polymer (Guildf) [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2023 Nov 27];45(7):2381–6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104000977

108. Stewart SA, Domínguez-Robles J, McIlorum VJ, Gonzalez Z, Utomo E, Mancuso E, et al. Poly(caprolactone)-Based Coatings on 3D-Printed Biodegradable Implants: A Novel Strategy to Prolong Delivery of Hydrophilic Drugs. Mol Pharm [Internet]. 2020 Sep 8 [cited 2021 May 24];17(9):3487–500. Available from: https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00515

109. Zhou WY, Guo B, Liu M, Liao R, Rabie ABM, Jia D. Poly(vinyl alcohol)/halloysite nanotubes bionanocomposite films: Properties and in vitro osteoblasts and fibroblasts response. J Biomed Mater Res A [Internet]. 2010 Jun 15 [cited 2023 Nov 22];93(4):1574–87. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.32656

110. Yi X, He J, Wei X, Li H, Liu X, Cheng F. A polyphenol and ε-polylysine functionalized bacterial cellulose/PVA multifunctional hydrogel for wound healing. Int J Biol

Macromol [Internet]. 2023 Aug 30 [cited 2024 Apr 1];247:125663. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37399880

111. El Knidri H, Belaabed R, Addaou A, Laajeb A, Lahsini A, Knidri H El, et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. Int J Biol Macromol [Internet]. 2018 Dec;120(Pt A):1181–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018313746

112. Almalik A, Donno R, Cadman CJ, Cellesi F, Day PJ, Tirelli N. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. J Control Release [Internet]. 2013 Dec;172(3):1142–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.032

113. Kung S, Devlin H, Fu E, Ho KYKY, Liang SYSY, Hsieh YDYD. The osteoinductive effect of chitosan–collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats. J Periodontal Res [Internet]. 2011 Feb;46(1):126–33. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0765.2010.01322.x

114. Almalik A, Alradwan I, Majrashi MA, Alsaffar BA, Algarni AT, Alsuabeyl MS, et al. Cellular responses of hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles. Toxicol Res (Camb) [Internet]. 2018 Sep 1;7(5):942–50. Available from: https://academic.oup.com/toxres/article/7/5/942/5553441

115. Michalik R, Wandzik I. A Mini-Review on Chitosan-Based Hydrogels with Potential for Sustainable Agricultural Applications. Polymers (Basel) [Internet]. 2020 Oct 21 [cited 2023 Jul 21];12(10):2425. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4360/12/10/2425/htm

116. Furlani F, Sacco P, Decleva E, Menegazzi R, Donati I, Paoletti S, et al. Chitosan Acetylation Degree Influences the Physical Properties of Polysaccharide Nanoparticles: Implication for the Innate Immune Cells Response. ACS Appl Mater Interfaces [Internet]. 2019 Mar 13;11(10):9794–803. Available from: https://doi.org/10.1021/acsami.8b21791

117. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. Int J Food Microbiol [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2024 Apr 4];144(1):51–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951455

118. Norowski PA, Courtney HS, Babu J, Haggard WO, Bumgardner JD. Chitosan coatings deliver antimicrobials from titanium implants: a preliminary study. Implant

Dent [Internet]. 2011 Feb;20(1):56–67. Available from: https://journals.lww.com/implantdent/Fulltext/2011/02000/Chitosan_Coatings_Deliver_Antimicrobials_From.9.aspx?casa_token=-QPjbLuDMH8AAAAA:rV5cek7HD_vvGYLSniP88S6NBjTHd0MfewKtAjDzxq7JdfZo2Ashmvn763qg2USdp5y4KbKQWvkjCYcvELFN9jcBO5A8HhTgA34yKSY

119. Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marin M, et al. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. J Biomater Sci Polym Ed [Internet]. 2003;14(5):423–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807145

120. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. Biomaterials [Internet]. 1994 Oct;15(13):1075–81. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961294900930

121. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2013 Nov;65(13–14):1803–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892192

122. Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. J Control Release [Internet]. 2002 Jan 17;78(1–3):187–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772460

123. Kumar AA, Vimal A, Kumar AA. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016 Oct;91:615–22. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016304652

124. Quitosano low molecular weight | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2024 Apr 26]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/448869

125. Yang JM, Su WY, Leu TL, Yang MC. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. J Memb Sci [Internet]. 2004 Jun 15 [cited 2023 Nov 23];236(1–2):39–51. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738804001036

126. Niranjan R, Kaushik M, Prakash J, Venkataprasanna K., Christy A, Pannerselvam B, et al. Enhanced wound healing by PVA/Chitosan/Curcumin patches: In vitro and in vivo study. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2019 Oct;182:110339. Available from:

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776519304734

127. Chopra H, Bibi S, Kumar S, Khan MS, Kumar P, Singh I. Preparation and Evaluation of Chitosan/PVA Based Hydrogel Films Loaded with Honey for Wound Healing Application. Gels (Basel, Switzerland) [Internet]. 2022 Feb 11 [cited 2024 Apr 1];8(2):111. Available from: https://www.mdpi.com/2310-2861/8/2/111/htm

128. Hajji S, Chaker A, Jridi M, Maalej H, Jellouli K, Boufi S, et al. Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. Environ Sci Pollut Res [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Apr 13];23(15):15310–20. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-6699-9

129. Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. Int J Biomater [Internet]. 2012;2012(May 26,):632698. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ijbm/2012/632698/

130. Zahran R, Rosales Leal JI, Rodríguez Valverde MA, Cabrerizo Vílchez MA. Effect of Hydrofluoric Acid Etching Time on Titanium Topography, Chemistry, Wettability, and Cell Adhesion. Zheng J, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Nov 8;11(11):e0165296. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27824875

131. Sánchez-Treviño AYY, García-Martínez O, Blasco-Avellaneda D, Rodríguez-Valverde MAA, Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, et al. Effect of the terminal group of phosphonate self-assembled films formed on Ti surfaces on the biomimetic layer formation and cell adhesion. Appl Surf Sci [Internet]. 2016 Jan 30 [cited 2022 Aug 6];362:304–14. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016943321502872X

132. Ding J, He R, Zhou G, Tang C, Yin C. Multilayered mucoadhesive hydrogel films based on thiolated hyaluronic acid and polyvinylalcohol for insulin delivery. Acta Biomater [Internet]. 2012 Oct;8(10):3643–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743112

133. Salehi S, Boddohi S. New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate. Prog Biomater [Internet]. 2017 Dec 6;6(4):175–87. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s40204-017-0077-7

134. Hao J. Effect of surface roughness on droplet splashing. Phys Fluids [Internet]. 2017;29(12):122105. Available from:

https://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/1.5005990

135. Shu XZ, Zhu KJ. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2021 Feb 4];54(2):235–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191697

136. Pistone S, Goycoolea FM, Young A, Smistad G, Hiorth M. Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2017 Jan 1;96:381–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098716304353

137. Calvo P, Remuñan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Polym Sci [Internet]. 1997 Jan 3;63(1):125–32. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1%3C125::AID-APP13%3E3.0.CO;2-4

138. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. Pharm Res [Internet]. 1997 Oct [cited 2024 Apr 7];14(10):1431–6. Available from: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1012128907225

139. Hoang NH, Le Thanh T, Sangpueak R, Treekoon J, Saengchan C, Thepbandit W, et al. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. Polymers (Basel) [Internet]. 2022 Feb 9 [cited 2024 Apr 5];14(4):662. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4360/14/4/662/htm

140. Vieira ACCC, Chaves LL, Pinheiro S, Pinto S, Pinheiro M, Lima SC, et al. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. Int J Pharm [Internet]. 2018 Jan 30 [cited 2021 Mar 17];536(1):478–85. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317311262

141. Usta SN, Solana C, Ruiz-Linares M, Baca P, Ferrer-Luque CM, Cabeo M, et al. Effectiveness of conservative instrumentation in root canal disinfection. Clin Oral Investig [Internet]. 2023 Jun 3 [cited 2023 Apr 3];27(6):3181–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36867258

142. Farrugia C, Lung CYKK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. J Endod [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 May 18];44(7):1115–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29861063

143. Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2009 Mar [cited 2023 May 18];75(6):1734–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19139239/

144. Pawlik A, Jarosz M, Socha RP, Sulka GD. The Impacts of Crystalline Structure and Different Surface Functional Groups on Drug Release and the Osseointegration Process of Nanostructured TiO(2). Molecules [Internet]. 2021 Mar 19 [cited 2021 May 17];26(6):1723. Available from: https://doi.org/10.3390/molecules26061723

145. Young Kim S, Kyoung Kim Y, Song Park I, Chun Jin G, Sung Bae T, Ho Lee M. Effect of alkali and heat treatments for bioactivity of TiO 2 nanotubes. Appl Surf Sci [Internet]. 2014 [cited 2023 Sep 22];321:412–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.177

146. Anselme K, Ploux L, Ponche A. Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. J Adhes Sci Technol [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2023 Sep 22];24(5):831–52. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/016942409X12598231568186

