

Universidad Nacional de Ingeniería

Facultad de Ciencias



TESIS

“Liberación de amoxicilina desde esponjas de compósito de colágeno/alcohol polivinílico, conteniendo nanopartículas de óxido de zinc funcionalizadas con ácido húmico”

Para obtener el grado de licenciado en ciencias con mención en Química.

Elaborado por

Bach. Henry Linares Paisig

 [0000-0001-6517-4122](https://orcid.org/0000-0001-6517-4122)

Asesor

MSc. Carlos Salazar Max Jorge

 [0000-0001-6102-4485](https://orcid.org/0000-0001-6102-4485)

LIMA – PERÚ

2023

Citar como:	Linares Paisig [1]
Referencia	[1] H. Linares Paisig, “Liberación de amoxicilina desde esponjas de compósito de colágeno/alcohol polivinílico, conteniendo nanopartículas de óxido de zinc funcionalizadas con ácido húmico” [Tesis de licenciatura]. Lima (Perú): Universidad Nacional de Ingeniería, 2023.
Estilo IEEE	

Citar como:	(Linares, 2023)
Referencia	Linares H. (2023). Liberación de amoxicilina desde esponjas de compósito de colágeno/alcohol polivinílico, conteniendo nanopartículas de óxido de zinc funcionalizadas con ácido húmico. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio institucional UNI.
Estilo APA (7ma ed.)	

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres (Abelino Linares y María Paisig) y hermanos por su incondicional soporte y paciencia durante esta etapa de mi formación profesional, ya que sin ellos no estaría alcanzando todos los objetivos propuestos. Especialmente, a mi madre por su amor incondicional y por todos los consejos diarios a seguir persistente en mis metas. También dedico, este trabajo a mis abuelitas Eleuteria Torres y Hermila Llamo que, aunque ya no estén entre nosotros son mi motivación para nunca desistir en mi camino y seguir creciendo profesionalmente.

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios por brindarme día a día buena salud, sabiduría y la fortaleza para enfrentar los desafíos durante la realización del presente trabajo. Así mismo a mi asesor, profesor MSc. Carlos Salazar Max Jorge, por toda la crítica, dedicación, paciencia y la orientación brindada a mi persona, que sin ello no sería posible esta tesis. Así mismo, también agradezco a la profesora Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón por aceptarme a formar parte de un grandioso grupo como es el laboratorio de investigación en biopolímeros y metalofármacos (LIBIPMET) de la facultad de ciencias. Por otro lado, a los laboratorios de investigación en electroquímica aplicada (GIEA, por el análisis RAMAN), en fisicoquímica y nanotecnología (LABINFIS, por los datos DSC, FTIR y DRX), al centro para el desarrollo de materiales avanzados y nanotecnología (CEMAT, por los análisis SEM) y al grupo de investigación en síntesis de materiales avanzados (GISMA, por los datos DLS); así mismo, a la unidad de investigación de la facultad de ciencias y al vicerrectorado de investigación por el financiamiento brindado. Finalmente, a mis compañeros del grupo de LIBIPMET y amigos que de una u otra manera contribuyeron a lo largo del proceso para la culminación del presente trabajo.

“Estoy agradecido con todos aquellos que me dijeron no, porque gracias a ellos estoy siendo yo mismo y logrando todas mis metas en la vida”.

Albert Einstein

Resumen

Los sistemas de liberación modificada basados en biopolímeros y/o nanopartículas de metales bioactivos, han sido de mucho interés durante décadas y ampliamente usados; esto, debido a que facilitan un mejor efecto terapéutico y menores efectos toxicológicos que los convencionales. En el presente trabajo, se desarrolló una matriz basada en dos sistemas como un solo compósito como sistema de liberación para la amoxicilina (AMX): el primero basado en nanopartículas de ZnO funcionalizadas con ácido húmico (HA) y la segunda en una esponja basada en colágeno tipo I (HCG) y polivinil alcohol (PVA). La metodología estuvo enfocada en la síntesis de las nanopartículas (Nps) de ZnO mediante método sol-gel, seguido de la modificación superficial con ácido húmico (HA) mediante ultrasonicación-agitación. Por otra parte, la extracción del colágeno aniónico desde el tendón de bovino a través de hidrólisis alcalina. Finalmente, la incorporación del sistema nanoparticulado en la matriz polimérica para la posterior preparación de los compósitos híbridos mediante proceso de liofilización. Las nanopartículas (ZnO, ZnO-HA), HA, HCG, PVA, AMX y compósitos híbridos fueron caracterizados usando diferentes técnicas, tales como: FTIR, DRX, Raman, SEM, DLS, DSC, peso molecular por viscosimetría, grado de hinchamiento y porosidad. Así mismo, los estudios de liberación de la AMX fueron realizados mediante técnica espectroscópica UV-Visible. Los resultados mostraron que, las Nps de ZnO y ZnO-HA presentaron un tamaño de cristal en el rango de 30-39 nm y un diámetro hidrodinámico medio entre 92-130 nm. Por otra parte, el colágeno exhibió un peso molecular medio de ~369 kDa y una T_D de 58.8 °C. Los compósitos híbridos como sistema portador de AMX, exhibieron un buen desempeño, con perfiles de liberación de una eficacia media entre al 90-94 % durante el tiempo de estudio.

Palabras clave: Esponja, compósito, nanopartículas de ZnO, colágeno, liberación.

Abstract

Modified delivery systems based on biopolymers and/or bioactive metals nanoparticles, have been of great interest for decades and are widely used. This, due to they provide a better therapeutic effect and fewer toxicological effects than conventional ones. In the present work, a matrix based on two systems was developed as a single composite as a delivery system for amoxicillin (AMX): the first, based on ZnO nanoparticles functionalized with humic acid (HA) and the second on a sponge based on type I collagen (HCG) and polyvinyl alcohol (PVA). The methodology was focused on the synthesis of ZnO nanoparticles (Nps) by sol-gel method, followed by the surface modification with humic acid (HA) through ultrasonication-agitation. On the other hand, the extraction of anionic collagen from the bovine tendon was carried out through alkaline hydrolysis. Finally, the incorporation of the nanoparticulate system in the polymeric matrix for the subsequent preparation of the hybrid composites through the lyophilization process. Nps (ZnO, ZnO-HA), HA, HCG, PVA, AMX and composites were characterized using different techniques, such as FTIR, DRX, Raman, SEM, DLS, DSC, the molecular weight by viscometry, the swelling degree and porosity. Moreover, the AMX release studies were carried out using the UV-Visible spectroscopic technique. The results showed that, the Nps of ZnO and ZnO-HA presented a crystal size in the range of 30-39 nm and an average hydrodynamic diameter between 92-130 nm. Otherwise, collagen exhibited an average molecular weight of ~369 kDa and a T_D of 58.8 °C. Composites were examined as an AMX carrier system, exhibiting a great performance, with release profiles of an average efficacy between 90-94%, throughout the study time.

Key words: Sponge, composite, ZnO nanoparticles, collagen, delivery.

Tabla de contenido

Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Prólogo.....	xvi
Capítulo I. Introducción.....	1
1.1. Descripción del problema.....	3
1.2. Estado del arte.....	4
1.3. Justificación.....	9
1.4. Hipótesis.....	11
1.5. Objetivos.....	12
1.5.1. Objetivo general.....	12
1.5.2. Objetivos específicos.....	12
Capítulo II. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Sistema de liberación modificada.....	13
2.1.1. Clases de FFLM.....	15
2.2. Biomateriales.....	20
2.2.2. Cerámicos.....	21
2.2.3. Polímeros.....	22
2.2.3.1. Polímeros sintéticos.....	23
2.2.3.2. Polímeros naturales.....	24
2.2.4. Metales.....	24
2.3. Nanopartículas.....	25
2.4. Nanopartículas de óxido de zinc.....	27
2.5. Colágeno.....	28
2.6. Alcohol polivinílico.....	32
2.7. Ácido húmico.....	34
2.8. Esponjas poliméricas.....	35
2.9. Amoxicilina.....	36
Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación.....	39
3.1. Materiales.....	39
3.1.1. Reactivos.....	39

3.1.2.	Equipos	39
3.2.	Procedimiento Experimental	40
3.2.1.	Síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc	40
3.2.2.	Funcionalización de las nanopartículas de ZnO	41
3.2.2.1.	Eficiencia de funcionalización de las Nps de ZnO.....	41
3.2.3.	Cargado de la amoxicilina en las nanopartículas de ZnO-HA.....	42
3.2.3.1.	Eficiencia de cargado de la amoxicilina en las Nps de ZnO-HA.....	43
3.2.4.	Obtención de colágeno aniónico Tipo I.....	44
3.2.5.	Preparación de las matrices híbridas.....	46
3.2.6.	Caracterizaciones	48
3.2.6.1.	Espectroscopía Infrarroja.....	48
3.2.6.2.	Calorimetría diferencial de barrido.....	48
3.2.6.3.	Microscopía electrónica de barrido	48
3.2.6.4.	Dispersión dinámica de la luz.....	49
3.2.6.5.	Difracción de rayos X.....	49
3.2.6.6.	Raman.....	49
3.2.6.7.	Masa molar viscosimétrica	50
3.2.6.8.	Capacidad de absorción en agua o grado de hinchamiento	50
3.2.6.9.	Porosidad	50
3.2.7.	Estudio de la liberación del fármaco desde la matriz compósito.....	51
3.2.7.1.	Curva de calibración de la amoxicilina	51
3.2.7.2.	Liberación de la AMX desde las matrices híbridas	52
Capítulo IV.	Análisis y discusión de resultados	53
4.1.	Nanopartículas.....	53
4.1.1.	Síntesis y modificación	53
4.1.2.	Espectroscopía infrarroja	55
4.1.3.	DRX y RAMAN	58
4.1.4.	Análisis DLS.....	61
4.1.5.	Análisis SEM	62
4.2.	Colágeno.....	64
4.2.1.	Obtención.....	64
4.2.2.	Espectroscopía infrarroja	65

4.2.3.	Masa molar viscosimétrica	66
4.2.4.	Análisis de calorimetría diferencial de barrido	67
4.3.	Matrices compuestas	69
4.3.1.	Preparación	69
4.3.2.	Espectroscopía infrarroja	72
4.3.3.	Grado de hinchamiento y Porosidad.....	73
4.3.4.	Análisis SEM	75
4.4.	Análisis de la liberación <i>in - vitro</i>	77
	Conclusiones.....	80
	Recomendaciones	81
	Referencias bibliográficas.....	82
	Anexos	1

Lista de figuras

Figura 1 Perfil de administración de un fármaco en dosis múltiple versus tiempo.-----	14
Figura 2 Perfil de concentración de un fármaco vs tiempo, según tipo de liberación.-----	17
Figura 3 Mecanismos de liberación para diferentes sistemas de administración de fármacos. -----	19
Figura 4 Estructura química tridimensional del colágeno y de los principales aminoácidos.	31
Figura 5 Estructura química del PVA. -----	33
Figura 6 Estructura química de la amoxicilina. -----	37
Figura 7 Proceso de síntesis de las nanopartículas de ZnO.-----	40
Figura 8 Proceso de funcionalización de las Nps de ZnO. -----	41
Figura 9 Cargado de la amoxicilina en las Nps de ZnO-HA. -----	43
Figura 10 Proceso de obtención de colágeno aniónico tipo I.-----	45
Figura 11 <i>Proceso de preparación de las matrices en forma de esponja</i> -----	47
Figura 12 a) Equipo de sistema de liberación (shaker y Schiller), b) chaqueta, c) Bolsita para matriz y d) características físicas de la matriz. -----	52
Figura 13 Espectros FTIR del HA, ZnO, ZnO-HA, ZnO-HA/AMX y AMX.-----	57
Figura 14 Esquema representativo de la funcionalización de las Nps de ZnO y cargado de la AMX.-----	58
Figura 15 Patrones DRX de las Nps de ZnO, ZnO-HA y el patrón estándar. -----	59
Figura 16 Espectro RAMAN de las Nps de ZnO y ZnO-HA -----	61
Figura 17 DLS de las Nps de ZnO y ZnO-HA. -----	62
Figura 18 Microgramas SEM e imágenes de: a), b) de ZnO y c), d) de ZnO-HA -----	63
Figura 19 Espectro FTIR del colágeno aniónico tipo I (HCG).-----	65
Figura 20 Curva de peso molecular viscosimétrico en función a concentración vs viscosidad. -----	66
Figura 21 a) DSC y b) proceso de desnaturalización del colágeno.-----	68
Figura 22 Esquema representativo de la preparación de la matriz híbrida M5. -----	70

Figura 23 Espectros FTIR del PVA, HCG, M1, M2, AMX, M3, M4 y M5. -----	73
Figura 24 a) Grado de hinchamiento y b) Porosidad.-----	75
Figura 25 Microgramas SEM de las esponjas a diferentes magnificaciones: a) x300 y b) x1.0k de M1(HCG/PVA); c) x400, d) x1.5k de M2 (HCG/PVA/ZnO-HA) y e) x300, f) x0.5k de M5(HCG/PVA ZnO-HA/AMX).-----	76
Figura 26 Perfil de liberación de la AMX en a) M3 y M4, b) M5 y M6.-----	79

Lista de tablas

Tabla 1 :Liberación de fármacos según los tipos de FFLM y características. -----	18
Tabla 2 :Características de los tipos de colágeno, formas y distribución-----	29
Tabla 3 :Especificaciones consideradas para la preparación de las matrices en forma de esponja -----	46
Tabla 4 :Parámetros de preparación para la curva de calibración de la AMX-----	51

Abreviaturas

AMX	Amoxicilina
APA	Ácido aminopenicilínico
ASTM	Sociedad americana de Pruebas y Materiales
ATR	Reflexión total atenuada
C _p	Concentración plasmática
CGT	Congelamiento
DEX	Dexametasona
DGT	Descongelamiento
DLS	Dynamic light scattering (Dispersión dinámica de la luz)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EAF	Estructuras de administración de fármacos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EEC	Eficiencia de cargado
EEF	Eficiencia de funcionalización
ELE	Eucalyptus globulus
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FFLM	Formas farmacéuticas de liberación modificada
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier
Gly	Glicina
HA	Ácido húmico
HAC	Ácido acético
HAP	Hidroxiapatita
HCG	Colágeno hidrolizado o colágeno aniônico
HDR	Hidrogel de doble red
HLB	Balance hidrofílico – lipofílico
HRS	Hidrogel de red simple

IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEC	Concentración mínima efectiva
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MTC	Concentración mínima toxica
Nps	Nanopartículas
OG	Oxido de grafeno
O/W	Aceite-agua (oil/wáter)
PBPs	Proteínas de unión a la penicilina
PBS	Solución buffer de fosfato
PEG	Polietilenglicol
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Poliácido láctico
PVA	Alcohol polivinílico o Polivinil Alcohol
PVAc	Polivinilo de Acetato
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TB	Tendón de bobino
T _D	Temperatura de desnaturalización
UV	Ultravioleta

Prólogo

El presente trabajo, tesis para obtener el grado de licenciatura, titulado: “Liberación de amoxicilina desde esponjas de compósito de colágeno/alcohol polivinílico, conteniendo nanopartículas de óxido de zinc funcionalizadas con ácido húmico”, fue desarrollado con la motivación de hacer un aporte a la investigación científica del Perú y especialmente, en agradecimiento a la Universidad Nacional de Ingeniería y a la Facultad de Ciencias; la cual, me cobijó y orientó al mundo de la ciencia, brindándome todo lo necesario para mi educación profesional.

En la presente investigación, se aborda el desarrollo de una matriz compuesta por dos sistemas simples como un posible portador de AMX: una basada en colágeno / PVA y otra inorgánica referente a Nps de ZnO modificadas con HA. Para ello, el trabajo ha sido dividido en 8 partes: La primera, consta de una crítica revisión bibliográfica sobre sistemas de liberación de fármacos, la problemática relacionada al uso de la AMX y otros biomateriales; además de los antecedentes, las razones principales de la investigación, la hipótesis y los objetivos generales y específicos del trabajo. En la segunda parte, se presentan los principales conceptos teóricos asociados al trabajo, tales como definiciones respecto a FFLM, biomateriales (propiedades y aplicaciones), entre otros. En la tercera parte, se aborda detalladamente los materiales, métodos experimentales y las técnicas de caracterización utilizadas durante la ejecución del trabajo.

En la cuarta parte, se analizan y discuten los resultados obtenidos tanto de la síntesis de Nps de ZnO y su modificación superficial con HA; además, de la obtención de colágeno aniónico tipo I, la preparación de las matrices compuestas y los perfiles cinéticos de liberación de la AMX desde estas matrices. En la quinta parte, se hace una conclusión sobre los principales resultados obtenidos y discutidos. En la sexta parte, se presentan algunas sugerencias o recomendaciones a tomar en cuenta en posibles trabajos relacionados con la presente investigación. Posteriormente, en la séptima parte se exhibe la recopilación bibliográfica de todos los artículos y libros utilizados como bases para el desarrollo del presente trabajo. Finalmente, en la octava parte, se muestran una serie de anexos con información complementaria, comentadas a lo largo de la tesis.

Capítulo I. Introducción

En las últimas décadas, se ha desarrollado un creciente y notorio interés en el uso de diferentes biomateriales, puesto que estos han reportado poseer excelentes propiedades biocompatibles, baja toxicidad e incluso propiedades antifúngicas (Festas et al., 2019). Estos materiales han ganado tanta relevancia que hoy en día han abierto un nuevo horizonte en áreas como la industria alimentaria, la industria textil, la industria farmacéutica, entre otras (Vasif Hasirci, 2018). De hecho, debido a los nuevos avances tecnológicos y a la búsqueda por mejorar el cuidado de la salud humana, estos han obtenido mayor relevancia en diversas áreas de la medicina, ya sea como sustitutos en implantes de ciertas áreas u órganos dañados del cuerpo, o como materiales adecuados para el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos o algún agente bioactivo (Radulescu et al., 2022). Es dentro de este campo farmacéutico, donde se sigue buscando potenciar su utilidad, ya que estos sistemas han mostrado mejorar la farmacocinética mediante el control de los niveles de liberación y absorción de un fármaco (Jacob et al., 2018).

Sistemas o formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM) basados en biomateriales tales como nanocargadores, esponjas, scaffolds, entre otros (Basel et al., 2020); han resultado ser uno de los métodos más beneficiosos para la mejora posológica de un fármaco. Esto debido a que alteran factores como la farmacocinética, metabolismo, excreción, toxicidad, entre otros. Por otro lado, se han realizado considerables esfuerzos por implementar estos tipos de sistemas, debido a las barreras biológicas que limitan la liberación efectiva del principio activo. Esencialmente porque muestran una mejor eficacia en la liberación de una variedad de compuestos farmacéuticos como anticuerpos, enzimas, vacunas, fármacos, entre otros (Fenton et al., 2018).

Dentro de los diferentes biomateriales que se usan en la actualidad para el diseño de FFLM, los polímeros de origen natural tales como el quitosano, alginato y en especial el colágeno, son los que han obtenido una mayor atención sobre sus análogos, los sintéticos. Esto gracias a que exhiben excelentes propiedades biodegradables, baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad, actividad antibacteriana, entre otras (Jacob et al., 2018).

Por otro lado, también existe un gran interés en los compósitos poliméricos, así como las nanopartículas de metales bioactivos como el cobre, zinc, entre otros (Deepali and Karan, 2018); especialmente por la alta área superficial que poseen y la facilidad que permiten para ser incorporados en sustratos poliméricos como FFLM. Además, estas incorporaciones inorgánicas pueden conducir a un mejor desempeño en las propiedades mecánicas, físicas y químicas; así como también de las estructurales, hinchamiento, entre otras de las matrices a base estos materiales (Hezma et al., 2019).

Considerando lo mencionado, en el presente trabajo se abordará el desarrollo de una matriz híbrida en forma de esponja. Para lo cual, se usará colágeno aniónico en gel y polivinil alcohol (PVA) como base de la matriz polimérica híbrida. Además, se incorporará nanopartículas de ZnO funcionalizadas con HA, sobre las cuales será cargado el fármaco penicilínico, amoxicilina. Posteriormente, se evaluará la liberación para mostrar si es posible el uso de la matriz híbrida y si mantiene un mejor control farmacocinético de la amoxicilina en el tiempo.

1.1. Descripción del problema

La administración de fármacos penicilínicos como la amoxicilina, antibiótico bactericida, suele ser utilizado especialmente en el tratamiento y prevención de ciertas infecciones gastrointestinales, de la piel, respiratorias como la neumonía, entre otras (Alazzawi et al., 2021). Sin embargo, estos tipos de antibióticos están limitados a ciertos tratamientos médicos para terapias contra patógenos como la *V. cholerae*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, entre otras (Gowri et al., 2020; John E. Bennett, 2020); esto debido a que β -lactamasas o penicilinasas bacterianas como estas, inactivan completamente esta clase de fármacos, mediante la ruptura del enlace amida en el anillo β -lactámico. Así mismo, esta ineficaz actividad farmacológica ocurre esencialmente cuando son suministrados de forma convencional o como principio activo químicamente puro (Thambavita et al., 2017), motivo por el cual se suele suministrar en combinación con algún inhibidor de β -lactamasas como el ácido clavulánico o algún otro fármaco (Burch and Sperling, 2018). Por otro lado, debido a las formas de dosificación periódica (en general cada 8 o 12 h y en dosis triple o doble de entre 250 mg-1g, dependiendo de la infección a tratar), estos antibióticos a menudo causan efectos secundarios como enrojecimiento de piel, cólicos y a veces contraindicaciones muy severas como la anafilaxis (John E. Bennett, 2020). Consecuentemente, estas contraindicaciones se suelen producir principalmente debido a la ausencia de un buen control cinético en la liberación del principio activo (Akhilesh Kumar et al., 2020).

La efectividad en la administración de un fármaco ya sea vía oral, subcutánea, superficial, entre otras, es de gran importancia y existen para ello diferentes sistemas a base de biomateriales como los cerámicos, polímeros o nanopartículas a base de óxidos metálicos, que se suelen utilizar (Naidu et al., 2021). Sin embargo, muchos de ellos a veces llegan a conferir una carga adicional de toxicidad al organismo o bajos niveles terapéuticos. Mas aún, si el principio farmacológicamente activo no es lo adecuadamente eficiente para alcanzar su lugar objetivo (Fenton et al., 2018). En consecuencia, es preciso diseñar una matriz más adecuada que sirva como vehículo portador y sistema de liberación de la AMX, de tal forma que al utilizarlo permita aprovechar sus propiedades y características únicas que faciliten una mejor efectividad farmacológica y consecuentemente una reducción en las contraindicaciones secundarias. Por tanto, ¿será posible diseñar la matriz que sirva como vehículo portador de AMX y con una alta eficiencia de cargado? ¿La matriz será capaz de sostener una liberación prolongada en el tiempo y superior a las 12 h, con una alta efectividad de salida del fármaco?

1.2. Estado del arte

Durante los últimos años, se han reportado una variedad de investigaciones que buscan un método más adecuado y efectivo que facilite administrar un fármaco, metabolito o cualquier sustancia con alguna actividad biológica. Dentro de esa búsqueda, son las diferentes formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM); los cuales son diseñadas esencialmente a base de una gran variedad de biomateriales tales como metales, cerámicos o polímeros de origen natural y/o sintético (Troy et al., 2021). Dentro de estas nuevas FFLM se encuentran una variedad de matrices tales como los films, scaffolds, esponjas, nanopartículas poliméricas y/o metálicas, entre muchas otras, que según Fenton (2018) han ido evolucionando con el pasar de los años; dado a que se han encontrado nuevas rutas de preparación y formulación como sistemas portadores de fármacos. De hecho, se han traducido en sistemas de liberación que son clínicamente comercializadas con agentes activos, tales como la encapsulación de hormonas o fármacos que pueden ser administradas a través de la ruta oral, subcutánea, pulmonar, entre otras.

Según Furtado et al. (2022), diferentes matrices (film, esponjas, etc.) basadas en colágeno, han reportado gran facilidad para absorber exudantes de heridas y como sistemas de liberación, vehículos con grandes capacidades para la administración en la terapia con fármacos individuales, liberación controlada, sostenida, entre otras. Así mismo, como matriz en forma de film han sido probadas con la ampicilina y tetraciclina como fármacos antibacteriales y antifúngicos. No obstante, también han sido usadas como sistemas para la regeneración de tejidos, en la sanación de heridas con la incorporación y liberación de clorhidrato de L-cisteína tanto en films como en esponjas. Por otra parte, Di Martino et al. (2019) sostiene que, sistemas como films basados en mezclas de colágeno-quitosano pueden representar una atractiva alternativa a la administración local de anestésicos individuales o combinados. Así mismo, que la matriz polimérica basada en esta mezcla experimente mejores propiedades fisicoquímicas tales como el hinchamiento y propiedades mecánicas. Además, que el cargado de anestésicos como la lidocaína, benzocaína y tetracaína no influye en el grado de hinchamiento ya que su liberación se da mediante la difusión desde el sistema hacia el medio y en un tiempo más amplio, superior a las 24 h.

Por otro lado, alcanzar una alta capacidad de cargado y una eficaz liberación farmacológica sostenida en el tiempo, no es tan sencillo y como se ha visto en varios trabajos revisados, existen varias FFLM. Dentro de esa exploración, Duan et al. (2017), menciona que las estructuras macroporosas tales como scaffolds y/o esponjas se presentan como una de las

mejores alternativas, sobre todo por el alto volumen de poro, la alta área superficial y la excelente porosidad. Esto debido a que son factores que facilitan un alto cargado de activos farmacológicos y otros materiales como nanopartículas orgánicas e inorgánicas con prominentes propiedades bioactivas. De acuerdo con Wells et al. (2018), sostienen que las estructuras porosas como esponjas a base de quitosano son buenos sistemas de liberación local para fármacos, especialmente para el tratamiento de infecciones bacteriales. Así mismo, estas matrices porosas también facilitan la liberación simultánea de dos fármacos combinados tales como la ciprofloxacina y rifampicina que mostraron buena actividad inhibitoria *in -vitro* a la proliferación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Además, argumentan que estos sistemas con fármacos antibacteriales pueden ser una alternativa potencial al tratamiento de infecciones en heridas quirúrgicas o traumas muscoesqueléticas de origen militar. Según Alagha et al. (2020), quienes diseñaron una bio-esponja a base de quitosano/colágeno tipo I con el fin de evaluar la liberación de la dexametasona (DEX), reportaron que la matriz presenta una mejor farmacocinética sostenible en el tiempo (10 h) en comparación a sistemas simples de solo colágeno (5 h), en el cual la liberación de la dexametasona fue mucho más rápida. Así mismo, debido a las propiedades adhesivas o a la diferenciación celular del colágeno y mucoadhesivas del quitosano, sostienen que esta bio-esponja compuesta sería una buena alternativa al tratamiento de la mucosa oral ulcerada.

Dentro de las FFLM, también se encuentran sistemas a base de nanocargadores, sobre todo aquellos de buena biocompatibilidad, que según Chamundeeswari et al. (2018) pueden transportar un fármaco hacia el sitio objetivo y mantener un mayor periodo de circulación a través de una liberación sostenida. Sin embargo, aunque existe una gran variedad, no todos son capaces de transportar un fármaco. Entre nanocargadores orgánicos e inorgánicos, los orgánicos presentan una mayor variedad y utilidad; sobre todo porque son más variados y de menor toxicidad, además tienen la habilidad de conjugar una gran variedad de agentes activos. Por otro lado, los nanoportadores inorgánicos en comparación con los anteriores, están limitados a unos cuantos metales bioactivos y a la modificación superficial de estas. Sin embargo, dependiendo del sitio objetivo, suelen ser más efectivas, como por ejemplo en el tratamiento de células cancerígenas y patogénicas. Dentro de estos sistemas de nanocargadores, Martínez-Carmona et al. (2018) plantearon las estructuras de ZnO como sistemas de liberación, esencialmente porque presentan buena bioactividad y baja toxicidad. A causa de estas características y a la alta actividad antibacteriana, más la capacidad para atravesar las paredes celulares, es que Martines-Carmona presenta al ZnO como un excelente

nanosistema a ser usado en el tratamiento de infecciones bacteriales, el cáncer o como portador de agentes activos tales como la insulina, hormona utilizada en el tratamiento de la diabetes. Según Leone et al. (2019), las nanoestructuras de ZnO se presentan como una gran alternativa para el cargado y liberación de fármacos como el ibuprofeno obtenido mediante proceso de impregnación con CO₂ en estado supercrítico. El estudio prueba que las diferentes nanoestructuras de ZnO son capaces de transportar al ibuprofeno con una capacidad de cargado de hasta 14 % m/m y una eficiencia de 68 % de liberación. Además, presentaron una buena actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias grampositivas tales como *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. En la misma línea, Murugesan et al. (2018), desarrollo un nanosistema de ZnO funcionalizado con ácido húmico (HA) con el fin de mejorar la actividad antibacteriana del clorhidrato de ciprofloxacina. Probaron que el nanosistema posee una eficiencia de encapsulamiento a través de método de emulsión cercana al 99 % y una liberación *in-vitro* entre 87-98 % para un pH en el rango de 2.5-8. Además, también demostró que el nanoportador con la ciprofloxacina es sensible al pH, así mismo que es una buena alternativa para tratamiento de infecciones bacteriales ya que el nanosistema mostro alta actividad contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Según Ali et al. (2020), la resistencia de los carcinomas a múltiples fármacos como la doxorrubicina, ha conducido hacia nuevas alternativas de tratamiento con nanopartículas metálicas modificadas superficialmente; tal como su propuesta basada en Nps de CuO bio-funcionalizada con extracto de hojas de *Eucalyptus globulus* (ELE). La investigación probó *in-vitro* que las Nps bio-funcionalizadas (ELE-CuO), son altamente efectivas contra la línea de células de cáncer de mama MCF-7 y *Aspergillus flavus*. Consecuentemente, plantean que este sistema bio-funcionalizado, puede ser un potencial agente anticancerígeno y antifúngico. Además, debido al alta área superficial y propiedades químicas, las Nps funcionalizadas pueden alterar propiedades cruciales de los fármacos cargados en la superficie, tales como la solubilidad, estabilidad *in-vivo*, farmacocinética, bio-distribución, entre otros. Dentro del mismo contexto, L. Li et al. (2020), sostienen que una de las formas más excepcionales de liberar un fármaco es mediante sistemas de nanocargadores modificados superficialmente, ya que permiten un mejor control farmacocinético, mejor interacción con las moléculas bioactivas, entre otros factores. Por tanto, propusieron un sistema basado en nanotubos de TiO₂ funcionalizado con polidopamina, como un sistema para la liberación local de ibuprofeno. Los resultados mostraron que el 28.16 % del ibuprofeno se libera en la etapa más rápida para el nanoportador funcionalizado, mientras que el 55.3 % para el nanocargador solo. Además, también se

demonstró que los nanotubos funcionalizados contribuyen a reducir la repentina liberación y una mayor prolongación en el tiempo de liberación.

Dentro de los diversos sistemas que se han estudiado como posibles portadores farmacológicos, están también las matrices híbridas complejas basadas en compuestos inorgánicos como nanopartículas metálicas y polímeros. Según Ahmadian et al. (2018), hidrogeles nanocompuestos basados en PVA y Nps de CuO, son un potencial sistema para el cargado y liberación de fármacos como el ibuprofeno. Ya que los resultados mostraron que los hidrogeles nanocompuestos permiten un mayor cargado de fármaco que los hidrogeles puros. Además, la incorporación de las Nps incrementa el radio de hinchamiento y así mismo reduce la velocidad de liberación del fármaco. De acuerdo a Vedhanayagam et al. (2018), los scaffolds basados en colágeno y Nps de ZnO funcionalizadas, son una gran alternativa para el tratamiento de cicatrización de heridas, dada la excelente bioactividad que han mostrado, así como también a las buenas propiedades antibacterianas. Además, como sistemas portadores de fármacos presentan altos grados de hinchamiento superiores a 800 % y una velocidad de cicatrización de 50 % más rápido que la forma convencional. Así mismo, Neacsu et al. (2019), mostro que hidrogeles a base de colágeno y Nps ZnO también pueden ser usados como apósitos y/o rellenos para tratar laceraciones en la piel ya que muestran excelente actividad inhibitoria contra líneas de bacteria como la *S. Aureus*, *C. Albicans* y la *E.coli*. Según Khani et al. (2018), hidrogeles híbridos basado en compuestos inorgánicos como las nanopartículas de ZnO y polímeros como el quitosano y el alcohol polivinílico. Han mostrado tener una alta porosidad de hasta 90 %, característica muy importante para estos tipos de sistemas como portador de fármacos. Así mismo, también reportaron que las nanopartículas de ZnO como parte de matrices compuestas lograron mejorar las propiedades mecánicas y térmicas del sistema. Además, mostro que el sistema complejo presenta buen perfil de liberación para la heparina de hasta $5.9 \mu\text{g cm}^{-2}$. En la misma línea, de acuerdo con Bal-Ozturk et al. (2019), los sistemas nanoestructurados en forma de esponjas a base de quitosano, ácido alginico y Nps de ZnO, son una propuesta alternativa para el tratamiento y control de hemorragias, así como portador para la DEX. Según los autores, la matriz puede desempeñarse también como un adecuado hemostático, que de acuerdo a las pruebas en ratas no mostraron una toxicidad dentro de las 24 h; sino todo lo contrario, mostraron una buena biocompatibilidad y actividad antibacteriana. También se desempeñan como un buen sistema para la liberación de la DEX con una eficiencia de 88.7 % en un periodo de 3 días.

Prasanna & Venkatasubbu. (2018), mostraron que el compósito de nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) recubierta capa a capa con PVA y alginato, son una excelente matriz portadora de especies bioactivas como la amóxicilina (AMX). Sobre todo, porque reportaron buena actividad antibacterial y una eficiencia de liberación mayor a 93 % durante 30 días de ensayo. Por lo cual, considerando las propiedades biocompatibles de la HAP, su superficie, las características de cada constituyente en el compósito y los resultados encontrados. Este puede ser usado como sistema de liberación de fármacos en el tratamiento de infecciones en huesos. De forma similar, Taghzouti et al. (2019), plantearon un sistema híbrido para la liberación del mismo fármaco, pero a base de óxido de grafeno (OG) e HAP. Según los autores, sostienen que combinar las propiedades ventajosas del OG y la HAP permitiría obtener una adecuada matriz para liberar antibióticos como la AMX. De hecho, reportaron que el compósito tuvo una eficiencia de cargado mayor al 45% y que dependiendo de la concentración del OG, puede promover la regeneración del hueso, motivo por el cual podría ser usado para tratar infecciones de huesos; sobre todo, aquellos de origen quirúrgico.

Los hidrogeles combinados son una de las FFLM más versátiles y ampliamente usadas en la biomedicina. Estos sistemas como el desarrollado por Y. A. Khan et al. (2021), basados en quitosano y alginato facilitan la encapsulación y liberación de más de un agente activo. Es así que reportaron que los hidrogeles cargados con vancomicina, ciprofloxacina y amoxicilina trihidratada, pueden inhibir el crecimiento de las bacterias entre 6 a 12 % más que los fármacos libres. Esto debido a la sinergia producida entre ellos y el hidrogel. Así mismo también mostraron que el sistema tiene una eficiencia de cargado de 91-95 % según la combinación de los antibióticos y una liberación mayor al 80 % en 10 días de análisis. Por ende, plantean que el sistema podría ser utilizada en la terapia combina de alguna infección. Por otro lado, Gholamali & Alipour. (2020), diseñaron un hidrogel nanocompuesto como sistema de liberación de la AMX, el cual está basado en carboximetilquitosano/Almidón/ Nps de CuO. Según los autores, el compósito mostro ser un sistema adecuado que permite controlar las características de liberación de la AMX, ya que se encontró que esta depende del contenido de Nps de CuO. Tanto así que, si el contenido es mayor, el tiempo de liberación se reduce, así como también la eficiencia de cargado del fármaco. Por otro lado, demostraron que la eficiencia para la liberación del fármaco a pH 1.2 y 7.4 fue menor a 70 % durante las 10 h estudiadas.

1.3. Justificación

Durante muchos años, ha existido un gran interés por encontrar o diseñar un sistema que permita suministrar fármacos penicilínicos como la amoxicilina, con apropiadas concentraciones terapéuticas. Tal enfoque surge a consecuencia de los problemas generales asociados a los sistemas de administración convencional, ya que estos suelen generar contraindicaciones o efectos adversos muchas veces severos, además, presentan baja eficacia terapéutica y toxicidad adicional; en consecuencia, producen un mayor trabajo para el organismo, debido a que este tiene que excretar tanto los materiales residuales del portador, así como también la parte del fármaco no procesado (Duan et al., 2017). Por tanto, una de las grandes alternativas y de mucho interés en la comunidad científica, es la generación de sistemas a base de biomateriales como el colágeno, quitosano, alginato, entre otros; ya que permiten mitigar la carga de toxicidad adicional. Además, por su naturaleza han reportado poseer excelentes propiedades biocompatibles, baja toxicidad, biodegradabilidad, antifúngicas y sobre todo que son de bajo costo (Vasif Hasirci, 2018). No obstante, estos tipos de sistemas con el tiempo se están volviendo más esenciales porque permiten regular la velocidad de distribución de los fármacos en diferentes partes del cuerpo (Alazzawi et al., 2021), así como también minimizar los efectos secundarios y disminuir el número de dosis requeridas (Ponciano et al., 2021).

El colágeno, un biomaterial que presenta excelente biocompatibilidad al cuerpo humano, propiedades regenerativas y características únicas (Krishnamoorthi et al., 2017), se presenta como una de las mejores alternativas, ya que es uno de los materiales más versátiles (Lin et al., 2018) y con importante actividad biológica (Avila Rodríguez et al., 2017). Además, al combinarse con otros biomateriales como el alcohol polivinílico (PVA), polímero termoplástico de bajo costo y toxicidad (Aslam et al., 2018), pueden formar compósitos híbridos que permitirían desarrollar matrices, tales como films, scaffolds o esponjas con altas propiedades mecánicas. Así mismo esta matriz podría servir de base para estudiar el cargado y liberación de fármacos como la amoxicilina; facilitando así que se pueda alcanzar los niveles terapéuticos adecuados del fármaco y un mayor tiempo de residencia con mejor efectividad.

Los nanoportadores inorgánicos como las Nps de metales bioactivos (cobre, zinc, etc.) o derivados metal-orgánico han sido extensamente estudiados. Ya que, se ha reportado que estos sistemas proveen las condiciones óptimas para la encapsulación de agentes terapéuticos; sobre todo, de aquellos poco solubles. No obstante, estos sistemas también son capaces de protegerlos contra la degradación fisiológica (Saghazadeh et al., 2018). Por otra parte, en la

actualidad, siguen generando un tremendo impacto en la medicina, debido a que pueden adaptarse a sí mismas y producir una efectiva interacción frente a pequeñas biomoléculas de similar tamaño (Zachary I. Stryker, 2020). Mas aún, son capaces de romper las barreras biológicas, ya que pueden atravesar la piel e incluso las membranas y paredes celulares. Lo cual, los vuelve un sistema adecuado para la administración de fármacos y en el tratamiento de infecciones bacteriales y cancerígenas (Saghazadeh et al., 2018; Zachary I. Stryker, 2020). No obstante, las modificaciones superficiales de tales sistemas, dependiendo del agente modificador como el ácido húmico, no solo llegan a producir una alteración en la disposición biofarmacéutica del principio activo; sino que también pueden alterar la distribución, velocidad de absorción e incluso potenciar las propiedades antibacteriales del fármaco. Así mismo, permiten una mejor dispersión de las Nps en medio acuoso (Ajit S. Narang, 2020; Lallo da Silva et al., 2019).

El desarrollo de diversas matrices basadas en colágeno, ha sido de mucho interés y ha crecido arduamente durante los últimos años, tanto así que se han realizado combinaciones híbridas con polímeros sintéticos y materiales inorgánicos como las nanopartículas metálicas. No obstante, han sido con aquellas de baja toxicidad y buenas propiedades antibacterianas, tales como las nanopartículas de óxido de cobre, zinc o polímeros biocompatibles y biodegradables como el PVA, entre otros; con las que se ha encontrado la mayor relevancia para aplicaciones biomédicas. Estas conjugaciones híbridas han mostrado mejoras en las propiedades fisicoquímicas, propiedades mecánicas, mayor actividad antibacteriana y muchas otras; las cuales justifican el creciente interés de los investigadores en estos tipos de sistemas (G. Murugesan et al., 2018; Saghazadeh et al., 2018). Adicionalmente, sistemas híbridos basados en polímeros biocompatibles y Nps modificadas superficialmente, pueden ser buenos portadores farmacéuticos, ya que podrían modificar la cinética de liberación de principios activos con el fin de mejorar la posología y haciendo que se pueda obtener concentraciones terapéuticas más efectivas y perdurables en el tiempo.

En consecuencia, en el presente trabajo se pretende desarrollar un sistema de transporte para la liberación de AMX, empleando colágeno, PVA y Nps de ZnO funcionalizadas con HA. Por ende, se sintetizarán y modificarán las Nps de ZnO y se obtendrá colágeno aniónico tipo I, que serán usados para preparar los compósitos híbridos de HCG/PVA y HCG/PVA/ZnO-HA. Posteriormente, será evaluado su potencial uso como medio de transporte mediante la incorporación del fármaco modelo.

1.4. Hipótesis

En el presente trabajo, se desarrolla un sistema basado en esponjas de colágeno – PVA, conteniendo Nps de ZnO funcionalizadas con HA, del cual se espera que se desempeñe como buen sistema portador para el fármaco AMX; además, que facilite alcanzar una óptima capacidad de cargado, alta capacidad de absorción de agua y una alta porosidad. Por otro lado, debido a las características de las Nps modificadas y, con el fármaco encapsulado en su superficie e incorporadas en la matriz polimérica, se presume que la cinética de liberación de la AMX sea ampliamente más sostenible en el tiempo y de alta eficacia.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Liberar amoxicilina desde esponjas del compósito basado en colágeno hidrolizado (HCG) tipo I/PVA, conteniendo Nps de ZnO funcionalizadas con ácido húmico.

1.5.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de ZnO mediante el método sol-gel.
- Modificar superficialmente las Nps de ZnO con ácido húmico y determinar la eficiencia de funcionalización.
- Realizar el cargado de la AMX en las Nps modificadas y determinar la eficiencia de cargado mediante curva de calibración.
- Obtener colágeno aniónico tipo I desde el tendón de bovino mediante hidrólisis alcalina.
- Determinar el rendimiento de obtención mediante gravimetría y la masa molar viscosimétrica del colágeno.
- Preparar las matrices compósito de HCG/PVA, HCG/PVA/ZnO-HA, HCG/PVA/AMX, HCG/PVA/AMX/ZnO-HA, HCG/PVA||ZnO-HA/AMX y HCG/PVA/AMX||ZnO-HA/AMX, mediante proceso de liofilización.
- Determinar el grado de hinchamiento en buffer de fosfatos y la porosidad mediante inmersión en etanol de las matrices HCG/PVA y HCG/PVA/ZnO-HA.
- Caracterizar las muestras obtenidas y preparadas mediante técnicas instrumentales tales como FTIR, DLS, RAMAN, DRX, SEM y DSC.
- Evaluar la liberación *in-vitro* de la amoxicilina desde las esponjas del compósito, mediante espectroscopía UV-Visible.

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

2.1. Sistema de liberación modificada

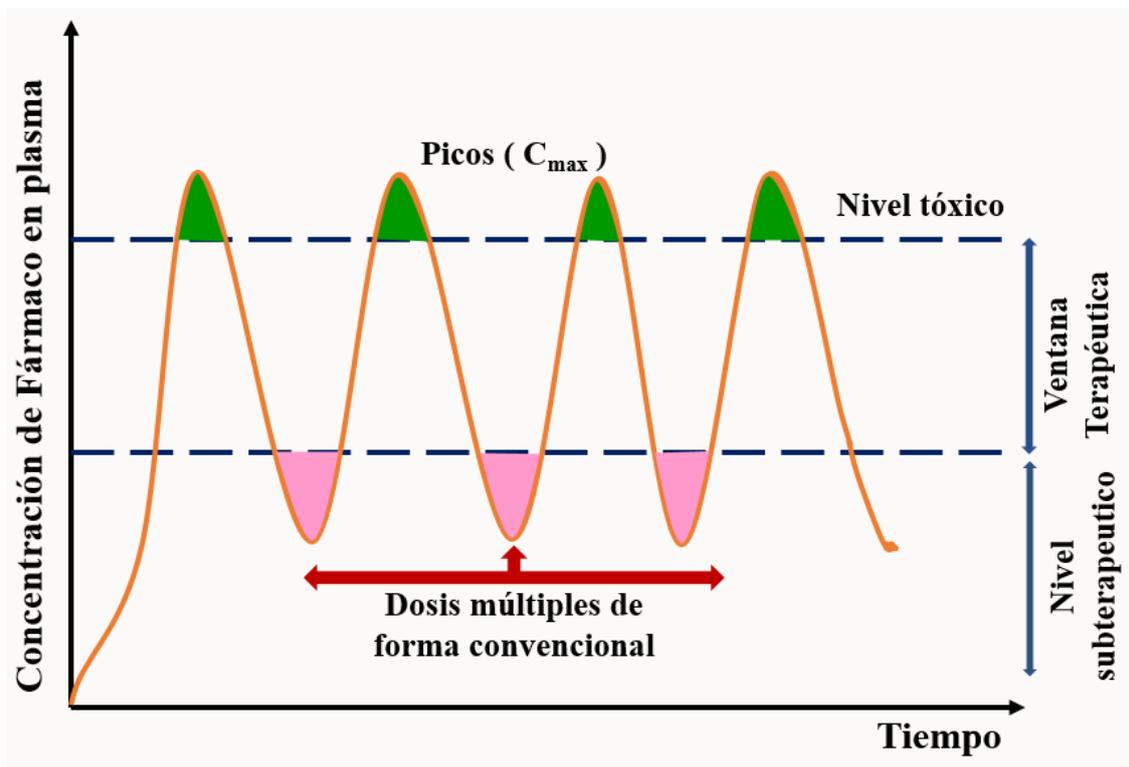
Uno de los principales desafíos que se ponen en juego durante la administración de sustancias farmacológicas, es prolongar la duración de acción de un fármaco con el fin de obtener un tratamiento más efectivo. Sin embargo, esto no es tan sencillo, ya que involucraría cambiar la velocidad de liberación del principio activo a través de la forma en que este se administre. No obstante, uno de los métodos generalmente planteados, es la modificación de la forma de liberación, lo cual causa que el fármaco sea absorbido gradualmente por el organismo (Pitt Kendall, 2022). Las formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), son todas aquellas diseñadas de tal manera que alteran la velocidad de absorción del fármaco y/o el sitio de liberación. Esto con el fin de lograr posibles beneficios terapéuticos tales como una mejor eficiencia de administración y disminución de efectos adversos. Asimismo, permiten alcanzar un mejor desempeño y un rendimiento clínico optimizado en el paciente con una mayor selectividad en la actividad farmacológica (Siamidi, 2020). Por otra parte, dentro de las FFLM, se incluyen también las modificaciones en la formulación o en el proceso de producción de un fármaco; esto con el objetivo de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación, todo con la finalidad de alcanzar mejores niveles terapéuticos en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tiempo (Pitt Kendall, 2022).

Un factor muy importante en el diseño de un sistema de administración farmacológica, es liberar y mantener la concentración del fármaco dentro de una ventana o nivel terapéutico durante un periodo de tiempo prolongado. La **Figura 1**, muestra la diferencia entre el nivel terapéutico y los niveles tóxico y subterapéutico, que generalmente alcanzan la administración de un fármaco. En esta se observa que cuando se administra una primera dosis, la concentración aumenta rápidamente por encima de la ventana subterapéutica e incluso logra superar el nivel tóxico. Nivel en donde el fármaco suele comenzar a causar efectos secundarios que muchas veces son nocivos o indeseables. Aunque, por lo general, se administra una segunda dosis en algún punto después de alcanzar un nivel subterapéutico e incluso una tercera. Sin embargo; predecir el momento preciso de esta segunda dosis u otra posterior puede ser difícil sin un control adecuado de la concentración del fármaco (Basit, 2018). Este es uno de principales motivos por la cual surge la necesidad de desarrollar nuevas FFLM, ya que estas presentan numerosas ventajas respecto a las formas farmacéuticas convencionales (S. Murugesan et al., 2020; Siamidi, 2020), entre las que se encuentran:

- Mantienen la concentración de la sustancia activa en la sangre dentro de los niveles terapéuticos durante un período de tiempo más largo en comparación a métodos convencionales.
- Reducen los efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.
- Permiten disminuir las fluctuaciones de los niveles plasmáticos y tener un efecto terapéutico más uniforme.
- Permiten al paciente recibir un menor número de dosis.

Figura 1

Perfil de administración de un fármaco en dosis múltiple versus tiempo.



Modificado de (Gaganjot Kaur, Jasleen Grewal, Kiran Jyoti, Upendra K.Yain, Ramesh Chandra, 2018)

Sin embargo, también existen ciertas limitaciones respecto al uso de las FFLM, entre los que se puede recalcar (Domínguez, 2008; Siamidi, 2020):

- Limitada o escasa relevancia clínica y en muchos casos, un alto costo.
- Posible sobredosificación debido a la liberación inmediata e incontrolada de la dosis.
- Dificultad en el ajuste de la dosificación.
- Dependencia del tiempo de tránsito intestinal en las formas de administración oral.
- Retrasó en el inicio del efecto terapéutico con posible riesgo de acumulación del fármaco y en consecuencia la necesidad de ajustar las pautas posológicas.

Las limitaciones mencionadas si bien muestran una desventaja en el diseño de nuevos sistemas de liberación modificada, también son nuevos desafíos que investigadores de la comunidad científica busca solucionar. Esto con el fin de mejorar indirectamente la calidad de vida las personas a través de sistemas con mejores pautas posológicos, de bajo costo y fácil acceso.

2.1.1. Clases de FFLM

Las FFLM se pueden clasificar en base a la forma en que se libera un fármaco o bien en base al mecanismo que gobiernan la liberación. Por ende, considerando la mayoría de las tecnologías farmacéuticas, estas se agrupan en cuatro clases principales; quienes a su vez se subcategorizan en otras, como es el caso de los sistemas de liberación diferida que contiene a los sistemas pulsátiles y retardadas, o en los sistemas de liberación prolongada, a la que se le adjuntan los sistemas de liberación sostenida y controlada (**Figura 2**). Por último, también se tiene a los Sistemas flotantes y bioadhesivos (Gujral et al., 2018; Priyanka et al., 2021; Sarah J. Trenfield, 2020)

- a) **Sistemas de liberación acelerada o inmediata:** Son formas orales liofilizadas, que en general se trata de formas sólidas que se disuelven instantáneamente en la cavidad bucal sin necesidad de administración de líquidos. Dentro de estos tipos de sistemas se pueden encontrar ciertos comprimidos o tabletas que no necesitan de líquidos, sino que les basta con entrar en contacto con la saliva para que el principio activo sea liberado inmediatamente.

b) Sistemas de liberación diferida: Son sistemas de cubierta entérica, gastro resistentes y de liberación pulsátil o secuencial, en la cual las dosis de un fármaco se liberan en uno o más pulsos secuenciales. En algunos casos, una dosis se libera inmediatamente, mientras que la liberación de las dosis posteriores se retrasa. Es decir, se produce un período de tiempo en la cual no hay liberación (tiempo de retraso), seguido posteriormente de una liberación rápida y completa del medicamento (liberación secuencial). Asimismo, estos tipos de formas de liberación farmacéutica, son útiles para la administración de medicamentos destinados a tratar ciertas enfermedades que producen síntomas con ritmo circadiano (Ashlee D et al., 2019; Priyanka et al., 2021).