147. Bozzini B, Barca A, Bogani F, Boniardi M, Carlino P, Mele C, et al. Electrodeposition of nanostructured bioactive hydroxyapatite-heparin composite coatings on titanium for dental implant applications. J Mater Sci Mater Med [Internet]. 2014;25(6):1425–34. Available from: https://doi.org/10.1007/s10856-014-5186-4

148. Avés EP, Estévez GF, Sader MS, Sierra JCG, Yurell JCL, Bastos IN, et al. Hydroxyapatite coating by sol–gel on Ti–6Al–4V alloy as drug carrier. J Mater Sci Mater Med [Internet]. 2009 Feb 18;20(2):543–7. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3609-9

149. Yang CC, Lin CC, Liao JW, Yen SK. Vancomycin-chitosan composite deposited on post porous hydroxyapatite coated Ti6Al4V implant for drug controlled release. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl [Internet]. 2013 May 1;33(4):2203–12. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113000519

150. Zhao DM, Wang YX, Chen ZY, Xu RW, Wu G, Yu DS. Preparation and

characterization of modified hydroxyapatite particles by heparin. Biomed Mater [Internet]. 2008 Jun 3 [cited 2024 Apr 9];3(2):025016. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523341

151. Sun F, Pang X, Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite–chitosan–heparin coatings. J Mater Process Technol [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2024 Apr 9];209(3):1597–606. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924013608003312

152. Yao C, Webster TJ. Prolonged antibiotic delivery from anodized nanotubular titanium using a co-precipitation drug loading method. J Biomed Mater Res B Appl Biomater [Internet]. 2009 Nov;91(2):587–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582847

153. Song F, Koo H, Ren D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. J Dent Res [Internet]. 2015 Aug;94(8):1027–34. Available from: https://doi.org/10.1177/0022034515587690

154. Cerchiara T, Abruzzo A, Ñahui Palomino RA, Vitali B, De Rose R, Chidichimo G, et al. Spanish Broom (Spartium junceum L.) fibers impregnated with vancomycin-loaded chitosan nanoparticles as new antibacterial wound dressing: Preparation, characterization and antibacterial activity. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Mar 16];99:105–12. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098716305218

155. Azizian S, Hadjizadeh A, Niknejad H. Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with Chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering. Carbohydr Polym [Internet]. 2018 Dec 15;202:315–22. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718308142

156. Dhawan S, Singla AK, Sinha VR. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2004 Jul 26 [cited 2024 Apr 10];5(4):e67. Available from: https://link.springer.com/article/10.1208/pt050467

157. Liang YQ, Cui ZD, Zhu SL, Yang XJ. Characterization of self-organized TiO2 nanotubes on Ti-4Zr-22Nb-2Sn alloys and the application in drug delivery system. J Mater Sci Mater Med [Internet]. 2011 Mar;22(3):461–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287247

158. Zuluaga M, Gregnanin G, Cencetti C, Di Meo C, Gueguen V, Letourneur D, et al.

PVA/Dextran hydrogel patches as delivery system of antioxidant astaxanthin: a cardiovascular approach. Biomed Mater [Internet]. 2017 Dec 28 [cited 2023 Nov 22];13(1):015020. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28875946/

159. Al-Sahaf Z, Raimi-Abraham B, Licciardi M, de Mohac LM. Influence of Polyvinyl Alcohol (PVA) on PVA-Poly-N-hydroxyethyl-aspartamide (PVA-PHEA) Microcrystalline Solid Dispersion Films. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 May 20];21(7):267. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33006710

160. Sundblom J, Gallinetti S, Birgersson U, Engqvist H, Kihlström L. Gentamicin loading of calcium phosphate implants: implications for cranioplasty. Acta Neurochir (Wien) [Internet]. 2019 Jun;161(6):1255–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31041594

161. Jose B, Antoci V, Zeiger AR, Wickstrom E, Hickok NJ. Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills Staphylococcus aureus. Chem Biol [Internet]. 2005 Sep [cited 2024 Apr 10];12(9):1041–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183028

162. Yang S, Yang Y, Cui S, Feng Z, Du Y, Song Z, et al. Chitosan-polyvinyl alcohol nanoscale liquid film-forming system facilitates MRSA-infected wound healing by enhancing antibacterial and antibiofilm properties. Int J Nanomedicine [Internet]. 2018;13:4987–5002. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6128272/

163. Huang Y, Mei L, Chen X, Wang Q. Recent Developments in Food Packaging Based on Nanomaterials. Nanomater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2018 Oct 13 [cited 2024 Apr 11];8(10):830. Available from: https://www.mdpi.com/2079-4991/8/10/830/htm

164. Gultepe E, Nagesha D, Sridhar S, Amiji M. Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2010 Mar 8;62(3):305–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922749