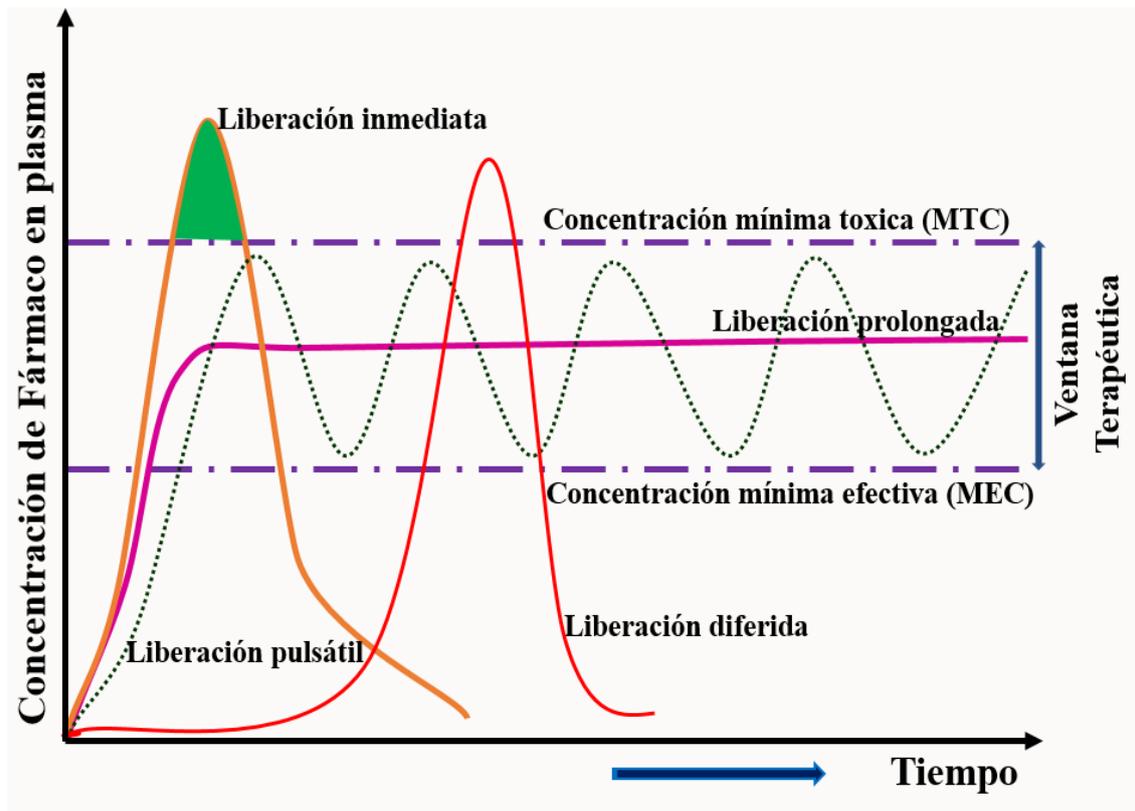
Por otro lado, dentro de este grupo también se incluyen los sistemas diseñados para liberar un fármaco de forma retardada, los cuales, sin prolongar el efecto terapéutico, permiten modificar el tiempo o el lugar donde se va a producir la liberación. Sin embargo, una liberación farmacológica como esta no mantiene los niveles uniformes del fármaco en la sangre y sobre todo dentro del rango terapéutico (Gujral et al., 2018).

c) Sistemas de liberación prolongada o controlada: Son todos aquellos sistemas diseñados principalmente con el fin de prolongar la liberación del fármaco a lo largo del tiempo y así mantener el efecto terapéutico o bien disminuir los picos de concentración característicos de los sistemas convencionales, quienes producen una liberación inmediata del fármaco, tal como se presenta en la **Figura 2**. En esta se muestran tres niveles: la concentración mínima efectiva (MEC), la mínima tóxica (MTC) y la ventana terapéutica, sobre la cual se debe mantener la dosis farmacológica deseada de un fármaco a lo largo del tiempo y mediante un sistema de liberación prolongado. Así mismo esta ventana terapéutica, es variable y propia de cada fármaco ya que, en algunos casos puede llegar a ser más amplia o angosta. Por ende, conocer dicho rango es muy importante ya que para una administración convencional la ventana terapéutica es muy estrecha; lo cual causa que la dosis total del fármaco se libere rápidamente y no se obtenga la concentración farmacológica deseada (Juergen Siepmann, 2013; S. Murugesan et al., 2020).

d) **Sistemas flotantes o espacial y bioadhesivos:** Son sistemas diseñados de tal forma que permiten controlar el aumento y la disminución de la concentración plasmática del fármaco, así como la residencia gástrica. De otro lado, estos sistemas se suelen utilizar en principios activos que presentan resistencia a los jugos gástricos y con procesos de liberación y/o absorción para los que el sistema supone una ventaja respecto a la biodisponibilidad del principio farmacológico (Kumari, 2018).

Figura 2

Perfil de concentración de un fármaco vs tiempo, según tipo de liberación.



Modificado de (Sarah J. Trenfield, 2020)

Un caso que merece especial mención en la actualidad sobre estos tipos de sistemas de liberación, son las capsulas, que se trata de matrices lipídicas, hidrofílicas o polímeros insolubles que permiten la difusión o liberación del principio activo de manera más uniforme y prolongada. Todo ello, en virtud a su remarcado diseño y popularidad, ya que satisfacen las características ideales para la administración adecuada de un fármaco (Fassihi, 2018).

Por otra parte, dentro de todos los sistemas de liberación modificada mencionados, existen algunos que son más ventajosas que otras. Sin embargo, ello depende en su mayoría de las características del medicamento que se desea suministrar. En la **Tabla 1** se muestra ciertos fármacos comerciales usados en la actualidad y las principales características según los tipos de FFLM, mediante las cuales se pueden suministrar, como son la liberación acelerada, que es la forma más comúnmente usada, la diferida, la cual agrupa a los sistemas retardados y pulsátiles. También, se remarca a los sistemas controlados, que es uno por los cuales muchos investigadores han puesto gran interés y finalmente están los sistemas flotantes (Gujral et al., 2018; Kumari, 2018; LEE, 2014).

Tabla 1

Liberación de fármacos según los tipos de FFLM y características.

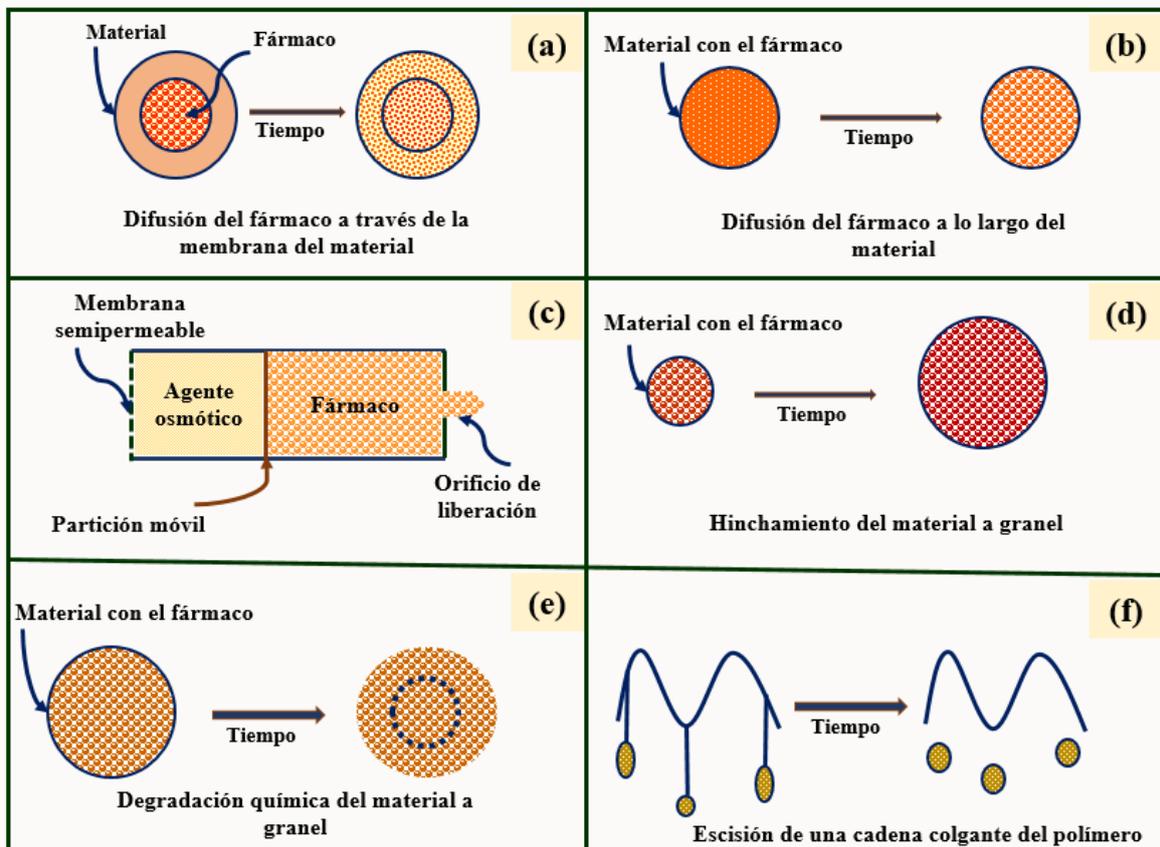
Tipos de sistema de FFLM	Características	Fármaco comercial
Sistemas de liberación acelerada	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. • No se prolonga el efecto terapéutico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Paracetamol • Zofran • Ibuprofeno
Sistemas de liberación diferida	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas retardados: diseñadas para salvar el pH gástrico o para evitar gastro lesividad del fármaco. No prolongan el efecto terapéutico. • Sistemas pulsátiles: liberación secuencial del medicamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diclofenaco • Omeprazol • Amoxicilina • Dilzem
Sistemas de liberación prolongada o controlada	Diseñados para prolongar la concentración plasmática (Cp.) del fármaco o para mejorar las características farmacocinéticas del medicamento.	<ul style="list-style-type: none"> • Amoxicilina • Anfetamina • Tamsulosina
Sistemas flotantes y bioadhesivos	Diseñados para aumentar el período de residencia gástrica.	<ul style="list-style-type: none"> • Ciprofloxacina • Riboflavina • L-DOPA y benserazida

Adaptado de (Ashlee D et al., 2019; Kumari, 2018; LEE, 2014)

La liberación de principios activos farmacológicos como se mencionó anteriormente se puede dar de diferentes formas. Sin embargo, los mecanismos de liberación son dependientes en gran medida del tipo de sistema de liberación que se tenga y las características bioactivas de la matriz. La **Figura 3** presenta los posibles mecanismos de liberación de un fármaco, esto según el tipo de sistema tales como: la difusión a través de una membrana permeable, a lo largo de un cierto material, mediante presión osmótica, por hinchamiento del material tales como los films, esponjas, scaffolds y entre otras. Así mismo, la degradación del material a granel y por rompimiento de una cadena colgante del polímero que retiene al fármaco (Basit, 2018; Juergen Siepmann, 2013; Siamidi, 2020).

Figura 3

Mecanismos de liberación para diferentes sistemas de administración de fármacos.



Mecanismos de liberación por: **a)** difusión a través de una membrana permeable, **b)** difusión a lo largo del material, **c)** liberación por presión osmótica, **d)** por hinchazón del material a granel, **e)** por degradación química y **f)** por escisión de una cadena colgante. Adaptado de (Basit, 2018; Juergen Siepmann, 2013; Sarah J. Trenfield, 2020).

2.2. Biomateriales

Desde sus orígenes la sociedad ha enfrentado grandes desafíos en cuanto a los cuidados de la vida se refiere. Dentro de esos desafíos están la búsqueda de materiales que pudieran reparar o tratar daños generados en ciertas partes del cuerpo, como dentaduras, huesos rotos, etc. Sin embargo, los materiales que se solían usar, en muchos casos al corto plazo generaban más daños a la parte del cuerpo reemplazado o tratado. No obstante, a medida que las sociedades iban evolucionando, se fueron conociendo, desarrollando y usando mejor los materiales, que luego llegarían a ser conocidos como biomateriales (Yaser Dahman, 2019). Definir exactamente que son estos materiales es difícil, debido a la constante evolución con el avance de las nuevas tecnologías. Sin embargo, se puede decir que son materiales diseñados de tal forma que sus propiedades se asemejan mucho al sistema biológico. Es decir, pueden ser lo suficientemente estables que su uso muestra niveles apropiados de bioactividad. No obstante, estos están destinados a cumplir ya sea parcial o totalmente ciertas funciones en los tejidos u órganos dañados o que funcionan inadecuadamente (K.Shanmugam, 2018; Vasif Hasirci, 2018).

Hoy en día debido al avance de la sociedad moderna y a la inevitable conexión a las grandes tecnologías, ha permitido que los biomateriales alcancen grandes aplicaciones en un sin número de disciplinas, siendo el de mayor relevancia la biomedicina. Sin embargo, también presentan usos en campos como: la industria aeroespacial, la industria alimentaria, el equipamiento deportivo, la agricultura y muchas otras áreas (Biswal et al., 2020; Preetha, Sreekala et al., 2018). Dentro de la medicina, estos han sido utilizados en una variedad de problemas médicos tales como en reemplazos articulares, placas óseas, cemento óseo, ligamentos y tendones artificiales. Además, también en implantes dentales para la fijación de dientes, en prótesis de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, como tejido artificial, lentes de contacto e incluso en implantes mamarios (Hossain et al., 2017). Por otro lado, cabe mencionar que la investigación y el desarrollo de estos materiales han sido propiciados en gran medida por el creciente avance de la biología celular y molecular, la química, la ciencia de los materiales y la misma ingeniería (Hossain et al., 2017; Vasif Hasirci, 2018). Así mismo la diversidad de aplicaciones médicas en las cuales han encontrado ser muy útiles han ido evolucionado con el tiempo y se les ha agrupado en cuatro generaciones: los de primera generación, eran biomateriales inertes que se componen en su mayoría de materiales destinados a sustituir parte de tejido dañado o como soporte estructural de bajo impacto en el paciente. Luego están los de segunda generación o biomateriales bioactivos que eran los que

provocaban una reacción ciertamente controlada con los tejidos, pero que en muchas veces causaban infecciones. No obstante, con el fin de superar estas desventajas surgió la tercera generación de biomateriales, llamados biodegradables ya que eran capaces de degradarse y ser absorbidos en el organismo. Finalmente, se encuentran los materiales de cuarta generación, que no son más que la extensión lógica de los materiales desarrollados desde 2010 a la actualidad y que avanzan rápidamente con el objetivo de apoyar y estimular la regeneración de tejido funcional o incluso emular estructuras naturales y reparar tejido dañado sin causar efectos negativos acorto o largo plazo (Festas et al., 2019).

Considerando las propiedades fisicoquímicas y aplicaciones, los biomateriales se agrupan en dos clases: Los orgánicos y los inorgánicos, que por su naturaleza pueden ser de origen natural o sintético (Nasim Kiaie, 2017). Dentro de estos están los materiales cerámicos, compósitos, algunos metales y sus aleaciones y los polímeros que pueden ser biodegradables o no. En el caso de los polímeros, estos se pueden degradar mediante un proceso enzimático y también no enzimático que trae como resultado subproductos que generalmente son biocompatibles y no tóxicos. Además, pueden ser metabolizados y excretados por vías fisiológicas normales. Estos tipos de biomateriales dependiendo de su origen se subcategorizan en tres grupos: Materiales naturales, materiales semisintéticos y materiales sintéticos (Biswal et al., 2020).

2.2.2. Cerámicos

Los cerámicos o también llamados biocerámicos, son materiales porosos y policristalinos que se caracterizan por ser duros, frágiles, inorgánicos y resistentes a la corrosión (Yaser Dahman, 2019). Estos materiales se pueden agrupar en tres distintas categorías: Primero están los cerámicos inertes, materiales estables en ambientes fisiológicos, resistentes al desgaste y de respuesta biológica mínima. Luego están los bioactivos, que se caracterizan por ser reactivos a granel; es decir forman un enlace químico al interactuar con el tejido vivo. Finalmente se encuentran los cerámicos biodegradables, aquellos que pueden desintegrarse completamente o disolverse en los fluidos corporales (Kargozar et al., 2019; Nasim Kiaie, 2017). Actualmente existen una amplia gama de materiales cerámicos y de vidrio que son utilizados para aplicaciones biomédicas y que van desde lentes de contacto a implantes para oídos. Además, estas cerámicas se utilizan también en funciones estructurales como en articulaciones, en implantes de tejidos o para reemplazar parte de la cadera o rodilla, así como en recubrimientos para mejorar la biocompatibilidad de los implantes metálicos (Nasim Kiaie, 2017; Yaser Dahman, 2019).

Por otro lado, también se tiene muchos cerámicos como los vidrios y los vitrocerámicos, materiales de composiciones inorgánicas y/o no metálicas que han sido aplicados como soporte en anteojos, instrumentos de diagnóstico, productos químicos, termómetros, matraces de cultivo de tejidos y de fibra óptica. Así mismo, los vidrios como materiales porosos insolubles han sido utilizados como portadores de enzimas, anticuerpos y antígenos (K.Shanmugam, 2018). La diversidad de aplicaciones que han encontrado los cerámicos es amplia y en diversos campos como la biomedicina. Mas aún cada uno de estos materiales siempre presenta un desafío o carencia en ciertas propiedades que le impiden alcanzar una aplicación médica exitosa. Por ejemplo, el biovidrio presenta debilidades mecánicas y baja resistencia a la fractura. Sin embargo, este problema se ha ido superando continuamente a través de la experimentación con otros biomateriales tales como los compósitos (Yaser Dahman, 2019).

2.2.3. Polímeros

Los biomateriales han sido usados desde hace mucho tiempo; sin embargo, materiales basados en polímeros, han sido utilizados en una amplia variedad de campos desde mediados del siglo XX. Además, con el avance de las nuevas tecnologías, estos fueron jugando un rol cada vez más importante, especialmente en áreas de la medicina. Por otro lado, estos tipos de materiales dependiendo de su estructura desempeñan una cierta función, la cual varía enormemente entre uno y el otro. Sin embargo, en cierta medida comparten alguna característica en general tales como la solubilidad o estabilidad térmica, entre otras (Yaser Dahman, 2019).

Hoy en día existen muchas formas de clasificar estos biomateriales; sin embargo, dependiendo de su origen se pueden clasificar en polímeros naturales y sintéticos; los cuales se subcategorizan en polímeros termoestables, biodegradables, elastómeros, entre otros. Por otro lado, gracias a propiedades únicas como la flexibilidad, resistencia al ataque bioquímico, la fácil producción en productos con la forma deseada, entre otras; han sido ampliamente usados en una variedad de áreas de la medicina y en sistemas de liberación de fármacos (Festas et al., 2019).

2.2.3.1. Polímeros sintéticos

Dentro de la variedad de biomateriales, los polímeros sintéticos, los cuales pueden ser estructuralmente amorfos o semicristalinos presentan grandes ventajas ya que, al ser producidos en laboratorio, ciertas propiedades según su aplicación pueden especificarse químicamente mediante un adecuado arreglo de los grupos funcionales de su base estructural (Donnaloja et al., 2020; Festas et al., 2019). Materiales poliméricos de este tipo pueden ser biodegradables o no, así por ejemplo el poliácido glicólico (PGA), el poliácido láctico (PLA) y sus copolímeros, son considerados biodegradables. Además, todos estos más el alcohol polivinílico (PVA) son una familia de poliésteres alifáticos lineales que se suelen utilizar con mayor frecuencia en la ingeniería de los tejidos. Mientras que otros materiales que contienen metacrilatos en su base estructural no son usualmente biodegradables (Boni et al., 2018). De otro lado, polímeros biodegradables como los mencionados se encuentran entre los pocos polímeros sintéticos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para ciertas aplicaciones clínicas, debido a que se degradan mediante hidrólisis de los enlaces éster, generando así sus bases monoméricas como el ácido láctico y glicólico, que luego se transforman en agua y dióxido de carbono en las vías metabólicas bien definidas (Boni et al., 2018; Sheikholeslam et al., 2018). Por otro lado, varios estudios han revelado también que son biocompatibles y que su presencia es bien tolerada in vivo; sin embargo, esta es directamente afectada por ciertas propiedades tales como el peso molecular, composición química, solubilidad y según su aplicación por su geometría estructural (Festas et al., 2019).

La amplia diversidad de polímeros sintéticos existentes y el fácil control de sus propiedades fisicoquímicas han permitido que muchos puedan ser utilizados en muchas subáreas de la medicina, especialmente los polímeros biodegradables (Ebru et al., 2017). Por consiguiente, son utilizados como dispositivos en implantes, matrices como portadores farmacológicos, materiales inertes en catéteres, válvulas cardíacas, prótesis e injertos vasculares, entre muchos más (Ebru et al., 2017; Preetha, V.G. Geethamma et al., 2018).

2.2.3.2. Polímeros naturales

Los polímeros naturales son una de las clases de biomateriales poliméricos más omnipresentes en la medicina y en nuestra sociedad; dado que se obtienen desde fuentes naturales (Yaser Dahman, 2019). Además, son materiales de origen vegetal y animal que exhiben una excelente compatibilidad mejorada con el organismo humano, sobre todo por la buena capacidad para exhibir bioactividad y de experimentar biodegradación. Así mismo, como tales muestran mejor desempeño en situaciones donde los materiales sintéticos no han cumplido con las expectativas clínicas esperadas (Boni et al., 2018). Dentro de esta clase de polímeros se encuentran ciertas proteínas como el colágeno y albumina, polímeros derivados de origen marino como el alginato y polisacáridos tales como el quitosano, el almidón, la pectina y entre muchos otros. Estos materiales además debido a sus propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad y resistencia a la tracción pueden ser utilizados en la fabricación de diferentes matrices en la ingeniería de los tejidos y/o como sistemas de administración de fármacos y otros agentes biológicos (Boni et al., 2018; Festas et al., 2019).

En general dentro de las grandes aplicaciones que tienen los poliméricos naturales, sobre todo en medicina, han sido usados en prótesis oculares, ligamentos y tendones artificiales, válvulas del corazón, placas para fracturas, lentes de contacto y especialmente en sistemas de administración de fármacos. Además, uno de los más estudiados en la actualidad para tales aplicaciones biomédicas es el colágeno, especialmente por su alta biocompatibilidad y por la gran cantidad de sitios de enlace que ofrece y que son muy favorables al sistema vivo (Donnaloja et al., 2020). Sin embargo, también se han empleado otros polímeros tales como el quitosano, la celulosa, alginato, las fibras de seda o el mismo ácido hialurónico, entre muchos otros (Boni et al., 2018; Sheikholeslam et al., 2018).

2.2.4. Metales

Los metales y sus aleaciones son materiales que han ido desempeñando un rol muy importante en los seres vivos, especialmente en la vida diaria de los seres humanos. Son tan relevantes que gracias a sus propiedades intrínsecas tales como la alta resistencia, fiabilidad mecánica, elasticidad, buena resistencia a la corrosión, resistencia al desgaste y conductividad térmica y eléctrica que han alcanzado grandes aplicaciones en diferentes disciplinas como la construcción, la electrónica y sobre todo la biomedicina (Festas et al., 2019). Dentro de esta área como biomateriales considerando su biocompatibilidad y baja fricción biológica (Niinomi, 2019), se estima que aproximadamente el 70-80 % de los de los implantes alrededor

del mundo son a base de metales (Festas et al., 2019). Además, desde el punto de vista bioquímico, desempeñan un rol fundamental en los sistemas vivos, ya que facilitan la función enzimática, el transporte de oxígeno y ciertas reacciones redox (Kargozar et al., 2019).

En la actualidad el uso de biomateriales metálicos que se utilizan en diferentes áreas de trabajo es supervisada por la Sociedad americana de Pruebas y Materiales (ASTM) y la Organización Internacional de Normalización (ISO). Por otro lado, de la gran variedad de estos materiales, los más utilizados por poseer mejores características fisicoquímicas y de menos costo son el titanio y sus aleaciones, así como también el acero inoxidable y el combinado de cromo-cobalto. Así mismo, los metales que se presentan como una de las alternativas más atractivas son los considerados biodegradables como lo son el zinc, hierro y magnesio que por sus propiedades únicas son utilizados en implantes temporales o en aplicaciones cardiovasculares y ortopédicas (Festas et al., 2019; Zindani et al., 2019). Los metales como materiales biocompatibles son ampliamente aplicados en medicina como electrodos para órganos artificiales, materiales de reemplazo permanente con características químicamente inertes o materiales con propiedades de biodegradabilidad para la regeneración de tejidos perdidos o la restauración de cierta función (Zindani et al., 2019). Así mismo como materiales de función estructural, también son usados en procedimientos quirúrgicos reconstructivos, particularmente ortopédicos o en tejidos no óseos como los vasos sanguíneos (Preetha, Sreekala et al., 2018).

2.3. Nanopartículas

La nanotecnología ha emergido como uno de los campos de la ciencia y la ingeniería más excelsos de la actualidad; especialmente porque permite producir materiales de diferentes niveles, a nano escala y con propiedades únicas (I. Khan et al., 2017). Es tal la importancia de estos materiales, que se han producido desde precursores orgánicos e inorgánicos e incluso híbridos y en diferentes formas y tamaños, tales como las nanopartículas (Nps), que son partículas sólidas coloidales (Seyedsina Moeinzadeh, 2017). Estos materiales dependiendo de su morfología, tamaño y propiedades fisicoquímicas se llegan a clasificar en :

- a) **Nanopartículas basadas en carbón:** Dentro de este grupo se encuentra a los fullerenos y nanotubos como las dos clases principales de Nps basadas en carbono (Ijaz et al., 2020; Yaser, 2019).
- b) **Nanopartículas a base de metal:** Estos materiales son hechos a partir de precursores puramente metálicos, que dependiendo de sus características y propiedades fisicoquímicas pueden adquirir múltiples aplicaciones en áreas como la medicina (Bhasarkar and Bal, 2021).
- c) **Nanopartículas basadas en cerámicos:** Son Nps solidas inorgánicas no metálicas, que se suelen sintetizar a través de calor y enfriamiento sucesivo, adquiriendo características destacables con aplicaciones en la catálisis y la fotocatalisis (Yaser, 2019).
- d) **Nanopartículas poliméricas:** Son Nps basadas en compuestos poliméricos naturales o sintéticos y son sintetizadas generalmente en forma de nanoesferas o nanocápsulas. Además, debido a sus propiedades como la biocompatibilidad ha atraído mucho interés en aplicaciones dentro del área de la medicina (Peltonen et al., 2020).

Los diferentes tipos de nanopartículas como las mencionadas y basadas en sus propiedades fisicoquímicas, así como también en su tamaño y la alta área superficial que poseen, presentan una amplia variedad de aplicaciones tales como en (Khan et al., 2017):

- i. **Medicina:** Es un área donde las nanopartículas han encontrado grandes aplicaciones, ya sea como nanoportadores en sistemas de liberación de fármacos cuyo fin es mejorar la eficiencia terapéutica, así como también en dispositivos biológicos, biosensores nanoelectrónicos o biomembrana (I. Khan et al., 2017; Peltonen et al., 2020).
- ii. **Manufactura y materiales:** La Nps muestran características fisicoquímicas únicas, dado que inducen propiedades eléctricas, mecánicas, ópticas y de imagen, lo cual los hace extremadamente buscadas en ciertas aplicaciones dentro de los sectores médico, comercial y ecológico, sobre todo en la elaboración de ciertos dispositivos electrónicos (Ijaz et al., 2020).
- iii. **Medioambiente:** Las Nps por su alta área superficial juegan un rol muy importante en el tratamiento de ciertos ecosistemas contaminados, ya que estos contaminantes pueden ser absorbidos en su superficie o quedar atrapados durante la agregación de

las mismas. De otro lado, la remoción de dichos contaminantes va depender mucho de las características que presente las Nps, tales como tamaño, estado de agregación, composición, porosidad e incluso su morfología (I. Khan et al., 2017; Yaser, 2019).

- iv. **Electrónica:** El surgimiento de dispositivos con pantallas táctiles y flexibles, ha dado origen a la electrónica impresa que funciona a base de varias tintas que pueden contener Nps metálicas, orgánicas e incluso a base de cerámicos. Por tanto, se espera que esta nueva tecnología se expanda rápidamente y de inicio a un proceso de producción en masa de nuevos dispositivos electrónicos, ya que la fácil manipulación de las Nps posibilita su incorporación en dispositivos no solo eléctricos sino también ópticos (K. P. Jayadevan, 2008; I. Khan et al., 2017).

2.4. Nanopartículas de óxido de zinc

El óxido de zinc (ZnO) es un material inorgánico funcional, prometedor y además muy versátil, dado a que presenta una amplia gama de aplicaciones, debido a baja toxicidad, biodegradabilidad. Así mismo como material nano particulado, a diferencia de otros ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA), como un aditivo alimentario, seguro y no tóxico a bajas concentraciones (Cotton et al., 2018; Popko, 2017). Así mismo, las ZnO Nps poseen una alta actividad catalítica y fotoquímica, con una alta absorción óptica en la región UVA (315-400 nm) y UVB (280-315 nm), que le permite tener un amplio band gap (~3.3 eV). Además de ello, también presenta una energía de enlace excitónico (60 meV) a temperatura ambiente (Herrera-Rivera et al., 2017) y propiedades ópticas, químicas y eléctricas únicas (Cotton et al., 2018).

Hoy en día las Nps de ZnO están siendo evaluadas como agentes antibacteriales tanto en formulaciones a nivel de microescala y nanoescala. Sin embargo, es sabido que estas exhiben una fuerte actividad antimicrobial en tamaño nanométrico y lo cual en parte es gracias a la absorción óptica que presentan (Popko, 2017). De otro lado, debido a las grandes propiedades que exhibe ha conducido a múltiples aplicaciones en diferentes áreas tecnológicas tales como la industria optoelectrónica, como pigmentos, en fotocatalisis, en medicina, en protectores solares (Herrera-Rivera et al., 2017), pastas dentales y cosméticos, gracias a su habilidad para absorber radiación ultravioleta (Iosub et al., 2017) .

2.5. Colágeno

El colágeno es una proteína de origen natural que se encuentra principalmente en el cartílago, piel, tendón y otras zonas del cuerpo de tanto los mamíferos, así como también de organismos marinos. Además, es considerado como un biopolímero cuya unidad básica es el tropocolágeno. Esta proteína supramolecular pertenece a la familia de proteínas naturales fibrosas, aunque se subcategorizan según su estructura en fibrilares, fibras asociadas y en red. Su nombre deriva de la palabra griega *glue* que significa pegamento, la cual originalmente se usaba para describir los constituyentes de los tejidos conectivos que producían la gelatina posterior a hervirse. Por otro lado, además de ser un material polimérico basado en proteínas, ofrece propiedades estructurales únicas, ya que tiene la ventaja de imitar muchas características de la matriz extracelular. Por tanto, puede conducir la migración, el crecimiento y la organización de las células durante la regeneración de los tejidos y la cicatrización de heridas. Mas aún, también es responsable de la resistencia mecánica de los tejidos interconectivos y de ofrecer la posibilidad de estabilizar las células encapsuladas y/o trasplantadas (Lin et al., 2018; Soroushanova et al., 2018).

A. Estructura

El colágeno como una de las proteínas más abundantes en los seres vivos existe en todas las formas y tamaños como una estructura indispensable que mantiene la integridad biológica de la arquitectura de la matriz extracelular y los tejidos conectivos (Lin et al., 2018). Actualmente se han identificado más de 28 diferentes tipos de colágeno, los cuales están disponibles en grandes cantidades en el tendón, la piel, la córnea, cartílago y entre otras partes del cuerpo de los seres vivos. Así mismo, cada tipo de colágeno posee una conformación estructural y características propias, las cuales son descritos en la **Tabla 2** en función a la distribución de las hélices (Lin et al., 2018; Soroushanova et al., 2018). Por otro lado, los colágenos de tipos I, III y V son los más fundamentales, ya que constituyen aproximadamente el 90 % del colágeno total en el cuerpo, con una distribución del 60 al 80 % del tipo I (Avila Rodríguez et al., 2017).

Tabla 2*Características de los tipos de colágeno, formas y distribución*

Estructura	Tipo	Fórmula molecular	Forma polimerizada	Distribución de tejidos
Formación fibrilar	I	$[\alpha_1(\text{I})]_2 \alpha_2(\text{I})$	Fibrilar	Piel, tendones, ligamentos, córnea (representan el 80-90% del colágeno total del cuerpo humano)
	II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	Fibrilar	Cartílago, disco intervertebral, humor vítreo en el ojo.
	III	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	Fibrilar	Piel, vasos sanguíneos, dermis
	V	$[\alpha_1(\text{V})]_2 \alpha_2(\text{V})$ $\alpha_1(\text{V}) \alpha_2(\text{V})$ $\alpha_3(\text{V})[\alpha_1(\text{V})]_3$	Fibrilar (ensambla con tipo I)	Tejido embrionario, dermis, hueso
	VI	$\alpha_1(\text{VI}) \alpha_2(\text{VI}) \alpha_3(\text{VI})$	Fibrilar (ensambla con tipo II)	Útero, dermis, cartílago
	VII	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$	Fibrillas de anclaje	Piel, membrana amniótica
	Fibras asociadas	IX	$\alpha_1(\text{IX}) \alpha_2(\text{IX}) \alpha_3(\text{IX})$	Asociación lateral con la fibrilla tipo II.
XII		$[\alpha_1(\text{XII})]_3$	Asociación lateral con la fibrilla tipo I	Tendón, dermis, ligamentos
XIV		$[\alpha_1(\text{XIV})]_3$	Forma cruzada unida por disulfuro	Tendón, dermis, Cartílago
Forma de red	IV	$[\alpha_1(\text{IV})]_2 \alpha_2(\text{IV})$ $\alpha_3(\text{IV}), \alpha_4(\text{IV}),$ $\alpha_5(\text{IV}), \alpha_6(\text{IV})$	Red en forma de hoja	Membranas basales
	VIII	$[\alpha_1(\text{VIII})]_2$	Estructura helicoidal interrumpida	Células endoteliales
	X	$[\alpha_1(\text{X})]_2$	Estructura tipo tapete	Cartílago calcificado

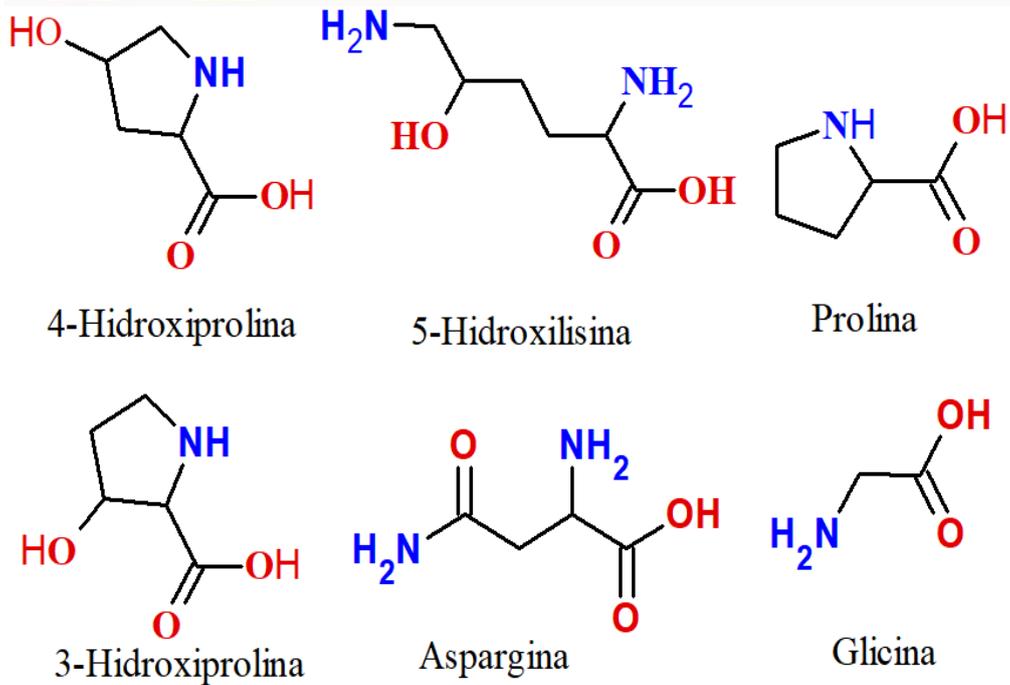
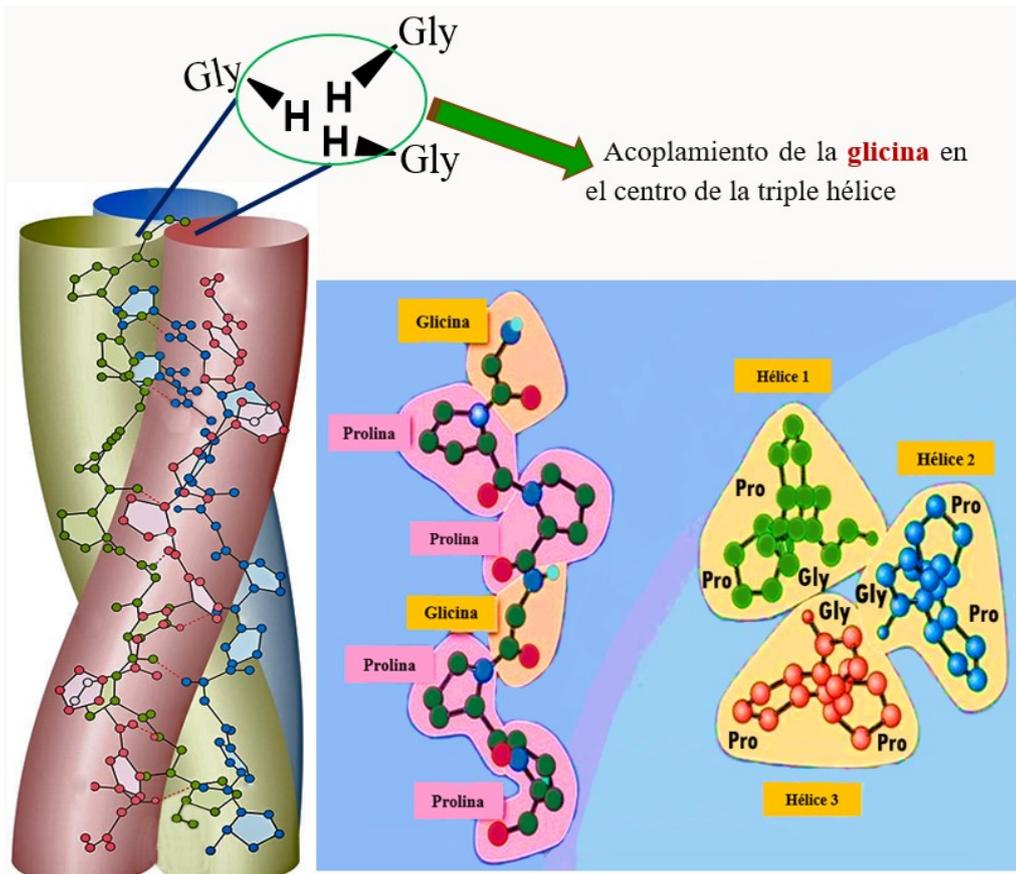
Modificado de (Lin et al., 2018; Sorushanova et al., 2018).

El colágeno juega un rol muy importante en los seres humanos principalmente por las múltiples funciones que desempeña, ya sea como soporte, elasticidad o integridad y ello radica principalmente en su conformación estructural que se presenta en la **Figura 4**. Esta se compone de una estructura jerárquicamente compleja conformada por tres cadenas polipeptídicas en forma de hélice (Lin et al., 2018). Mas aún, cada cadena polipeptídica está compuesta de aproximadamente 1000 aminoácidos que conforman una α -hélice (Sionkowska et al., 2016). Estas se caracterizan por estar constituidas por una secuencia repetida de aminoácidos cuya formulación general es concordante a $[\text{Gly-A-B}]_n$, donde la ocupación de las posiciones A y B, son ocupadas principalmente por la prolina y la hidroxiprolina respectivamente. Además, cabe mencionar que la presencia de la glicina (Gly) dentro de la estructura de triple hélice juega un rol muy importante, ya que es el único aminoácido que se ajusta bien al espacio interno hidrofóbico de las tres hélices. Como consecuencia de ello, permite que la estructura se estabilice mediante enlaces puente de hidrogeno que se generan entre el hidrogeno del grupo amino de una glicina y el oxígeno del grupo carbonilo del enlace peptídico del residuo A de la cadena adyacente (Lin et al., 2018; Sorushanova et al., 2018). Por otro lado, la estructura tridimensional que sostiene en forma de triple hélice regular, es muy similar a una cuerda con un peso molecular estándar de aproximadamente 300 kDa y una longitud de aproximadamente 280 nm y 1.4 nm de diámetro (Sorushanova et al., 2018).

Dentro de su conformación estructural, en base al colágeno tipo I se presenta en mayor cantidad en los mamíferos. Además, muestra una composición de aminoácidos, de los cuales los más característicos son la glicina con una abundancia promedio de 33 %, la prolina con 11 %, la 4-hidroxiprolina con 9 %, la hidroxilisina con 8 % y la alanina con un 11 % (Carvalho et al., 2018). Además, cabe mencionar que dicha composición es relativa ya que dependerá mucho del origen de la fuente de obtención. Así mismo, en la **Figura 4** se presenta su estructura química y la de los principales aminoácidos que juegan también un papel importante en la estructura de las α -hélice.

Figura 4

Estructura química tridimensional del colágeno y de los principales aminoácidos.



Modificado de (Botella, 2022)

A. Propiedades, características y aplicaciones

El colágeno por su conformación estructural altamente jerárquica y compleja, presenta buenas propiedades biológicas como la adhesividad, diferenciación celular, biocompatibilidad, versatilidad, baja toxicidad, baja antigenicidad, alta afinidad al agua y biodegradabilidad, además de cumplir una función de soporte y flexibilidad en el tejido dentro del cual está presente (Lin et al., 2018). Gracias a todas estas características, el colágeno se puede utilizar para fabricar películas, discos, geles, esponjas, scaffolds o materiales compuestos (composites). Por otro lado, también se ha demostrado que el colágeno hidrolizado presenta bioactividades con grandes propiedades antioxidantes, actividad antihipertensiva, actividad hipolipemiante, así como propiedades reparadoras para la piel dañada (Avila Rodríguez et al., 2017).

Por tanto, debido a las diversas propiedades mencionadas, el colágeno puede ser utilizado en una amplia gama de áreas como la industria alimentaria, la cosmética, farmacéutica, etc. Sin embargo, es usado con mayor frecuencia en la medicina, en la que se incluye los sistemas de administración de fármacos, en suturas quirúrgicas, en agentes hemostáticos y en aplicaciones de la ingeniería de tejidos como material de soporte para estudios *in vivo* e *in vitro*. También como andamios o scaffolds de bajo potencial antigénico, en aplicaciones de regeneración de piel, huesos y tendones mediante procesos de esterilización para inactivar virus y priones. Así mismo en el crecimiento de tejidos como los cartílagos, a partir de andamios electrohilados como apósitos para heridas temporales o permanentes (Carvalho et al., 2018; J. Li et al., 2018)

2.6. Alcohol polivinílico

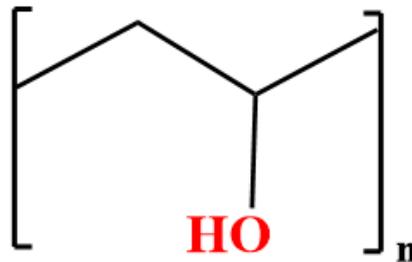
El alcohol polivinílico o polivinil alcohol (PVA), es un polímero sintético termoplástico, biodegradable, semicristalino y no tóxico. Así mismo, es un compuesto soluble en solventes polares como el agua, con un balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de 18 (Cortés et al., 2021; Jain et al., 2017). Esto debido a la presencia del grupo hidroxilo en su unidad estructural repetitiva (**Figura 5**); lo cual, además le permite ser reticulable debido a que forma enlaces puente hidrógeno interconectados entre sus cadenas (Patra et al., 2017). Por otro lado, es un compuesto polimérico que presenta una apariencia de color blanco amarillento y que llega a descomponerse a 230°C (Cabrera, 2019). Mas aún, se puede obtener mediante polimerización a través radicales desde el acetato de vinilo a poli (acetato de vinilo) (PVAc), seguida luego de un proceso de hidrólisis, a través del cual se llega a obtener finalmente el PVA (Afghan, 2016). No obstante, dependiendo del grado de hidrólisis, que suele ser entre

86 – 89 % (Shakeel. Ahmed et al., 2018), las propiedades fisicoquímicas tales como: tensión interfacial, biocompatibilidad, propiedades reológicas en solución y solubilidad en agua se verán afectadas (Cabrera, 2019).

Basado en la gran variedad de propiedades que presenta, tales como: biodegradabilidad, no-toxicidad, biocompatibilidad, alta fuerza dieléctrica y transparencia, ha sido usado en diferentes campos como: las resinas, la industria de la construcción, la industria textil, la industria del papel; así como también en materiales de empaque alimentario y la medicina en general. Es en esta última en donde ha encontrado renombradas aplicaciones en una variedad de campos de investigación como en dispositivos biomédicos artificiales, en sistemas de liberación farmacológica, entre muchas otras (Abd El-aziz et al., 2017; Deshmukh et al., 2017; Jain et al., 2017). Mas aún, es un polímero que presenta excelentes propiedades filmógenas y adhesivas. También es un emulsificante altamente efectivo y resistente a varios solventes orgánicos (el éter de petróleo, cetona, etc.), aceites y grasas. Otra de las grandes ventajas que posee su utilización, gracias a su no toxicidad y biodegradabilidad, es que puede ser empleado como material base en la agricultura o incluso en el tratamiento de aguas residuales como floculante o captador de iones metálicos (Shakeel. Ahmed et al., 2018).

Figura 5

Estructura química del PVA.



Autoría propia

2.7. Ácido húmico

El ácido húmico (HA) es un compuesto orgánico complejo de aspecto negro o marrón oscuro, obtenido a partir de la descomposición de materia orgánica como residuos de plantas y animales. Así mismo, esta sustancia está presente naturalmente en suelos, turbas (pantanos, etc.), océanos y agua dulce. No obstante, es la leonardita, un sedimento oxidado, la principal fuente de su obtención (Arif et al., 2019; Bhatt and Singh, 2022). A nivel estructural, esta sustancia contiene pequeñas, grandes y polidispersas fracciones de alquilo bencenos, grupos fenólicos, ácidos carboxílicos aromáticos, alifáticos, entre otros; los cuales están unidos a través de enlaces covalentes. Sin embargo, aún no existe una estructura definida, ya que se ha encontrado que está en general depende de las fuentes y condiciones específicas de extracción (Fatima et al., 2021).

Por otro lado, dentro de las propiedades fisicoquímicas, el HA es insoluble en ácidos fuertes, pero debido a sus características ácidas, se vuelve altamente soluble bajo condiciones alcalinas. Así mismo, gracias a su composición estructural, presenta propiedades antifúngicas, desintoxicantes, antisépticas y antioxidantes (Arif et al., 2019; Fatima et al., 2021). Adicionalmente, también puede desempeñarse como un catalizador orgánico en diferentes procesos biológicos, tales como la estimulación de las enzimas en las plantas (Bhatt and Singh, 2022). Por otra parte, el HA presenta un amplio campo de aplicación en áreas como la medicina, la avicultura, la salud, agricultura, entre muchas otras. No obstante, también puede ser usado en la remediación de suelos, agua, absorbente de gases, floculante o como un agente de expansión de catodo en baterías (Fatima et al., 2021). Así mismo debido a su naturaleza hidrofílica, este es capaz de atraer iones hidrogeno; lo cual, en áreas como la agricultura permiten que los suelos aumenten la capacidad de absorción de agua, así como también la supresión de problemas de infestación, niveles de salinidad y nutrientes (Bhatt and Singh, 2022). Ma aún, este ha sido también ampliamente usado como quelante de iones metálicos insolubles, óxidos e incluso hidróxidos. Debido a esta capacidad, muchos investigadores continúan investigando los efectos que generan en la modificación superficial de nanopartículas metálicas, la estabilidad y liberación de micronutrientes o agentes farmacológicos (Rahale et al., 2021).

2.8. Esponjas poliméricas

Las diversas formas físicas matriciales que permiten fabricar un polímero tales como los scaffolds, esponjas, espumas, films y entre otras, es muy variada. Además, hoy en día son ampliamente investigadas y aplicadas en muchas áreas de la biomedicina como la biología celular, la ingeniería de tejidos, entre otros (Soroushanova et al., 2018). Sin embargo, son las estructuras porosas tridimensionales (3D) (scaffolds, aerogels y esponjas), que debido a propiedades tales como: la baja densidad, elevada porosidad, a la gran facilidad que permiten la transferencia de masa, a la buena estabilidad morfológica y mecánica, así como también a sus características humectantes y a su alta distribución jerárquica de poros, las que han atraído un mayor interés y campo de aplicación (Jiang et al., 2020; Xu et al., 2020).

Las esponjas poliméricas, denominadas como estructuras macroporosas 3D altamente interconectadas, son matrices que poseen generalmente un ordenamiento ciertamente local. Además, son materiales que se suelen preparar a partir de soluciones o suspensiones acuosas mediante procesos de congelamiento y una posterior liofilización (Haifei Zhang, 2018). Mas aún, son matrices que han mostrado grandes ventajas al momento de tratar daños en la piel como por ejemplo los diferentes tipos de úlceras; debido a que son capaces de mantener un ambiente fisiológicamente húmedo y además pueden promover la formación del tejido de granulación (Saghazadeh et al., 2018).

De otro lado, diferentes biomateriales, especialmente de origen natural tales como el colágeno, su derivado la gelatina, alginato, quitosano y entre otros han sido utilizados para producir una gran variedad de esponjas poliméricas con aplicaciones diversas, ya sea como compósitos con otros biopolímeros o con polímeros sintéticos como el PVA. Sin embargo; son las esponjas basadas en colágeno, dada su alta biocompatibilidad, una de las de mayor interés y utilización; ya que poseen buenas propiedades mecánicas y fisicoquímicas (Saghazadeh et al., 2018). Así mismo, aunque están ligeramente limitadas por sus pobres propiedades antibacterianas, han sido parcialmente superadas mediante la incorporación de moléculas bioactivas, tales como los fármacos, extractos, entre otros (Duan et al., 2017). Por otro lado, dentro de la gran variedad de aplicaciones que han encontrado, son las matrices tridimensionales tales como las esponjas y/o scaffolds, las que han sido ampliamente empleadas como absorbente de disolventes, en cultivos celulares, en la separación de agua y aceite, aislamiento térmico y acústico y principalmente como portadores para fármacos y soportes de catalizadores (Jiang et al., 2020).

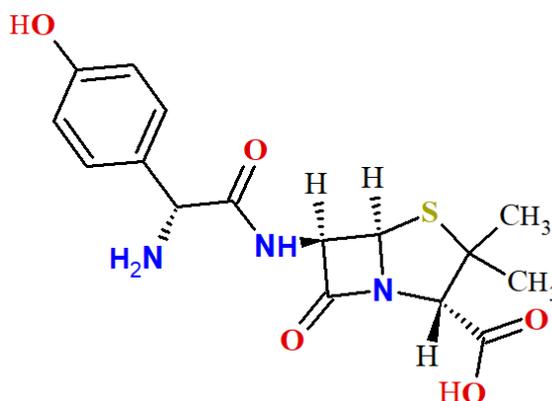
2.9. Amoxicilina

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, se han desarrollado y descubierto un sin número de diferentes antibióticos con propiedades y características similares, los cuales han sido clasificados como agentes bioactivos penicilínicos (de Marco et al., 2017). Dentro de esta familia se encuentra a la amóxicilina (AMX), uno de los tantos derivados del ácido 6-aminopenicilínico (6-APA) (Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017). Este compuesto farmacológico, es un antibiótico β -lactámico semisintético con un amplio espectro y de alta efectividad contra organismos grampositivas y gramnegativas (Aziz et al., 2022; Thambavita et al., 2017). Por otro lado, a pesar de ser uno de los antibióticos con propiedades antibactericidas más antiguos, aún sigue siendo uno de los más prescritos en el mundo de la medicina. Asimismo, ha reportado ser más activa *in vitro* que la ampicilina, especialmente contra cepas de bacterias tales como el *Enterococcus fecalis*, *Helicobacter pylori*, entre otras; aunque menos activa contra la *Shigella spp* (Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017).

Químicamente la amoxicilina también es conocida como el ácido 6- [D (-) β -amino-p-hidroxifenil-acetamido] penicilínico. Sin embargo, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se le conoce como ácido (2S,5R,6R)-6- {[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetil] amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico, cuya estructura se muestra en la **Figura 6**. De otro lado, debido a sus buenas propiedades antibacterianas, es aplicado para tratar infecciones como las de tracto respiratorio leve, la otitis media, la profilaxis del endocardio, entre muchas otras. Así mismo, también es utilizada como parte del tratamiento en infecciones de la *Helicobacter pylori* (Thambavita et al., 2017), o como fármaco de primera elección para el tratamiento de la sinusitis maxilar (de Marco et al., 2017).