165. Yang D, Li Y, Nie J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. Carbohydr Polym [Internet]. 2007 Jun;69(3):538–43. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861707000483

166. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 11]. Resistencia a los antimicrobianos. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

167. Vardanyan RS, Hruby VJ. Antibiotics. Synth Essent Drugs [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2023 Mar 3];425–98. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521668500327

168. Camilleri J, Arias Moliz T, Bettencourt A, Costa J, Martins F, Rabadijeva D, et al. Standardization of antimicrobial testing of dental devices. Dent Mater [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Apr 3];36(3):e59–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31928776

169. Boutsioukis C, Arias-Moliz MT, Chávez de Paz LE. A critical analysis of research methods and experimental models to study irrigants and irrigation systems. Int Endod J [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Apr 3];55(S2):295–329. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13710

170. Ruiz-Linares M, Solana C, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Antibiofilm potential over time of a tricalcium silicate material and its association with sodium diclofenac. Clin Oral Investig [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Apr 3];26(3):2661–9. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-04237-4

171. Kreve S, Reis ACD Dos. Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. Jpn Dent Sci Rev [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 Mar 22];57:85–96. Available from: /pmc/articles/PMC8215285/

172. Zhou Z, Hu F, Hu S, Kong M, Feng C, Liu Y, et al. pH-Activated nanoparticles with targeting for the treatment of oral plaque biofilm. J Mater Chem B [Internet]. 2018 Jan 28 [cited 2023 Mar 2];6(4):586–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32254487

173. Mohamed MA, Nasr M, Elkhatib WF, Eltayeb WN, Elshamy AA, El-Sayyad GS. Nanobiotic formulations as promising advances for combating MRSA resistance: susceptibilities and post-antibiotic effects of clindamycin, doxycycline, and linezolid. RSC Adv [Internet]. 2021 Dec 12 [cited 2023 Apr 14];11(63):39696–706. Available from: /pmc/articles/PMC9044563/

174. Scholar E. Doxycycline. In: Enna SJ, Bylund DBBT xPharm: TCPR, editors. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference [Internet]. New York: Elsevier; 2007 [cited 2023 Mar 3]. p. 1–8. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080552323616514

175. Laffleur F, Zilio M, Shuwisitkul D. Modified biomolecule as potential vehicle for buccal delivery of doxepin. Ther Deliv [Internet]. 2016 Oct;7(10):683–9. Available from: https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/tde-2016-0046

176. Sanz R, Calpena AC, Mallandrich M, Gimeno Á, Halbaut L, Clares B. Development of a buccal doxepin platform for pain in oral mucositis derived from head and neck cancer treatment. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 May 3];117:203–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438551

177. Leenstra JL, Miller RC, Qin R, Martenson JA, Dornfeld KJ, Bearden JD, et al. Doxepin rinse versus placebo in the treatment of acute oral mucositis pain in patients receiving head and neck radiotherapy with or without chemotherapy: a phase III, randomized, double-blind trial (NCCTG-N09C6 [Alliance]). J Clin Oncol [Internet]. 2014/04/14. 2014 May 20;32(15):1571–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733799

178. Epstein JB, Truelove EL, Oien H, Allison C, Le ND, Epstein MS. Oral topical doxepin rinse: analgesic effect in patients with oral mucosal pain due to cancer or cancer therapy. Oral Oncol [Internet]. 2001 Dec;37(8):632–7. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837501000057

179. Macedo D, Filho AJMC, Soares de Sousa CN, Quevedo J, Barichello T, Júnior HVN, et al. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. J Affect Disord [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2023 Feb 24];208:22–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744123

180. Caldara M, Marmiroli N. Tricyclic antidepressants inhibit Candida albicans growth and biofilm formation. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Feb 24];52(4):500–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29990546

181. Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, Garcìa-Rodrìguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2000 Apr [cited 2023 Mar 1];14(3):177–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773485

182. Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug

interactions updated. Br J Pharmacol [Internet]. 2007 Jul 7 [cited 2023 May 8];151(6):737. Available from: /pmc/articles/PMC2014120/

183. Schneider J, Patterson M, Jimenez XF. Beyond depression: Other uses for tricyclic antidepressants. Cleve Clin J Med [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 May 8];86(12):807–14. Available from: https://www.ccjm.org/content/86/12/807

184. Mandal A, Sinha C, Kumar Jena A, Ghosh S, Samanta A. An Investigation on in vitro and in vivo Antimicrobial Properties of the Antidepressant: Amitriptyline Hydrochloride. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 May 3];41(3):635–45. Available from: /pmc/articles/PMC3768647/

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD
DE GRANADA