Figura 6

Estructura química de la amoxicilina.



Adoptado de (Aziz et al., 2022)

A. Propiedades fisicoquímicas

La amoxicilina como sustancia farmacológicamente activa se encuentra disponible en tres presentaciones distintas: anhidra, sódica y trihidratada (de Marco et al., 2017). Este derivado del 6-APA, es una sustancia muy soluble en agua, ligeramente en etanol absoluto (Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017) y anfótera (Thambavita et al., 2017), con una apariencia de polvo blanco cristalino y un punto de fusión de 194 °C. Mas aún, en forma trihidratada es parcialmente soluble en agua y prácticamente insoluble en cloroformo, éter y aceites grasos (Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017). Sin embargo, es soluble en soluciones diluidas de ácidos e hidróxidos alcalinos, así mismo dicha solubilidad puede verse incrementada con el aumento de la fuerza iónica y la temperatura del medio. De otro lado, aproximadamente 1.15 g de esta sustancia trihidratada equivale a 1g de su forma anhidra, con un peso molecular de 365.41 g mol⁻¹. Pero en cuanto a estabilidad se refiere, en soluciones acuosas diluidas, presenta una cinética de degradación de primer orden o de orden cero, exhibiendo una tasa mínima de desintegración a pH 6. Sin embargo, para la amoxicilina trihidratada y en soluciones buffer a concentraciones menores a 5x10⁻³ mol L⁻¹, ha mostrado seguir una degradación de primer orden (Thambavita et al., 2017).

B. Mecanismo de acción

Los antibióticos β-lactámicos tales como la amoxicilina, son compuestos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano. Este es uno de los principales constituyentes de la pared celular bacteriana, cuyo déficit conlleva a la ruptura de su estructura (Aziz et al., 2022; de Marco et al., 2017). Por otro lado, uno de los principales atributos de los

antibióticos como la amoxicilina, es la gran capacidad que poseen para unirse a proteínas específicas fijadoras de la penicilina, llamadas *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs) (de Marco et al., 2017). Las cuales son responsables de inhibir el proceso conocido como transpeptidación y cuyo fin es la activación de las enzimas autolíticas en la pared celular bacteriana, que traen como consecuencia la ruptura de esta (Akhavan BJ, Khanna NR, 2022). Si bien la amoxicilina es un antibiótico β -lactámico, en ocasiones no resiste la acción hidrolítica de las β -lactamasas de muchas bacterias como los estafilococos, responsables de infecciones en la piel o tracto urinario. Por tanto, es común que no se use en el tratamiento de este tipo de infecciones como fármaco principal, sino que se suele combinar con algún inhibidor β -lactámico más potente tales como el ácido clavulánico (Akhavan BJ, Khanna NR, 2022; de Marco et al., 2017)

C. Farmacocinética

La amoxicilina es un fármaco que presenta buena estabilidad en medio ácido, así como en la presencia de jugos gástricos, razón por la cual es principalmente administrada por vía oral ya que muestra una biodisponibilidad de 70-92 %. Mas aún, es rápidamente absorbida, alcanzando máximos de concentración de plasma entre 1-2 h después de ser suministrada (de Marco et al., 2017; Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017). Por otro lado, debido a sus características fisicoquímicas puede difundirse adecuadamente en tejidos como el hígado, pulmones, la glándula prostática y el músculo. Así mismo, en líquidos sinoviales, pleural y amniótico (de Marco et al., 2017). Sin embargo, no es capaz de difundirse a través del tejido cerebral ni del líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los antibióticos bactericidas como la amoxicilina, son fármacos dependientes del tiempo ya que su acción terapéutica está estrechamente relacionada con el período durante el cual la concentración del fármaco se encuentra por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Patini et al., 2020). Así por ejemplo se ha demostrado en estudios microbiológicos que la amoxicilina es activa contra la *Escherichia coli* ($MIC_{50} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Clostridium* ($MIC_{50} = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Lactobacillus* ($MIC_{50} = 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y *Streptococcus suis* ($MIC_{50} = 0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Thambavita et al., 2017). Por otro lado, se ha encontrado también que es débilmente procesado por el hígado, aproximadamente el 30 % del total suministrado. Mientras que el 50 - 80 % restante es principalmente excretado a través de la vía urinaria dentro de las 6-8 h posteriores a su administración (Aziz et al., 2022; Promoting the Quality of Medicines (PQM), 2017)

Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación se utilizó como fuente de colágeno tipo I, el tendón de bovino, obtenido en el centro comercial “Vara de Oro” (San Juan de Lurigancho - Lima, Carnicería “Narcisa”), hidróxido de potasio (KOH, pureza ≥ 99 %), hidróxido de sodio (NaOH, pureza ≥ 99 %), ácido bórico (H_3BO_3 , pureza ≥ 99 %), sulfato de calcio dihidratado ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$, pureza ≥ 99 %), cloruro de sodio (NaCl, pureza ≥ 99 %), cloruro de potasio (KCl, pureza ≥ 99.65 %), hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$, pureza ≥ 96 %), sulfato de sodio (Na_2SO_4 , pureza ≥ 99 %), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, pureza ≥ 99 %), ácido acético glacial (CH_3COOH , pureza ≥ 99.8 %), sal de acetato de zinc dihidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, pureza ≥ 99 %), ácido húmico (HA, pureza ≥ 99 %, CAS:1415936), polivinil alcohol (PVA, pureza ≥ 99 %, CAS:9032895), etanol absoluto, dimetilsulfóxido (DMSO) y el fármaco amoxicilina (AMX, potencia ≥ 900 mg mg^{-1} , Lot:108M4892V). Todos los reactivos mencionados fueron obtenidos desde Merck-Sigma Aldrich.

3.1.2. Equipos

Los equipos utilizados en la realización del trabajo, ya sea como parte del proceso o en la caracterización fueron: liofilizador (Macrom-Labconco, modelo 117A65312906), ultracongeladora (Binder, modelo UF-V500), espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR-ATR, Bruker, Alpha II), equipo de calorimetría diferencial de barrido - termogravimetría (Perkin Elmer, serie 016070105, STA-6000), ultrasonicador de punta (Branson SFX-250, modelo:102C (CE) /Convertidor), Schiller (Daihan Scientific-Bath Circulator, Modelo: Maxircu CR-8), espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-1800), microscopio electrónico de barrido (SEM, Hitachi SU8230), difractómetro de rayos-X (DRX, Philips 1830), espectrómetro Raman (Horiba , Modelo Xplora), un analizador de dispersión dinámica de la luz, (DLS, Brookhaven 90 Plus) y un equipo de medida viscosimétrica (Fungilab, Eagle Plus).

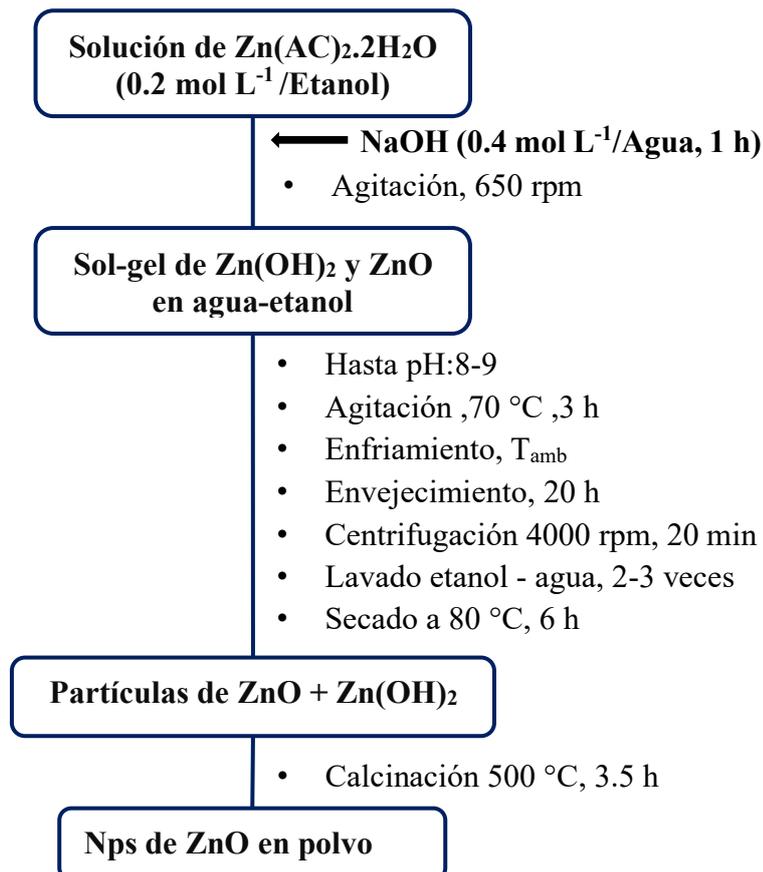
3.2. Procedimiento Experimental

3.2.1. Síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc

Según la metodología adaptada de (Hezma et al., 2019; Manikandan et al., 2018), las Nps de ZnO fueron preparadas a través del método sol-gel (**Figura 7**), a partir del precursor acetato de zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de Sodio (NaOH). Para ello, primero se preparó una solución de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mol L^{-1} en etanol mediante agitación por un periodo de 30 min. Así mismo, también se preparó una solución de NaOH 0.4 mol L^{-1} en agua mediante agitación durante 1 h. Posteriormente, la solución de NaOH fue agregada lentamente mediante goteo sobre la solución de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, manteniendo una velocidad de agitación de 650 rpm. El NaOH se adiciono hasta obtener un sol-gel de aproximadamente pH 9. Asimismo, el sol se agito luego durante 3 h, manteniéndose una temperatura durante toda la síntesis de $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente el sol fue dejado en reposo para envejecimiento por un periodo de 20 h, luego centrifugado por 20 min a 4000 rpm y lavado en etanol-agua por tres veces. El producto final fue secado a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 h y calcinado a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ por un periodo de 3.5 h.

Figura 7

Proceso de síntesis de las nanopartículas de ZnO.

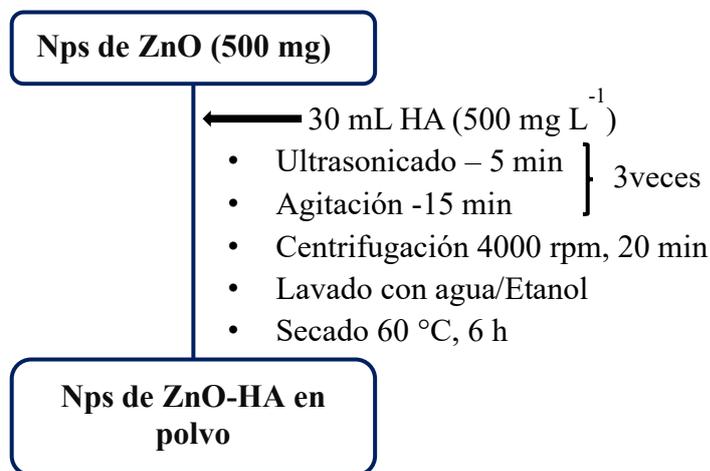


3.2.2. Funcionalización de las nanopartículas de ZnO

La funcionalización de las Nps de ZnO se llevó a cabo mediante el proceso adaptado de (Mahdavi et al., 2018), tal como se presenta en la **Figura 8**. Primero se preparó una solución de HA de 500 mg L^{-1} ; para lo cual, se disolvió 500 mg de HA en solución de hidróxido de sodio 0.1 mol L^{-1} a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante agitación durante 2 h. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7 y se almacenó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. No obstante, debido a la ligera precipitación de la solución, esta fue agitada y filtrada antes de cada uso. Posteriormente, 500 mg de ZnO en 30 mL de HA fue dispersado durante 5 min en un ultrasonicador de punta a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, luego agitado por un periodo de 15 min a 500 rpm, el proceso se realizó por triplicado. Subsecuentemente, las nanopartículas funcionalizadas con HA se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, haciéndose lavados en etanol - agua por tres veces. Finalmente, el producto sólido (ZnO-HA) fue separado y secado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 h.

Figura 8

Proceso de funcionalización de las Nps de ZnO.



Autoría propia

3.2.2.1. Eficiencia de funcionalización de las Nps de ZnO

La determinación de la eficiencia de funcionalización (EEF) de las Nps de ZnO con HA se llevó a cabo mediante técnica espectroscópica UV-visible y a través de curva de calibración (ver anexo 1). Para ello, primero se realizó la curva de calibración del HA con seis niveles de concentración entre $2 - 30 \text{ mg L}^{-1}$ y a 236.5 nm . Por otro lado, el remanente líquido del producto final de la funcionalización del ZnO, fue filtrado y luego analizado mediante ultravioleta-visible por cuadruplicado. Posteriormente, la concentración fue

determinada a través de la curva de calibración. La eficiencia porcentual de funcionalización fue determinada mediante la ecuación (1):

$$EEF (\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} * 100 \dots\dots\dots (1)$$

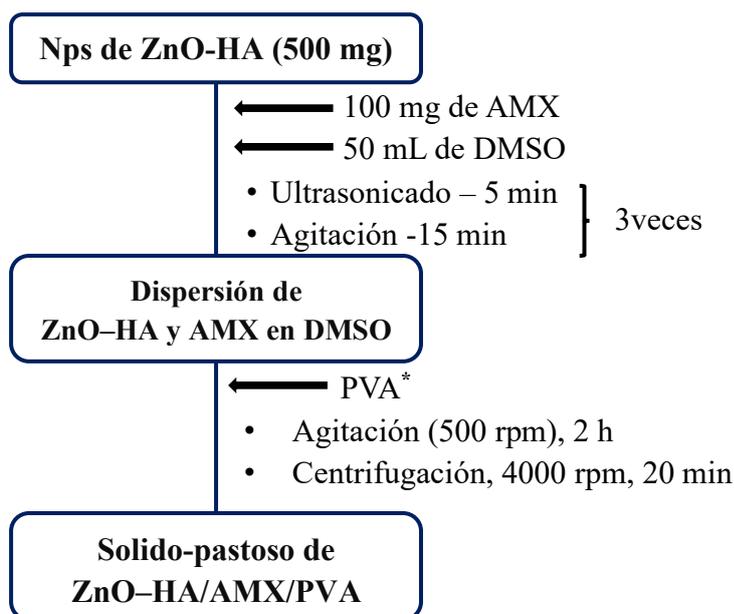
Donde: M_0 , es la masa inicial del HA usado en la funcionalización y M_1 , la masa obtenida por UV-Visible del remanente líquido después de la funcionalización.

3.2.3. Cargado de la amoxicilina en las nanopartículas de ZnO-HA

El cargado de la AMX en las Nps de ZnO funcionalizadas con HA, se realizó a través del método de emulsión aceite en agua (O/W), adaptado de (G. Murugesan et al., 2018) (Figura 9). Para ello, primero se preparó una solución de PVA, para la cual se disolvieron 120 mg en 50 mL de agua durante 1 h a 90 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A la par, 500 mg de Nps de ZnO-HA junto a 100 mg de amoxicilina en 50 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), se ultrasónico durante 5 min en un sonicador de punta a 25 °C, luego agitado por 15 min a 500 rpm, el proceso se repitió dos veces más. La dispersión de las Nps de ZnO-HA junto al fármaco fue agregada mediante goteo sobre la solución acuosa de PVA con agitación continua de 500 rpm, posteriormente se agito por 2 h más. Por último, la mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 min, obteniéndose finalmente un sólido-pastoso (ZnO-HA/AMX/PVA), el cual fue guardado para ser incorporado luego dentro de la matriz polimérica.

Figura 9

Cargado de la amoxicilina en las Nps de ZnO-HA.



Autoría propia

Nota: *La dispersión de ZnO-HA/AMX se agregó sobre la solución de PVA por goteo.

3.2.3.1. Eficiencia de cargado de la amoxicilina en las Nps de ZnO-HA

La determinación de la eficiencia de cargado (EEC) de la AMX sobre las Nps de ZnO-HA, se llevó a cabo mediante técnica espectroscópica UV-visible, a través de la curva de calibración del fármaco. Para ello, primero se realizó la curva de calibración de la AMX en buffer de fosfatos a pH 7.4 (ver anexo 2) y con siete niveles de concentración en el rango de 4 – 40 mg L⁻¹ y a 228.5 nm de longitud de onda. Así mismo el blanco se preparó mediante el mismo proceso descrito en el ítem 3.2.3, pero sin el fármaco. Por otro lado, el remanente líquido del producto final del cargado del fármaco, fue filtrado y luego analizado mediante ultravioleta-visible por cuadruplicado. Posteriormente, la concentración fue determinada a través de la curva de calibración. La eficiencia porcentual de cargado fue determinada a través de la ecuación (2):

$$EEC (\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} * 100 \dots\dots\dots (2)$$

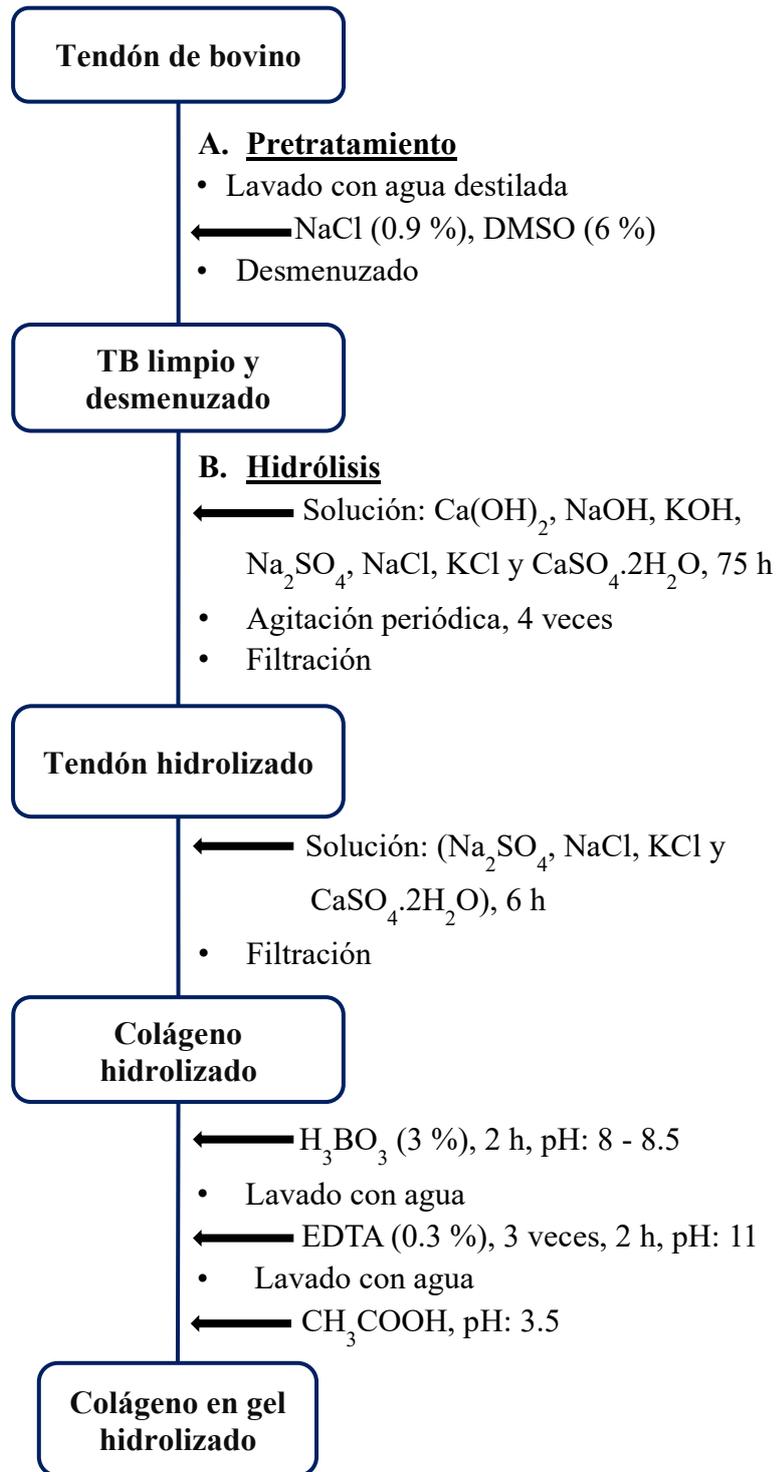
Donde: **M₀**, es la masa inicial de la AMX usada en el proceso de cargado y **M₁**, la obtenida por UV-Visible del remanente líquido después del cargado del fármaco.

3.2.4. Obtención de colágeno aniónico Tipo I

Según el método modificado de (Chaudry et al., 2017), el colágeno se obtuvo por hidrólisis alcalina, tal como se muestra en la **Figura 10**. Para ello, se comenzó a partir del tendón de bovino (TB) (131.74 g), el cual fue previamente lavado en agua destilada, luego tratado con una solución acuosa de cloruro de sodio 0.9 % y Dimetilsulfóxido (DMSO) 6 %. Posteriormente se desmenuzo y se pasó a realizar la primera etapa de la hidrólisis en una solución acuosa que consistió en Ca(OH)_2 , NaOH, KOH y sales de Na_2SO_4 , NaCl, KCl y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Esto durante un período de 75 h con agitación ocasional de aproximadamente 4 veces por día. Luego, la muestra fue filtrada y colocada en una segunda solución por un periodo de 6 h. Esta solución estuvo constituida por sales de Na_2SO_4 , NaCl, KCl y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La muestra fue filtrada nuevamente y puesta en una solución de ácido bórico (H_3BO_3) 3 % durante 2 h, a fin de remover los residuos de las sales. El proceso se repitió hasta verificar que el pH de la solución oscile entre 8 – 8.5. Posteriormente se repitió el mismo proceso con agua destilada y luego con solución de EDTA 0.3 % ajustado a pH 11 con el propósito de remover el calcio. Subsecuentemente, la muestra hidrolizada fue lavado con agua destilada durante 6 veces y con intervalos de 2 a 3 h. Finalmente, el tendón hidrolizado y lavado fue colocado en una última solución de ácido acético a pH 3.5, tantas veces hasta que el pH permanezca constante; finalmente se obtuvo el colágeno aniónico en gel (HCG).

Figura 10

Proceso de obtención de colágeno aniónico tipo I.



Autoría propia

3.2.5. Preparación de las matrices híbridas

La preparación de la matriz compósito, se llevó a cabo mediante el proceso adaptado de (Wang et al., 2018) (**Figura 11**). Para ello, primero se disolvió durante 48 h y a 400 rpm, 7.400 g de gel de HCG en 100 mL de solución de ácido acético glacial (HAC) a pH 3.5. Posteriormente, se preparó una solución de PVA de concentración 0.2 % (m/v), para lo cual se disolvió 200 mg del compuesto en 80 mL de agua durante 1 h y a 90 °C, que después de enfriar a temperatura ambiente fue enrazada a 100 mL. Sucesivamente, 5.7 mL de esta última solución se mezcló con 13.3 mL de la solución de HCG, de tal manera que se obtuvo ratios en relación de masa de 70:30 (HCG/PVA = M1). La mezcla luego fue homogenizada mediante agitación a 500 rpm durante 3 h, después de ello se agregó cierta cantidad o volumen de un compuesto específico (CX), de tal manera que se obtenga seis matrices diferentes, según lo descrito en la **Tabla 3**. Posteriormente, se agito durante 15 min y se ajustó el pH a 3.5 con NaOH (1.0 mol L⁻¹) o HCl (1.0 mol L⁻¹), luego en un baño de agua a 30 °C se agito el sistema durante 24 h a 200 rpm; esto con el fin formar la primera red de la mezcla polimérica. Finalmente, se congelo a -10 °C por 18 h y se descongelo durante 4 h a temperatura ambiente, el proceso se realizó por triplicado para formar la doble red. Posteriormente, se congeló la muestra a -70 °C y se liofilizó por 48 h a - 50 °C y 0.08 mbar, obteniéndose así las esponjas.

Tabla 3

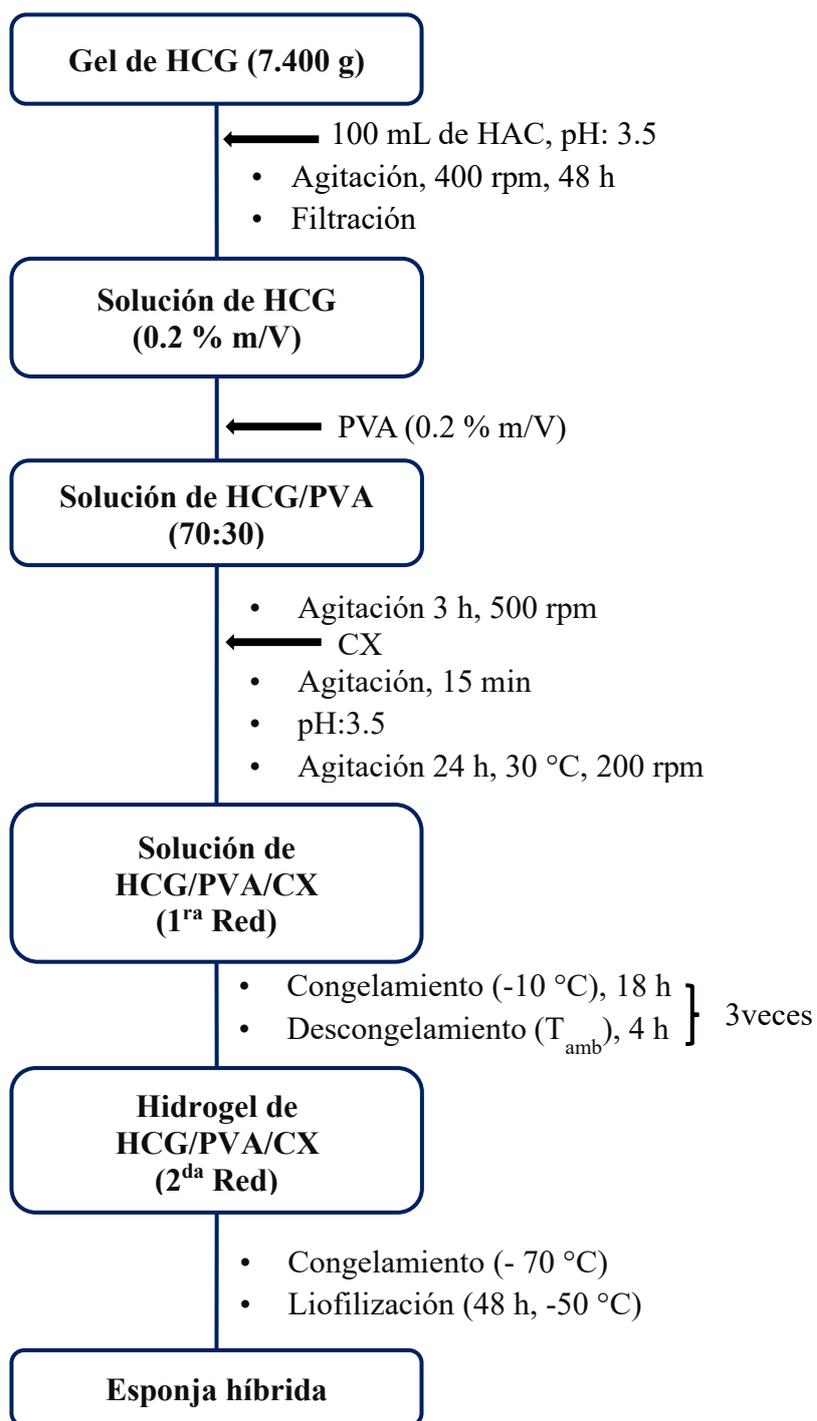
Especificaciones consideradas para la preparación de las matrices en forma de esponja

COD	Esponja	Compuesto (CX)	AMX (mg)	ZnO-HA (mL)	ZnO-HA/AMX (mL)
M1	HCG/PVA		0	0	0
M2	HCG/PVA/ZnO-HA		0	5	0
M3	HCG/PVA/AMX		1	0	0
M4	HCG/PVA/AMX/ZnO-HA		1	5	0
M5	HCG/PVA ZnO-HA/AMX		0	0	5
M6	HCG/PVA/AMX ZnO-HA/AMX		1	0	5

Nota. Las Nps de ZnO-HA y ZnO-HA/AMX fueron dispersados por ultrasonificación-Agitación y 30 segundos en un ultrasonificador de punta respectivamente a 25 °C y agregado por goteo.

Figura 11

Proceso de preparación de las matrices en forma de esponja



Autoría propia

3.2.6. Caracterizaciones

3.2.6.1. Espectroscopía Infrarroja

Las mediciones espectroscópicas (FTIR-ATR) se llevaron a cabo con el fin de identificar los diferentes cambios vibracionales de los grupos funcionales presentes en las muestras obtenidas, estas se realizaron en el laboratorio de investigación LABINFIS con un espectrómetro Alpha II - Bruker equipado con un módulo de Platino ATR, en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Se registraron un mínimo de tres espectros las muestras obtenidas. El tratamiento y evaluación de los espectros se realizó a través del programa ORIGIN PRO - 2021.

3.2.6.2. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), se llevó a cabo con el objetivo de conocer la transición térmica o temperatura de desnaturalización (T_D) del colágeno. El análisis se realizó en el laboratorio de investigación LABINFIS mediante un equipo de termogravimetría STA 6000, según el método de Tan & Chang, (2018) con algunas modificaciones. Para ello, ~ 5 mg de colágeno liofilizado fue rehidratado en una solución de ácido acético 0.1 mol L^{-1} a pH 3.5 durante 4 h. Esto se realizó con el fin de obtener valores calorimétricos reproducibles tanto para la temperatura como para la entalpía de desnaturalización. La muestra fue colocada en una bandeja de aluminio estándar y calentado en el rango de 35 a 200 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, con purga constante de nitrógeno de 20 mL min^{-1} .

3.2.6.3. Microscopía electrónica de barrido

Los microgramas SEM de las Nps de ZnO, ZnO-HA y de las matrices compósito en forma de esponja, fueron llevadas a cabo con el propósito de analizar las características morfológicas de las muestras. Los análisis fueron realizados en el centro para el desarrollo de materiales avanzados y nanotecnología (CEMAT), en un equipo de microscopía electrónica de barrido (SEM, Hitachi SU8230). Para la obtención de los microgramas, en el caso de las Nps, se depositaron microgotas dispersadas en agua sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono y se permitió que el solvente se evaporara; mientras que las esponjas liofilizadas fueron recubiertas mediante pulverización con una capa ultrafina de carbón (grafito) antes del análisis microscópico. Por otra parte, todos los microgramas fueron analizados mediante el programa "ImageJ 1.53t".

3.2.6.4. Dispersión dinámica de la luz

El tamaño hidrodinámico de las Nps sintetizadas se llevó a cabo mediante caracterización por dispersión dinámica de la luz (DLS), en un equipo Brookhaven 90 Plus, en el laboratorio de investigación GISMA. Para ello, las muestras de las Nps ZnO y ZnO-HA de concentración 50 mg L⁻¹ fueron dispersadas en un ultrasonicador de punta Branson SFX-250, modelo:102C (CE)/ Convertidor, durante 5 min a 25 °C y posteriormente agitado por 15 min, repitiéndose el proceso por triplicado. Finalmente, la muestra se centrifugo a 1000 rpm durante 5 min y se tomó el sobrenadante. Subsecuentemente, la muestra fue analizada a 658 nm, 90° y con índice real e imaginario de 1.9564 y 0.008 respectivamente.

3.2.6.5. Difracción de rayos X

Los patrones cristalográficos y el tamaño de cristal promedio de las Nps de ZnO y ZnO-HA fueron obtenidas mediante difracción de rayos-X (DRX) en el laboratorio de investigación LABINFIS, mediante un equipo Philips 1830. Para ello, aproximadamente 0.5 g de las Nps molidas y secas fueron colocadas en el portamuestras del equipo y realizado las medidas en un rango 2θ entre 25 - 70°, λ (Cu-Kα): 0.154184 nm, 30 kV, 10 mA y velocidad de 3° min⁻¹. No obstante los difractogramas de las Nps ZnO fueron comparados con el patrón estándar JCPDS: 96-210-7060 (ver Anexo 5) de la base de datos para materiales inorgánicos. Por otro lado, el tamaño promedio del cristal para las Nps fue determinado mediante la ecuación (3) de Debye-Scherrer (Manikandan et al., 2018):

$$D = \frac{K\beta\cos(\theta)}{\lambda} \dots\dots\dots (3)$$

Donde: D es el tamaño del cristalito en nm, K es el factor de forma que vale 0,94, λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X, β es la mitad de la intensidad máxima de ancho completo (FWHM) y θ es la medida del ángulo de Bragg.

3.2.6.6. Raman

La obtención de los espectros Raman se llevaron a cabo en el laboratorio de investigación GIEA, con un equipo de espectroscopía Raman (Horiba, Xplora) con fuente láser de longitud de onda 532 nm y en el rango de 200 a 1200 cm⁻¹. Los análisis fueron realizados con el fin de estudiar los cambios vibracionales producidos en la red reticular de las Nps de ZnO y ZnO – HA como consecuencia de la modificación superficial.

3.2.6.7. Masa molar viscosimétrica

La determinación de la masa molar del colágeno fue realizada en laboratorio de investigación LIBIPMET mediante viscosimetría, en un viscosímetro de Oswald (Cannon, L920) inmerso en un termostato Fungilab-Eagle Plus. Para ello, se preparó una solución patrón de colágeno al 0.15 % (m/V) en solvente ácido acético 0.15 mol L⁻¹. De esta, se prepararon 6 soluciones con diferente concentración entre 0.02 - 0.12 % (m/V). Las medidas fueron realizadas por quintuplicado para cada dilución a 24.8 °C. Asimismo para la determinación de la masa molar se utilizó la ecuación (4) de Mark – Houwink – Sakurada, cuyas constantes específicas propias de cada polímero o proteínas, toma valores de k: 1.23*10⁻⁹ y α:1.8 para el colágeno (Staicu et al., 2015).

$$[\eta] = k (\bar{M}_v)^\alpha \dots\dots\dots (4)$$

Donde: η, es la viscosidad media de la sustancia y \bar{M}_v , la masa molar Viscosimétrica promedio.

3.2.6.8. Capacidad de absorción en agua o grado de hinchamiento

El grado de hinchamiento (H (%)) para cada una de las matrices híbridas o compósito se determinó mediante el monitoreo de los cambios de masa en una solución buffer de fosfatos (PBS; pH 7.4), a 37 °C con agitación suave. Para lo cual, después de cada cierto tiempo se retiró la muestra de la solución, se eliminó el exceso de agua con papel filtro suavemente y se calculó la absorción de agua según el método de Lee y Chen's y mediante la ecuación (5) (Coelho et al., 2017; Iqbal et al., 2018).

$$H (\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} * 100 \dots\dots\dots (5)$$

Donde: M₀, proporciona el peso inicial de las esponjas y M₁ el peso después de la absorción de agua o solución acuosa (buffer de fosfatos pH 7.4).

3.2.6.9. Porosidad

La porosidad de las matrices (P (%)) fue realizada mediante inmersión en etanol absoluto hasta alcanzar la saturación por un periodo de 60 min. Las muestras fueron pesadas antes y después de la inmersión, por lo cual, luego la porosidad fue determinada mediante la ecuación (6) (Khani et al., 2018):

$$P (\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{\rho V_1} * 100 \dots\dots\dots (6)$$

Donde: M₀ y M₁ son el peso de las muestras antes y después de ser inmersas en etanol respectivamente; V₁ es el volumen de la muestra antes de la inmersión y ρ representa la densidad del etanol.

3.2.7. Estudio de la liberación del fármaco desde la matriz compósito

3.2.7.1. Curva de calibración de la amoxicilina

Con el objetivo de evaluar la capacidad que tienen las esponjas como sistema de liberación farmacológica. Previamente se realizó la curva de calibración de la AMX en buffer de PBS a pH 7.4. Por ende, se preparó una solución estándar de AMX de una concentración de 500 mg L⁻¹, de la cual se preparó otra de 100 mg L⁻¹. De esta última se tomaron 7 alícuotas diferentes (**Tabla 4**) y se vertieron en fioles con volumen nominal de 10 mL, aforándose luego con solución buffer. Finalmente, se realizó un barrido espectral a fin de determinar experimentalmente el punto de máxima absorbancia, siendo 228.5 nm. Posteriormente, a esta longitud de onda fueron leídos los 7 niveles de concentración mediante método fotométrico por espectroscopía UV-Visible y obteniéndose finalmente la curva la calibración (ver anexo 2).

Tabla 4

Parámetros de preparación para la curva de calibración de la AMX

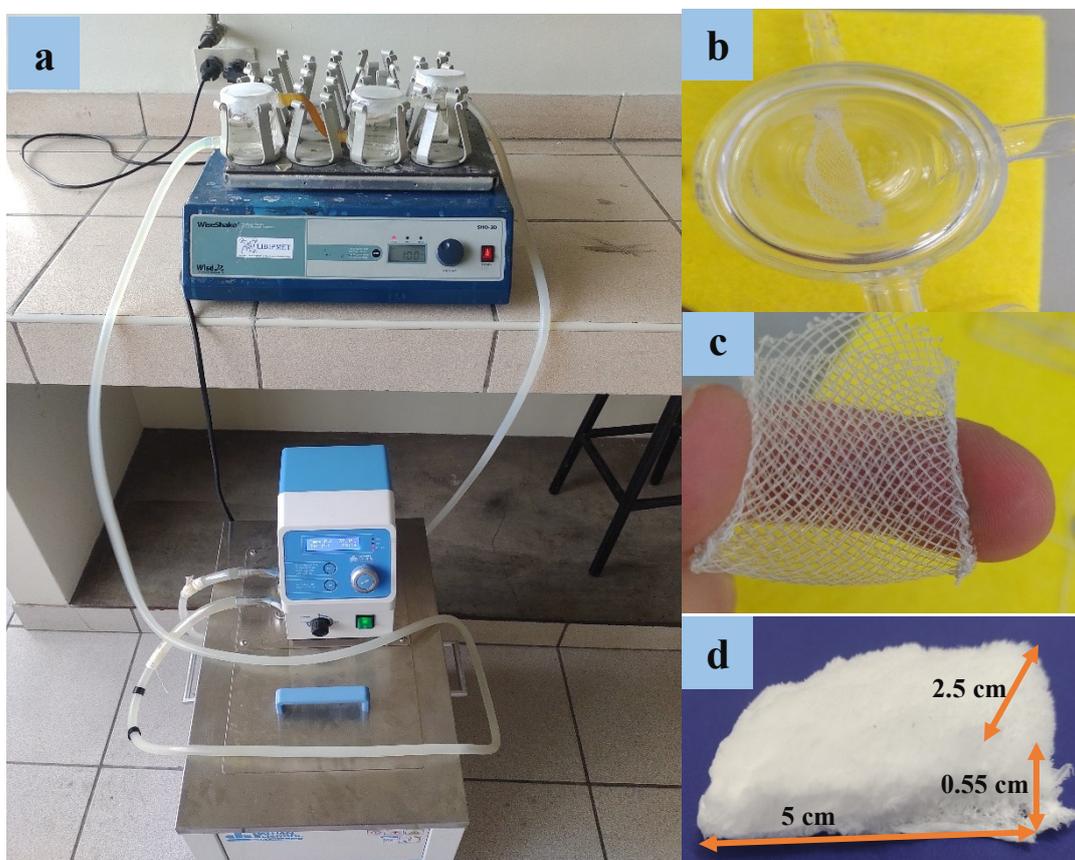
Estándar	Volumen de alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (mg L ⁻¹)
STD1	0.4	10	4.0
STD2	1.0	10	10.0
STD3	1.6	10	16.0
STD4	2.2	10	22.0
STD5	2.8	10	28.0
STD6	3.4	10	34.0
STD7	4.0	10	40.0

3.2.7.2. Liberación de la AMX desde las matrices híbridas

La liberación del fármaco AMX fue evaluada desde las matrices M3, M4, M5 y M6 en medio buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4. El estudio fue llevado a cabo a 37 °C, regulado la temperatura con la ayuda de un Schiller y con agitación continua (100 rpm) en un Shaker (**Figura 12 (a)**). Para ello, las matrices de ~5 cm x 2.5 cm x 0.55 cm (largo, ancho y alto), fueron colocadas dentro de una bolsa pequeña, está dentro de una chaqueta de vidrio en un volumen de 75 mL de PBS, tal como se muestra en la **Figura 12 a), b) y c)**. Posteriormente, en intervalos regulares de tiempo, se tomó alícuotas de 2 mL desde el medio de liberación; los cuales, luego de ser analizados en un espectrómetro UV-Visible a 228.5 nm fueron luego devueltos. Los análisis fueron realizados por triplicado y las concentraciones fueron determinadas mediante la curva de calibración realizada en el ítem 3.2.7.1.

Figura 12

a) Equipo de sistema de liberación (shaker y Schiller), b) chaqueta, c) Bolsita para matriz y d) características físicas de la matriz.



Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados

4.1. Nanopartículas

4.1.1. Síntesis y modificación

Hoy en día existen una gran variedad de métodos que se suelen utilizar para obtener Nps, tales como el método por microemulsión, precipitación, hidrotérmico, microondas, entre otros. No obstante, en el presente trabajo se usó el método sol-gel para obtener Nps de ZnO. Esto debido a que es una de las rutas más sencillas, de bajo costo e industrialmente viables para sintetizar Nps a baja temperatura. Además, permite tener una alta homogeneidad, un buen control sobre la composición química, mayor uniformidad estructural y una alta pureza del producto final (al Abdullah et al., 2017; Manikandan et al., 2018; Naveed UIHaq et al., 2017). Por otra parte, durante el proceso de síntesis (Ver anexo 3), acontecen una serie de reacciones químicas. Donde la sal precursora ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disuelto en etanol), reacciona continuamente por la adición del NaOH (disuelto en agua), hasta un pH de 9 y a 70°C ; lo cual finalmente resulta en la formación de un sistema coloidal de ZnO y en pequeñas cantidades de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ de aspecto blanquecino (Hasnidawani et al., 2016).

Los solventes, dentro de los procesos de síntesis de nanomateriales como las Nps, desempeñan un rol crucial; ya que estos proveen el medio de control para la temperatura. Además, dependiendo de las características polares, afectan el proceso de nucleación y crecimiento del producto final; que en consecuencia definen el tamaño y forma de las Nps como el ZnO. Por ende, en este estudio se utilizó como medio etanol-agua, ya que el etanol debido a sus propiedades de deshidratación previene la formación de hidróxido de Zinc. Mientras que el agua, evita que la hidrólisis de la sal precursora sea lenta y consecuentemente que el exceso de NaOH genere mayor hidróxido intermediario ($\text{Zn}(\text{OH})_2$). De hecho, se ha reportado que, en condiciones similares a lo mencionado, la mezcla agua- etanol ha permitido obtener Nps con muy buen rendimiento y adecuadas características fisicoquímicas (Cao et al., 2019; Ungula and Dejene, 2016). Por otra parte, condiciones como el pH y la temperatura utilizados, son factores determinantes durante la síntesis de las Nps, ya que en el caso del pH contribuye con la hidrólisis de la sal precursora. Así como también en la condensación durante la formación del gel y en la morfología que conlleva a tener el ZnO. No obstante, la temperatura, al igual que el pH, es necesaria ya que facilita el movimiento de los iones, permitiendo así la obtención del producto deseado (ZnO) (Siswanto et al., 2017). Finalmente, la calcinación a altas temperaturas como la llevada a cabo a 500°C , permite asegurar una alta

pureza, homogeneidad cristalina y convertir los hidróxidos intermediarios residentes a óxidos, entre otros.

La funcionalización o modificación superficial de Nps de ZnO, es un proceso de gran utilidad, ya que permite darle a estos materiales nuevas y mejores funcionalidades. Así mismo, mejorar sus propiedades químicas y biológicas, también, minimizar los efectos toxicológicos, ya que se ha evidenciado que la interacción directa de estos con las células, induce a una mayor citotoxicidad (Ali et al., 2020). En consecuencia, pueden mejorar las propiedades bioactivas tales como las antibacterianas o incluso servir como sistema para la encapsulación de principios activos muy pocos solubles o insolubles en agua. Esto, debido a que la modificación superficial facilita una mejor interacción del fármaco con la superficie de la Nps (L. Li et al., 2020). No obstante, existen diferentes métodos, tales como el asistido por microondas, sonicación, etc. Sin embargo, en el presente trabajo se usó un método alternado, entre la ultrasonicación y la agitación (ver anexo 4). Puesto que la ultrasonicación permite tener a las Nps altamente dispersas y en mejor interacción con las moléculas del HA; mientras que la agitación facilita su ordenamiento sobre la superficie del ZnO. Además, la combinación de ambos métodos permitió obtener una eficiencia de funcionalización de 1.79 % (m/m), mucho mayor en comparación a resultados de ensayos previos de ~0.60 %, asistido únicamente por agitación. Por otra parte, la encapsulación de la AMX en las Nps modificadas con HA, se llevó a cabo mediante método de emulsión aceite en agua (O/W). De esta manera, el método permite tener una mayor área superficial específica, lo que facilita la eficiente encapsulación de una serie de principios activos tales como anticuerpos, antígenos, fármacos, entre otros (Ming et al., 2022). No obstante, la efectividad del método depende en gran medida de ciertos factores como el tamaño y homogeneidad de las Nps en la emulsión; puesto que se ha reportado que partículas mayores a 100 nm no son muy estables y en consecuencia no tan adecuadas para portar agentes bioactivos. Aunque, es todo lo contrario con partículas menores a los 100 nm, que son altamente estables tales como las Nps de ZnO, utilizadas en el presente trabajo. Otro de los factores importantes y que va de la mano con lo mencionado anteriormente, es el tipo de emulsificante o surfactante; ya que dependiendo del balance hidrofílico-lipofílico (HLB), facilitan la estabilización de las Nps en la emulsión, evitando así la coalescencia y agregación de estas (Golodnizky and Davidovich Pinhas, 2020; Tai et al., 2020). Por consiguiente, en el presente estudio se utilizó el PVA, con un HLB de 18, ya que reúne las características necesarias y es muy soluble en el medio continuo de la emulsión (agua). En resumen, el método de emulsión O/W, es altamente ventajoso porque permite

superar diferentes dificultades tales como la estabilidad, la eficiencia de encapsulación (que en el presente trabajo fue de 93.1 %) y la rápida liberación del fármaco (Sawant et al., 2021).

4.1.2. Espectroscopía infrarroja

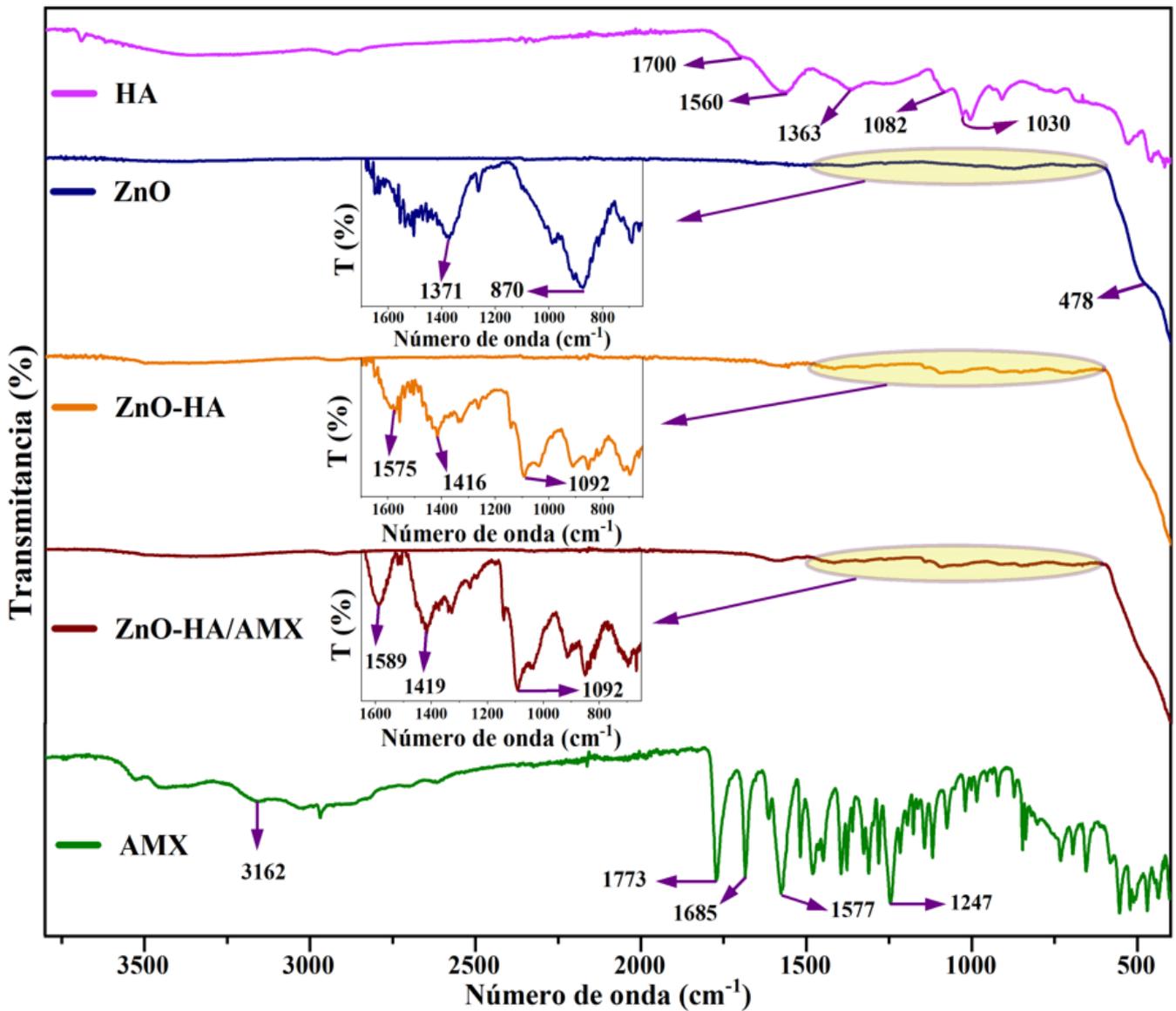
De acuerdo con la **Figura 13**, el espectro del HA (línea rosada) mostró señales características similares a lo reportado en la bibliografía (Swiech et al., 2017): una ligeramente débil en forma de hombro, en $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ asociado a la vibración de estiramiento del C=O de las cetonas y ácidos carboxílicos, otra en 1560 cm^{-1} consecuencia de las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos C=C (en el anillo aromático) y COO^- , correspondientemente. Además, también se encontró picos en 1363, 1082 y 1030 cm^{-1} , asociado a las vibraciones simétricas de estiramiento del COO^- en los ácidos carboxílicos, al (C-C, C-OH) de las cadenas alifáticas y al C-O de los fenoles, respectivamente. Por otro lado, el espectro FTIR del ZnO (línea azul), obtenido por método sol-gel, presenta un pico ancho en 478 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones interatómicas de estiramiento del óxido de zinc (Zn-O) (Malathi et al., 2021). No obstante, también se detectó dos bandas de baja intensidad en 1371 y 870 cm^{-1} , asignado a las vibraciones de los carboxilatos en el acetato residual, incrustados sobre la superficie de las Nps y al cambio en la forma de la estructura cristalina del ZnO, respectivamente (Aboorvakani et al., 2020; Jaramillo et al., 2017).

La funcionalización o modificación superficial de óxidos metálicos, es un proceso muy ventajoso ya que permite el rápido anclaje de forma covalente entre un grupo de átomos y la superficie de un sustrato como las Nps de ZnO. Este método es muy útil, especialmente porque mantiene la integridad estructural de las Nps. Además, también permite ampliar su campo de aplicación, así como mejorar sus propiedades químicas (Jaramillo et al., 2017). Consecuentemente, en el espectro infrarrojo de las Nps de ZnO modificadas con ácido húmico (línea anaranjada), se encontró una señal ligeramente fuerte en 1092 cm^{-1} , que corresponde al mismo pico encontrado en HA generado por el grupo C-OH. No obstante, el desplazamiento hacia mayores números de onda es consecuencia de las interacciones hidrogeno originadas por el grupo hidroxilo presente en la estructura. Así mismo, también se observaron picos en 1416 y 1575 cm^{-1} , señales no identificadas en HA ni en el ZnO. Por tanto, basado en estos resultados y en la diferencia entre los espectros, se puede indicar que el ácido húmico ha sido insertado covalentemente sobre la superficie de las Nps de ZnO; esto mediante el grupo COO^- , asociado a las señales asimétricas y simétricas antes mencionadas. Además, dada la baja intensidad de las señales, se puede especular que la interacción entre las Nps del ZnO con el HA dan lugar a la formación de una monocapa sobre la superficie del óxido, mediante los

grupos carboxilato (He et al., 2018; G. Murugesan et al., 2018; Pujari et al., 2014). No obstante, debido a que $\Delta\nu = \nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_{sy}(\text{COO}^-) = 1560 - 1363 = 197 < 200 \text{ cm}^{-1}$ en el HA; el modo de unión covalente con la superficie del ZnO, es principalmente bidentado (Duo et al., 2018), tal como se muestra en la primera etapa de la **Figura 14**. Por otra parte, en el espectro de absorción IR de la AMX (línea verde), se encontraron picos característicos en 3162 cm^{-1} asociado a la vibración de estiramiento simétrico del grupo amino (N-H) y OH, en 1773 y 1685 cm^{-1} asignado al estiramiento del grupo carbonilo (C=O), presente tanto en el ácido carboxílico y amida, respectivamente. También se detectaron dos señales de alta intensidad en 1577 cm^{-1} y 1247 cm^{-1} relacionado a la vibración de flexión del grupo N-H y C-N, respectivamente (Olaru et al., 2022). Por otro lado, en el espectro de las Nps modificadas conteniendo el fármaco AMX encapsulado (línea marrón) sobre su superficie, mediante método de emulsión O/W, se detectó un pico de fuerte intensidad en 1092 cm^{-1} , señal correspondiente con la también observada en el infrarrojo del ZnO-HA, ya descrito más arriba. No obstante, también se encontraron dos bandas de mediana intensidad en 1589 cm^{-1} y 1419 cm^{-1} , asociada a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de los carboxilatos sobre la superficie de las Nps funcionalizadas. Así mismo, el ligero desplazamiento a mayores frecuencias, es consecuencia de las interacciones hidrógeno originadas por este grupo con el fármaco. Por tanto, comparando este espectro y el de las Nps de ZnO-HA, no se observó una diferencia significativa entre sus señales. Esto, a razón de que la encapsulación del fármaco en las Nps modificadas, se produce solo a través de interacciones químicas susceptibles, tales como enlaces hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (G. Murugesan et al., 2018).

Figura 13

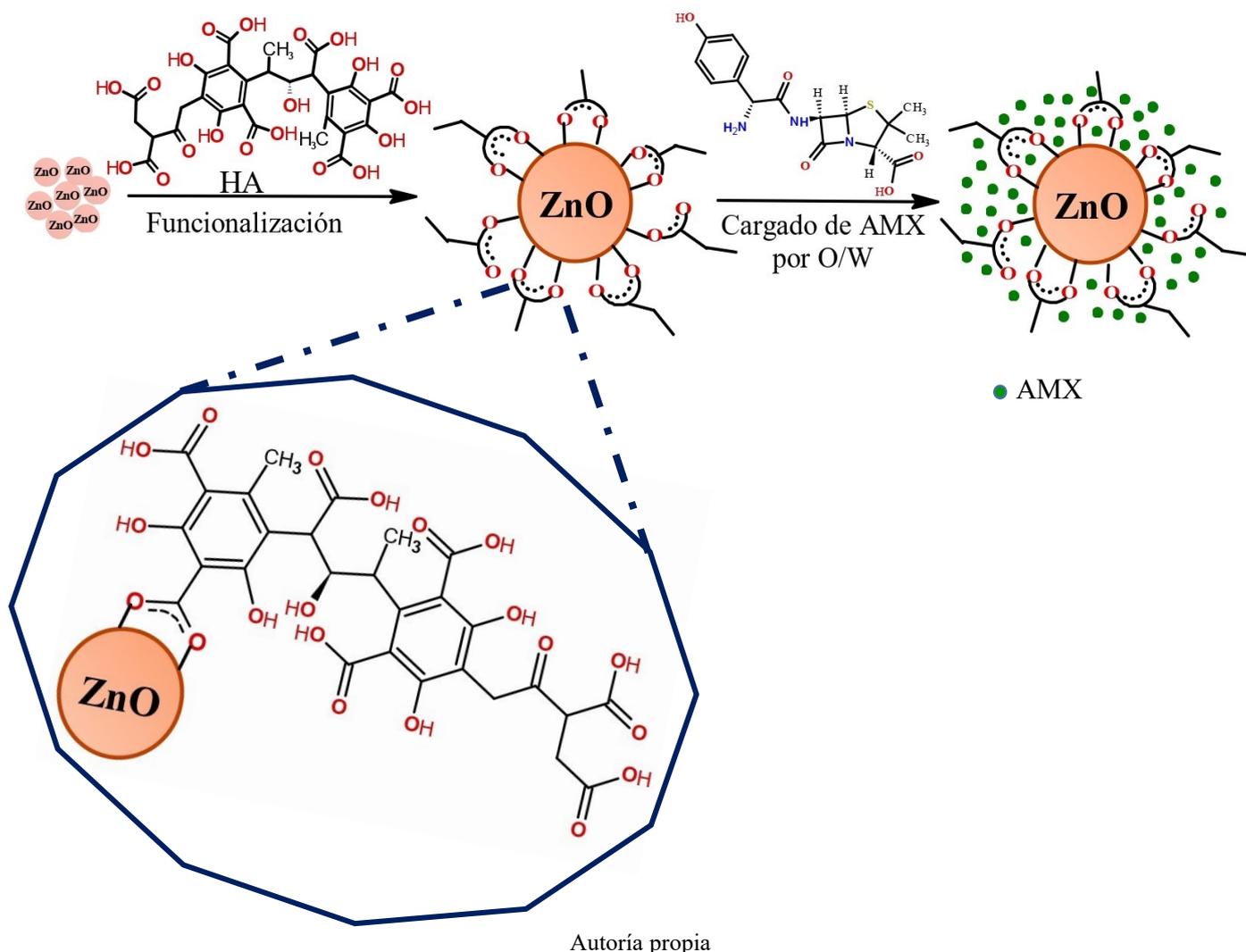
Espectros FTIR del HA, ZnO, ZnO-HA, ZnO-HA/AMX y AMX.



En la **Figura 14**, se muestra el esquema representativo del proceso de funcionalización de las Nps con HA, así como también la encapsulación de la AMX sobre la superficie modificada. En la primera etapa se presenta las interacciones producidas entre el HA mediante los grupos carboxilatos dilucidados desde el análisis FTIR, mientras que en la segunda parte se presenta la encapsulación del fármaco mediante el método de emulsión, en la cual el fármaco se encuentra atrapado en la superficie a través de fuerzas de hidrogeno y Van der Waals, producidas entre el fármaco y los grupos carboxilatos del HA presentes en la superficie de la Nps funcionalizadas.

Figura 14

Esquema representativo de la funcionalización de las Nps de ZnO y cargado de la AMX.



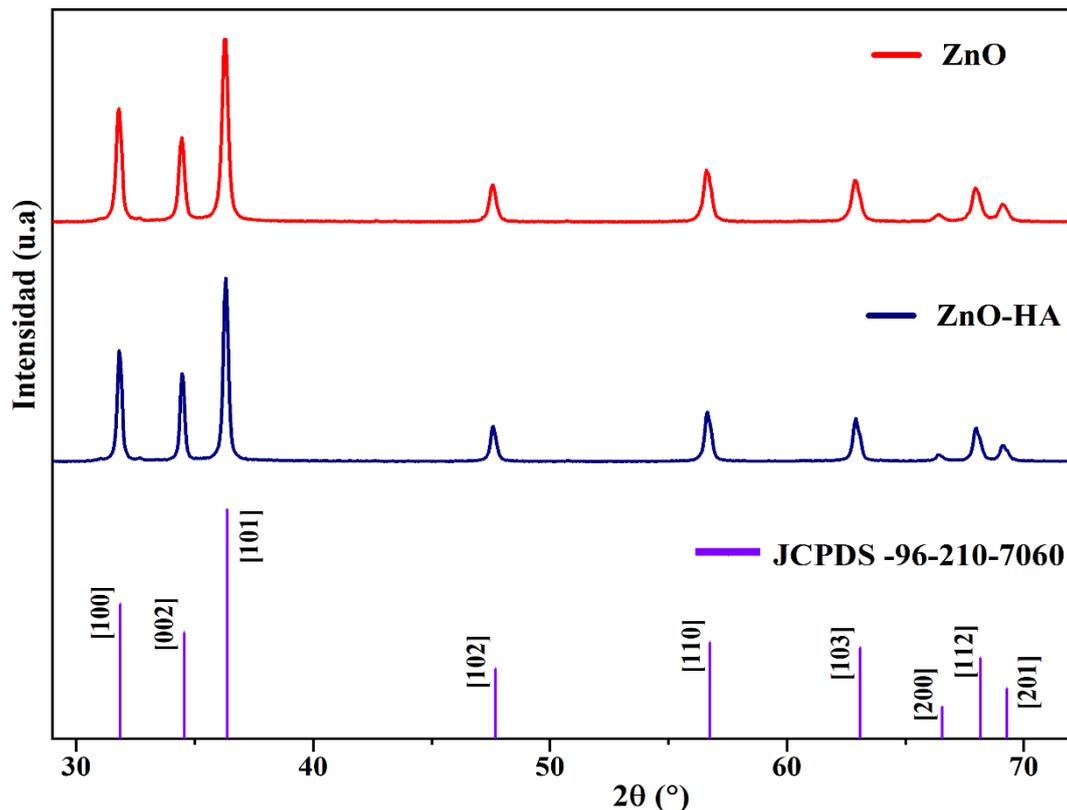
4.1.3. DRX y RAMAN

La difracción de rayos X y la espectroscopia Raman, son dos técnicas de caracterización efectivas, ya que permiten estudiar el comportamiento físico y químico, característico de materiales orgánicos e inorgánicos como las Nps de óxidos metálicos. Por tanto, la naturaleza cristalina de las Nps ZnO sintetizadas y funcionalizadas (ZnO-HA) fue determinada mediante medidas DRX, cuyos patrones de difracción son mostrados en la **Figura 15**. El DRX de las Nps de ZnO calcinadas a 500 °C (línea roja), presento picos típicos en 2θ : 31.80°, 34.45°, 36.25°, 47.55°, 56.60°, 62.90° y 67.95°; correspondiente con los planos cristalinos [100], [002], [101], [102], [110], [103] y [112], respectivamente. Todas las señales observadas, están claramente correlacionadas con la estructura hexagonal tipo wurzita del

ZnO de alta pureza, con constantes de celda $a = b = 0.3242$ nm y $c = 0.5188$ nm, proporcionados en la carta cristalográfica estándar JCPDS: 96-210-7060 (línea morada) y correspondiente al grupo espacial $P6_3mc$. Así mismo, los resultados también son concordantes al reportado por (Justine et al., 2020; Manikandan et al., 2018). Por otro lado, el DRX de las Nps ZnO-HA (línea azul), exhibió picos similares al del ZnO; aunque con un relativo cambio en los valores de 2θ : 36.30° , 56.65° y 68° , asociados a los planos [101], [110] y [112], respectivamente. Estos resultados pueden ser consecuencia de la modificación superficial del ZnO con HA. Además, también se observó que los picos son tan intensos y finos como los de las Nps de ZnO, indicando así que el anclaje del HA sobre la superficie del ZnO no influye significativamente en la estructura cristalina de las Nps. Por otro lado, los picos DRX de las Nps, fueron utilizados para obtener información sobre el tamaño promedio del cristal, mediante la ecuación de Debye - Scherrer, obteniéndose un tamaño medio de 31 y 38.1 nm para el ZnO y ZnO-HA, respectivamente. El incremento en el tamaño de las Nps, se atribuye a la formación de una monocapa en la superficie del ZnO, producto de la interacción con HA. Así mismo, el tamaño de cristal es concordante con resultados reportados en la literatura para síntesis de Nps de ZnO, mediante el mismo método (Delice et al., 2019; Hezma et al., 2019).

Figura 15

Patrones DRX de las Nps de ZnO, ZnO-HA y el patrón estándar.

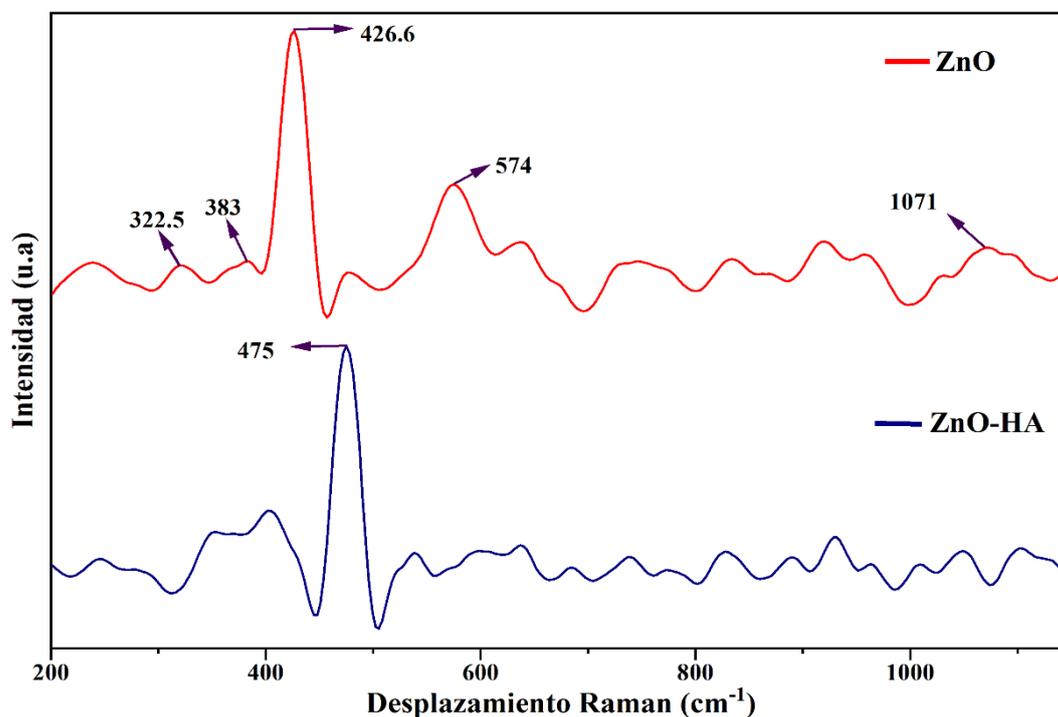


La espectroscopía Raman, es una técnica que facilita el estudio a la respuesta vibracional de las moléculas tales como las Nps de ZnO. Además, indica la existencia de posibles defectos y el desorden presente en la estructura cristalina del material (Aboorvakani et al., 2020). La **Figura 16**, muestra el espectro Raman de las Nps de ZnO y las funcionalizadas superficialmente con HA. El ZnO, de estructura hexagonal tipo wurzita y perteneciente al grupo espacial C_{6V}^4 ($P6_3mc$); presente en el espectro Raman (línea roja), picos característicos en 322.5, 383, 426.6, 574 y 1071 cm^{-1} que coinciden con los resultados reportados para la wurzita del ZnO. No obstante, según la teoría de grupos, predice que esta estructura presenta en el área de Brillouin los fonones ópticos: $A_1 + 2B_1 + E_1 + 2E_2$; donde los modos vibracionales A_1 y E_1 , asociados a los átomos de oxígeno, son activos a la espectroscopía Raman e IR. Además, exhiben diferentes frecuencias para los fonones óptico transversal (TO) y óptico longitudinal (LO), mientras que el modo B_1 es inactivo tanto al Raman e IR, finalmente el modo no polar E_2 (de alta (H) y baja (L) frecuencia) solo es activo en el Raman (Aboorvakani et al., 2020; Manikandan et al., 2018; Ouni et al., 2022). Comparando los resultados de la wurzita con los picos experimentales encontrados, se dilucidó que la banda encontrada en 322.5 cm^{-1} está asociada al modo acústico que se derivan de $E_2(H) - E_2(L)$ y de los modos polares A_1 y E_1 de alta y baja frecuencia. Por otra parte, las señales identificadas en 383 y 574 cm^{-1} , son asignados a los modos vibracionales asimétricos polares $A_1(\text{TO})$ y $E_1(\text{LO})$, respectivamente. Así mismo, estos modos vibracionales son producidos debido a la presencia de vacantes de oxígeno o zinc intersticial en la red cristalina del ZnO. El pico de alta intensidad y fuertemente dominante identificado en 426.6 cm^{-1} , es correspondiente al modo $E_2(H)$; banda característica relacionada a los fonones ópticos de la fase hexagonal wurzita; la cual indica las vibraciones de los átomos de oxígeno y zinc en la red altamente cristalina, tal como fue descrito en el DRX. También se observó una banda de baja intensidad en 1071 cm^{-1} , asignado al sobretono óptico, producido por la combinación de los modos de vibración Raman A_1 y E_1 . El Raman de las Nps funcionalizadas (ZnO-HA, línea azul), mostro un cierto desplazamiento y una clara disminución en la intensidad e incluso desaparición de los picos secundarios; lo cual, está relacionado a la desactivación de los grados de libertad del HA, en el punto de interacción superficial con las Nps del ZnO. Además, también se observó que el pico característico asociado al modo vibracional E_2 se ha desplazado a 475 cm^{-1} . Esto denota la presencia de defectos superficiales en la cristalinidad de las Nps de ZnO; lo cual, junto a los resultados descritos, prueban la interacción covalente del HA con la superficie de las Nps, mediante los grupos carboxilatos, coincidiendo con los resultados IR. Por otro lado, el desplazamiento del modo E_2 a mayores números de onda esta

ciertamente relacionado al cambio en el tamaño de la partícula, que concuerda con los resultados DRX.

Figura 16

Espectro RAMAN de las Nps de ZnO y ZnO-HA



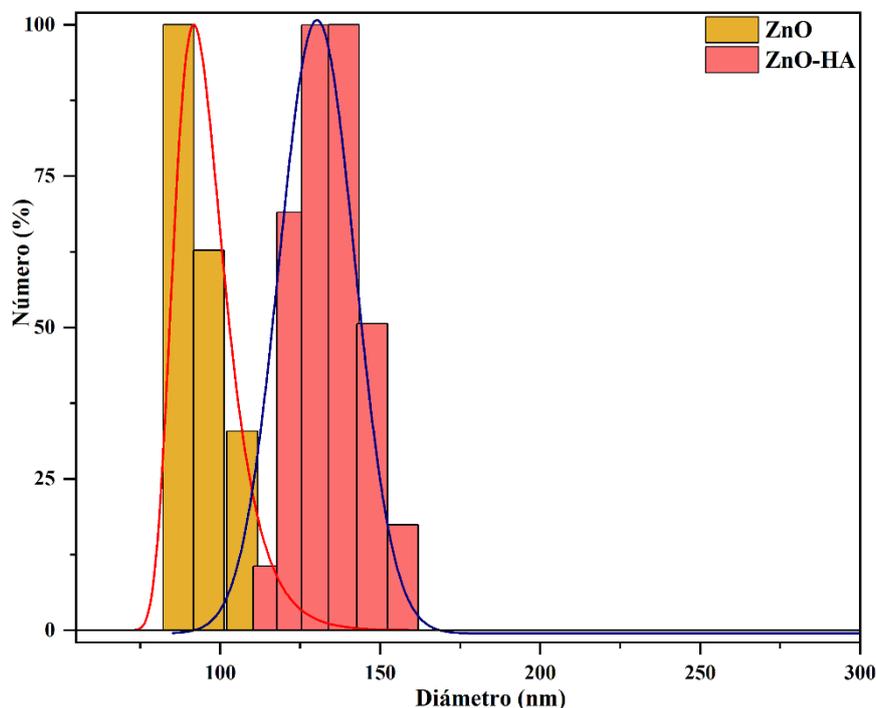
4.1.4. Análisis DLS

El análisis DLS, es uno de los métodos más ampliamente usados para medir el tamaño hidrodinámico de material nanoparticulado, ya que permite determinar la distribución de tamaño de partículas en estado coloidal (Gupta et al., 2018). La **Figura 17**, muestra la distribución del diámetro hidrodinámico de las Nps de ZnO y las correspondientes funcionalizadas con HA. El histograma de distribución por número para las Nps de ZnO presentó asimetría y un tamaño hidrodinámico medio de 92 nm. No obstante, la asimetría en la distribución, es debido a que las nanopartículas dispersas en el agua se encuentran parcialmente aglomeradas, a causa de las interacciones débiles generadas entre sus superficies y el medio dispersante, lo cual estarían generando que se obtengan partículas de diferente tamaño, aunque de buena estabilidad. Por otro lado, las Nps funcionalizadas (histograma de color rosa), mostró una distribución de tamaño altamente simétrica y con un diámetro hidrodinámico medio ~ 130 nm. La mayor homogeneidad en el tamaño y alta estabilidad, es debido a que el HA también estaría actuando como estabilizante para las Nps. No obstante, el mayor tamaño respecto a las Nps de ZnO puede deberse a mayores interacciones producidas

en la superficie de las Nps de ZnO-HA, sobre todo tipo hidrógeno, dado a que la estructura del HA húmico consta de varios puntos polares afines al medio acuoso.

Figura 17

DLS de las Nps de ZnO y ZnO-HA.



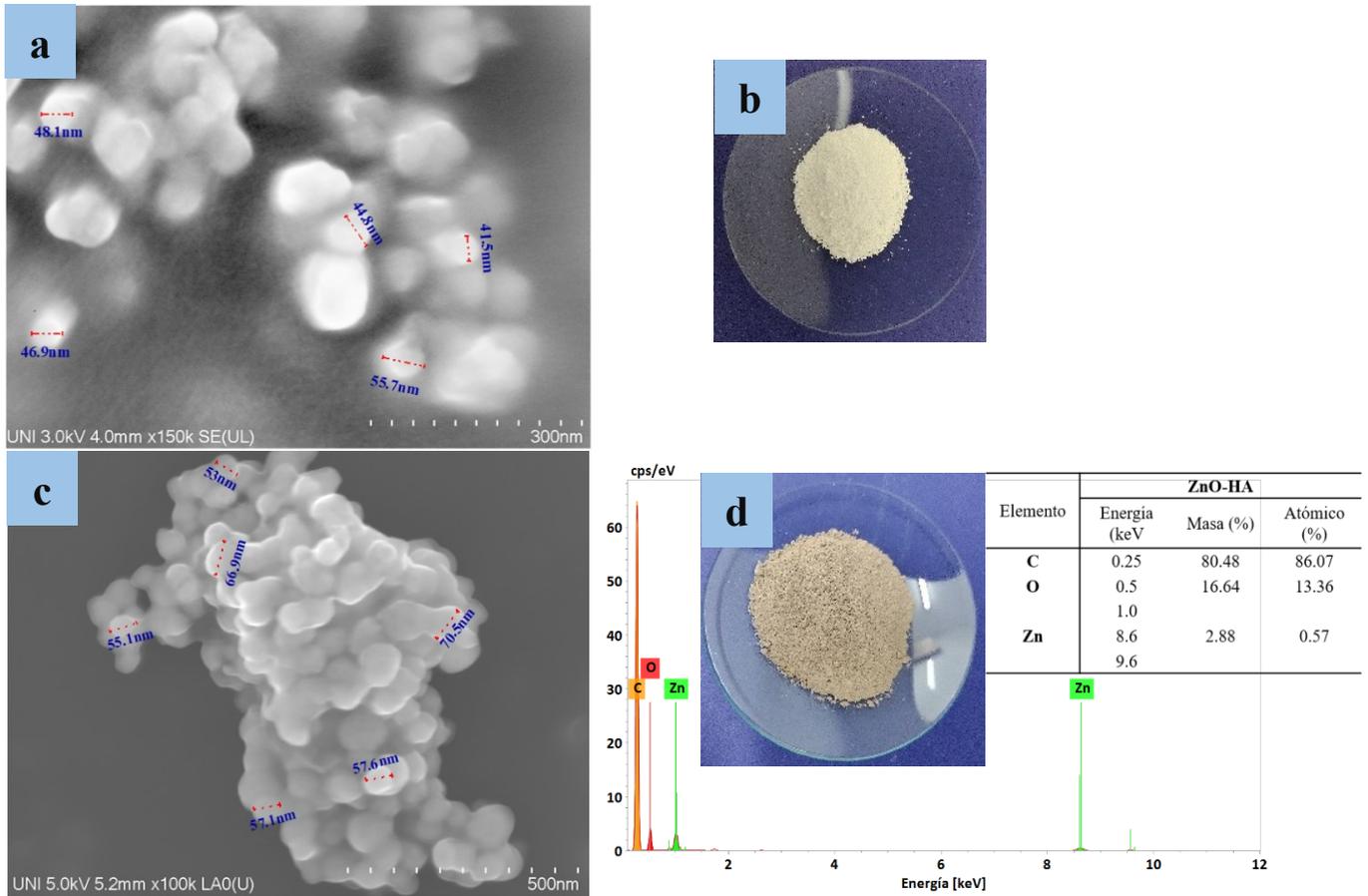
4.1.5. Análisis SEM

La microscopia electrónica de barrido (SEM), es una técnica instrumental que facilita información sobre la morfología y el tamaño aproximado de los materiales a escala nanométrica, tales como las Nps de ZnO y sus variantes (Gupta et al., 2018). La **Figura 18 (a-d)**, muestra los microgramas SEM y las imágenes respectivas para las Nps de ZnO y ZnO-HA. La imagen SEM **(a)**, presenta a las Nps de ZnO con una morfología semiglobular. Así como también en un estado relativamente disperso con cierto grado de aglomeración y un tamaño promedio de 47.57 ± 5.47 nm y de apariencia blanca **(b)**. No obstante, las Nps funcionalizadas (ZnO-HA), de aspecto marrón claro, mostraron características morfológicas similares a las Nps de ZnO; donde las partículas se encuentran aglomeradas entre sí. Lo cual, puede deberse a la alta energía superficial que mantienen, producto de las interacciones producidas entre los grupos pendientes del HA. Así mismo, presentaron una buena homogeneidad con un tamaño promedio de 58.67 ± 8.10 nm. Por otro lado, el espectro EDS **(d)** de las Nps funcionalizadas, confirmó claramente la presencia del HA sobre la superficie

del ZnO; encontrándose señales con alta intensidad que muestran la presencia especialmente de los átomos de carbono (C) en ~ 0.25 keV con un 86.07 % de la masa total atómica, oxígeno (O) en ~ 0.5 keV y del zinc en ~ 1.0 keV, 8.6 keV y 9.6 keV.

Figura 18

Microgramas SEM e imágenes de: a), b) de ZnO y c), d) de ZnO-HA



4.2. Colágeno

4.2.1. Obtención

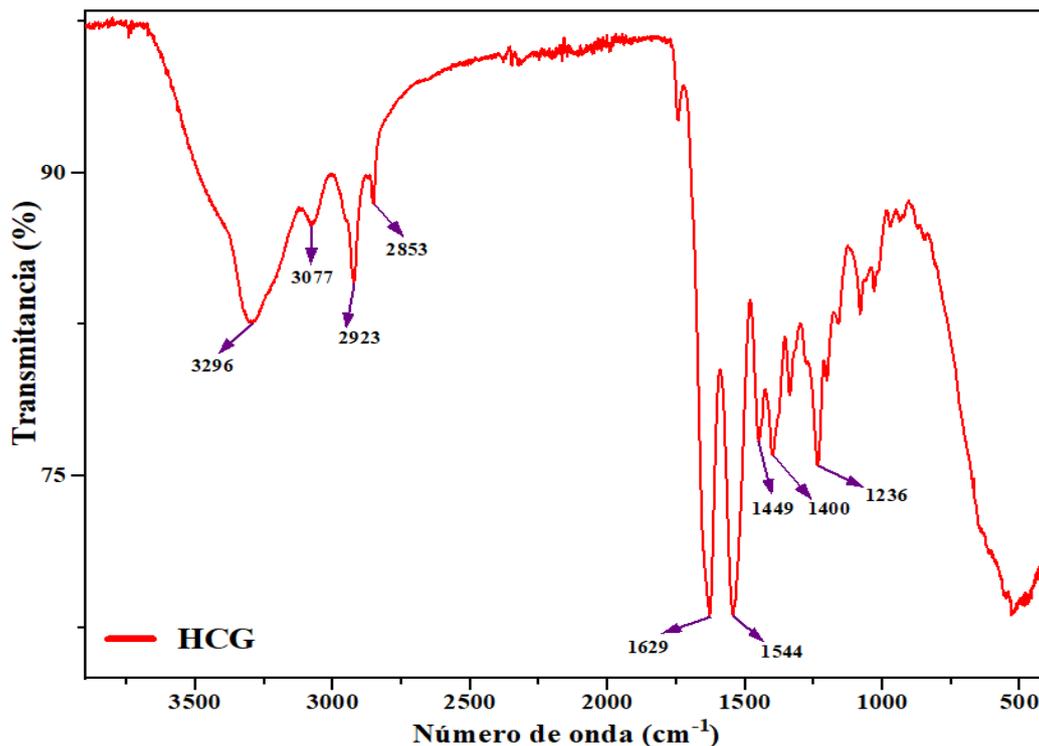
El colágeno como una de las proteínas más abundantes identificada principalmente en mamíferos, puede ser obtenido mediante diferentes métodos; entre ellos la hidrólisis alcalina. Mediante este método, más barato respecto a otros, se facilita la eliminación de una gran cantidad de enlaces covalentes cruzados tipo intramoleculares e intermoleculares; sobre todo aquellos que principalmente involucra a los residuos de la lisina y la hidroxilisina. Así mismo, enlaces éster y otros enlaces con los sacáridos que hacen que el proceso de extracción sea muy complejo (Schmidt et al., 2016). En el presente trabajo, antes de la extracción del colágeno desde el TB, se realizó un tratamiento rápido con agua destilada, a fin de eliminar las impurezas o suciedad superficial. No obstante, se realizó un tratamiento con NaCl y DMSO, con la finalidad de eliminar la grasa, color, olor y posibles microorganismos presentes, respectivamente. Posteriormente, con la finalidad de facilitar el proceso de extracción, se realizó una reducción de tamaño, cortando el TB en fragmentos delgados (desmenuzado). Subsecuentemente, debido a que la fuente de obtención es un material grueso que requiere una penetración muy agresiva, se llevó a cabo un tratamiento químico en una solución básica alcalina (mezcla de sales alcalinas neutras y básicas en solución), durante 75 h. Esto con el objetivo de remover proteínas o sustancias no colagenasas, así como también para romper los enlaces cruzados que evitan un nivel adecuado de hinchamiento en la fuente matriz y consecuentemente las facilidades para la extracción del colágeno (Matinong et al., 2022; Suparno and Prasetyo, 2019). Luego de esta primera extracción (hidrólisis parcial), la muestra fue tratada con una solución alcalina neutra por 6 h, ya que facilita obtener un buen rendimiento y a la vez mejora la solubilidad del colágeno. Sin embargo, durante esta etapa se requiere tener bastante precaución con las concentraciones, ya que el exceso de iones cloruros o sulfatos presentes durante mucho tiempo podría hacer precipitar el colágeno (Matinong et al., 2022; Schmidt et al., 2016). Por ende, a razón de evitar este fenómeno químico, la muestra fue tratada con solución de ácido bórico hasta alcanzar un pH de 8 – 8.5. Luego, se realizó un tratamiento con agua y EDTA a pH 11, con el fin de remover el calcio presente en la muestra de colágeno hidrolizado. Finalmente, el HCG, fue lavado varias veces con agua destilada y luego con ácido acético diluido hasta un pH de 3.5. El tratamiento final con ácido posibilita que la estructura del colágeno hidrolizado tipo I cambie y finalmente facilite su obtención en forma de gel, con un rendimiento de 2.70 % (m/m); resultado consistente con la literatura (Marin et al., 2018), de 2.85 %.

4.2.2. Espectroscopía infrarroja

Según la **Figura 19**, el HCG presentó bandas características propias del colágeno tipo I; identificándose una señal en 3296 cm^{-1} , asociado a las vibraciones de estiramiento de los grupos amino (N-H) e hidroxilo (O-H). Así mismo, se encontraron señales en 3080, 2923 y 2853 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos CH_3 y CH_2 , respectivamente. Por otra parte, también se identificaron señales intensas en 1629 cm^{-1} , asignada a la vibración de estiramiento del C=O acoplada con la de flexión del N-H en la amida I, en 1544 cm^{-1} debido a la flexión del N-H y estiramiento del C-N en la amida II, señales responsables ocurridas en la estructura peptídica secundaria. También se encontró una banda de baja intensidad en 1449 cm^{-1} , consecuente con las vibraciones estereoquímicas en el anillo de la pirrolidina y flexión del CH_2 , otra en 1400 cm^{-1} asociado a las vibraciones de flexión asimétrica del grupo CH_3 . Finalmente, se observó un pico pronunciado en 1236 cm^{-1} , asociado a las interacciones intermoleculares y que representan las vibraciones combinadas de la deformación del grupo N-H con el estiramiento del C-N, correspondiente a la Amida III (Alagha et al., 2019; Sobhanian et al., 2019); lo cual confirma la estructura triple hélice del colágeno (Krishnamoorthi et al., 2017).

Figura 19

Espectro FTIR del colágeno aniónico tipo I (HCG).

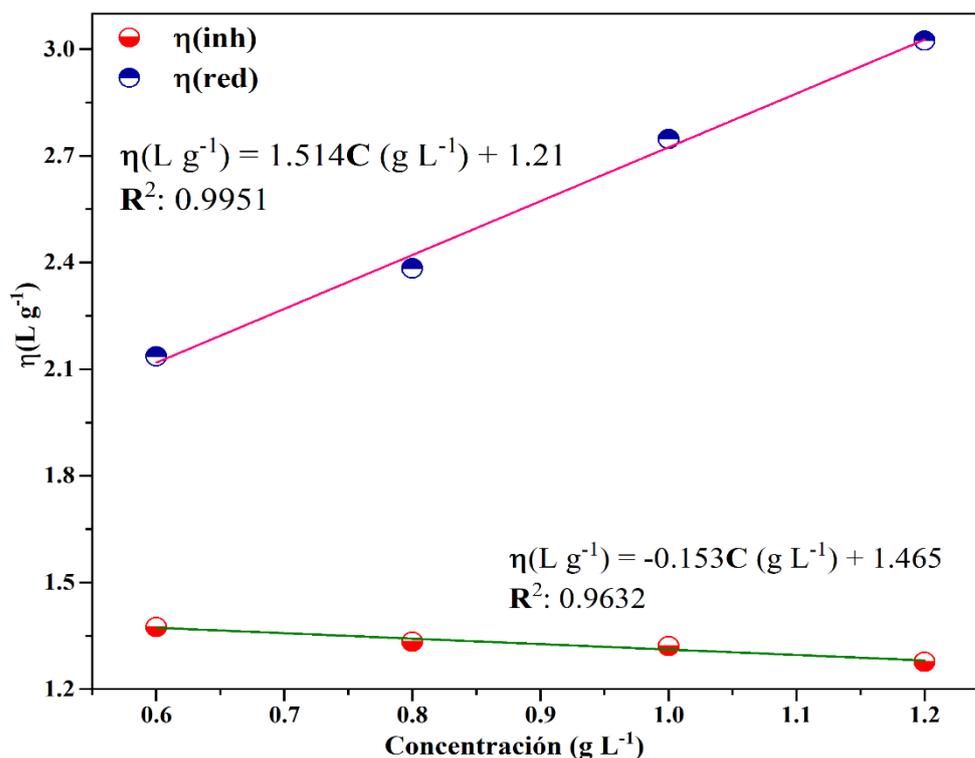


4.2.3. Masa molar viscosimétrica

El colágeno como proteína fibrosa, mantiene un orden jerárquico tanto a nivel estructural como funcional. Por ende, existen una variedad de métodos físicoquímicos y químicos que se suelen usar para caracterizarlo. Estos van desde estudios relacionados a la conformación estructural de las cadenas polipeptídicas, la estabilidad térmica de la triple hélice e incluso la asociación y distribución molecular de estas (Hong et al., 2019). En la **Figura 20**, se muestra la distribución molecular del colágeno determinado mediante método viscosimétrico. En esta se observó que la concentración mantiene una relación lineal respecto a la viscosidad inherente y reducida. Así mismo, también se encontró que el colágeno tipo I, aislado desde el tendón de bovino posee una viscosidad intrínseca media de 1.3374 L g^{-1} , consistente con lo reportado por Sun et al. (2017). Por otro lado, mediante la ecuación de Mark–Houwink–Sakurada se estimó una masa molecular promedio de 368.94 kDa, resultado comparable al reportado por (Grønlien et al., 2019, 2020) a través del mismo método y al peso molecular del colágeno estándar establecido en 300 kDa. Resultado, en el cual se establece que cada cadena de la triple hélice tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 100 kDa (Zhang et al., 2020).

Figura 20

Curva de peso molecular viscosimétrico en función a concentración vs viscosidad.

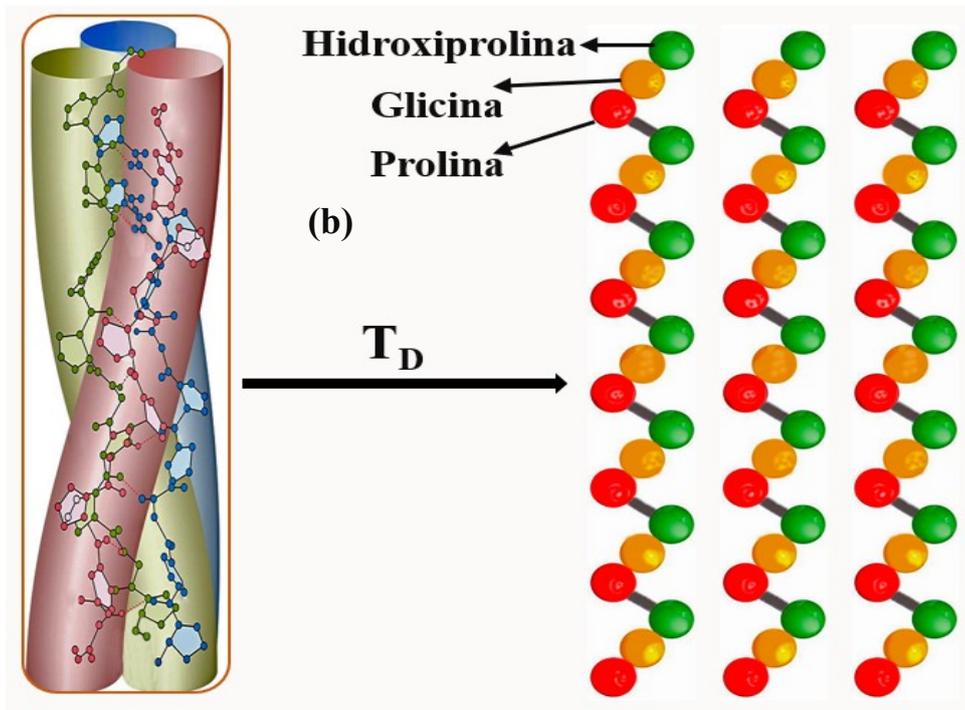
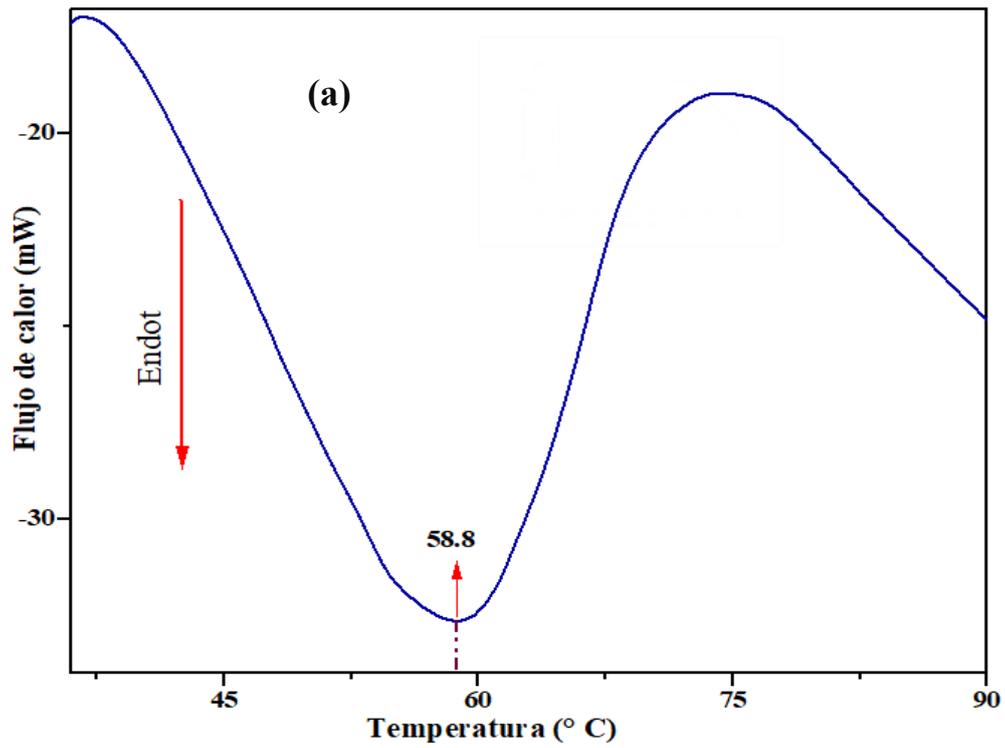


4.2.4. Análisis de calorimetría diferencial de barrido

Conocer la estabilidad térmica de moléculas biológicas como las proteínas, es un factor muy importante, ya que define el punto sobre el cual estas pierden su integridad estructural y su orden jerárquico funcional (Miotto et al., 2019). Para proteínas como el colágeno, la estabilidad térmica se describe mediante la temperatura de desnaturalización (T_D), temperatura que conduce a un desacoplamiento en cada nivel de organización de la triple hélice hacia cadenas polipeptídicas simples. Así mismo, esta temperatura también refleja la contribución entrópica y entálpica de la estabilidad térmica de la triple hélice (Meyer, 2019). La **Figura 21 (a)**, muestra el termograma de transición térmica del colágeno extraído, encontrándose un único pico endotérmico en 58.8 °C, consistente a resultados reportados por González. M. et al. (2020) y Schroepfer & Meyer. (2017), de 84 °C y 60 °C, respectivamente. Esta temperatura corresponde a la T_D , temperatura a la cual el colágeno se desnaturaliza y pierde el orden configuracional en la estructura terciaria, así como sus funciones biológicas. Además, durante este proceso las cadenas alfa de la triple hélice se separan en su totalidad (**Figura 21 (b)**), debido a que el calor incrementa la energía cinética; lo cual causa que las interacciones hidrofóbicas y de hidrogeno que mantienen la estructura de la triple hélice, se rompan; dando origen a fragmentos peptídicos simples conocido como gelatina (Capella-Monsonís et al., 2018; Hong et al., 2019). Por otro lado, cabe remarcar que la estabilidad térmica de la triple hélice, esta principalmente asociada al contenido de los aminoácidos prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina, ya que los grupos hidroxilo (OH) presentes en su estructura dan origen a la formación de enlaces hidrogeno; lo cual limita la rotación de las cadenas helicoidales y mantiene la integridad de la estructura. Además, esta estabilidad, también esta indirectamente relacionada al peso molecular; ya que una masa molar superior al estándar, facilita el autoensamblaje de las cadenas alfa-peptídicas y en consecuencia un incremento en la T_D . En resumen, el proceso de desnaturalización del colágeno ha sido descrito como un proceso irreversible de velocidad limitada; aunque también como un proceso reversible de aparente irreversibilidad, debido a la cinética de equilibrio extremadamente lenta y a que la renaturalización de la proteína no implica propiedades químicas funcionales similares a la original (Grønlien et al., 2019; León-López et al., 2019; Meyer, 2019) .

Figura 21

a) DSC y b) proceso de desnaturalización del colágeno.



Autoría propia

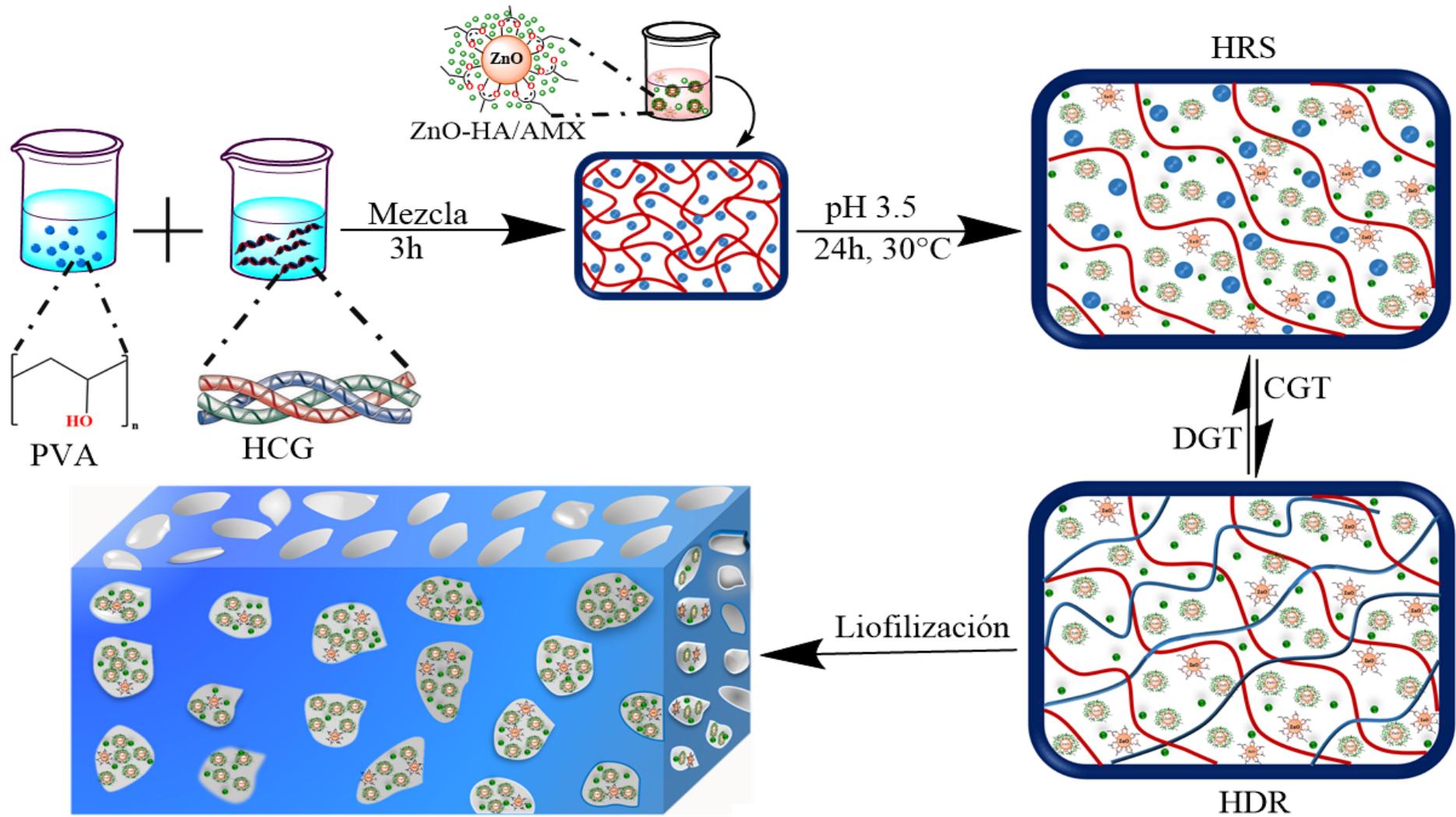
4.3. Matrices compuestas

4.3.1. Preparación

Las esponjas al igual que los scaffolds, debido a su versatilidad han ganado mucha atención en la biomedicina y el campo farmacéutico; especialmente, porque proporcionan un microambiente biocompatible, construido mediante hidrogeles. Los cuales, son redes 3D compuestas por polímeros hidrofílicos reticulados ya sea mediante enlaces covalentes o sostenidos por interacciones intermoleculares. Además, son diseñados de tal manera que se hinchan en respuesta a señales provistas por el ambiente que los rodea, tales como el pH, temperatura, biomoléculas o combinación de estas (Damiri et al., 2020; Gu et al., 2018; Heim buck et al., 2019). Las matrices preparadas en el presente trabajo, están basadas en hidrogeles de doble red; donde la primera está compuesta por el biopolímero polielectrolítico, colágeno y la segunda integrada por un polímero neutro y de gran resistencia como es el PVA. La preparación basada en estos polímeros y las Nps funcionalizadas, cuyo proceso general se muestra en el esquema de la **Figura 22**; empieza con la combinación del HCG/PVA en ratios de masa 70:30, que luego de la homogenización se ajustó el pH a 3.5. La relación de ratios escogida está basada en la mayor consistencia y uniformidad determinada en estudios previos, así como también en estudios similares realizados por Wang et al. (2018). Por otro lado, las matrices con las Nps cargadas con la AMX o simplemente sin ellas, el ajuste del pH fue realizado posterior a su incorporación en la matriz. Además, cabe mencionar que la presencia de las Nps en los hidrogeles no solo afecta a la cinética de liberación del fármaco, sino también mejorara las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la matriz (Ahmadian et al., 2018). Posteriormente, luego del ajuste del pH, la mezcla fue colocada durante 24 h y a 30 °C, con el fin de generar la primera red del hidrogel (HRS), causada por el autoensamblaje del HCG que produce un cierto ordenamiento entre sus moléculas, así como a interacciones HCG-HCG que involucra enlaces no covalentes, hidrofóbicas, hidrogeno, electrostáticas y Van der Waals, además de las interacciones débiles entre moléculas de PVA cercanas, interpenetradas entre las cadenas del HCG. Finalmente, la mezcla fue sometida a ciclos de congelamiento (CGT) y descongelamiento (DGT), con el objetivo de generar la segunda red del hidrogel (HDR), causado por la autoreticulación del PVA mediante interacciones hidrógeno producidas por los grupos hidroxilos. Esta etapa es importante ya que define el grado de reticulación de la matriz, consecuencia de la interpenetración entre las redes de los polímeros involucrados (ver anexo 6). Así mismo, define las propiedades mecánicas y fisicoquímicas que tendrá la matriz final como por ejemplo la velocidad de degradación (Gu et al., 2018)

Figura 22

Esquema representativo de la preparación de la matriz híbrida M5.



Autoría propia

Si bien, las reticulaciones químicas, ha sido uno de los métodos más comúnmente utilizados para fortalecer las propiedades mecánicas de sistemas poliméricos, esta no siempre es la mejor ya que llegan a producir cambios estructurales y reacciones no deseadas. Además, dependiendo del tipo de agente, a veces suelen generar cierto grado de toxicidad sino se realiza un adecuado control del proceso (Damiri et al., 2020). Por ende, para nuestro caso se hizo uso de una reticulación física ya que no involucra agentes reticulantes adicionales y solo causa cambios conformacionales en la matriz. Además, es generado por los ciclos de CGT-DGT; ya que el PVA a bajas temperaturas genera nuevos puntos de enredo. Proceso que, en tales condiciones, es conducido esencialmente por fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno originados por los grupos hidroxilos (Wang et al., 2018). Para concluir, una vez producido el hidrogel de doble red, las muestras fueron posteriormente liofilizadas a fin de obtener las matrices porosas 3D de ~ 5 cm x 2.5 cm x 0.55 cm (largo, ancho y alto). No obstante, aunque la obtención de matrices porosas mediante proceso de liofilización, es aparentemente un proceso sencillo. Es la etapa final más relevante, ya que define el tamaño de poro que tendrá la matriz y, depende de la velocidad de congelamiento previo a la liofilización. Es decir, si la velocidad de congelamiento es muy lenta la estructura de la esponja será muy débil y puede llegar a colapsar debido al rápido hinchamiento producido y, puede no ser tan adecuado como sistema de liberación. Mientras que si se congela rápidamente dentro de -50 °C a -80 °C de forma controlada, la anisotropía de la matriz se mantiene, permitiendo obtener una mejor disposición estructural de los poros. Por lo tanto, el proceso de congelamiento, es vital porque permite controlar la velocidad de nucleación y crecimiento del cristal de hielo; el cual, define el tamaño del poro en las esponjas y el espacio hueco adecuado para posibles aplicaciones farmacéuticas (Heimbuck et al., 2019; Shukla, 2011).

4.3.2. Espectroscopía infrarroja

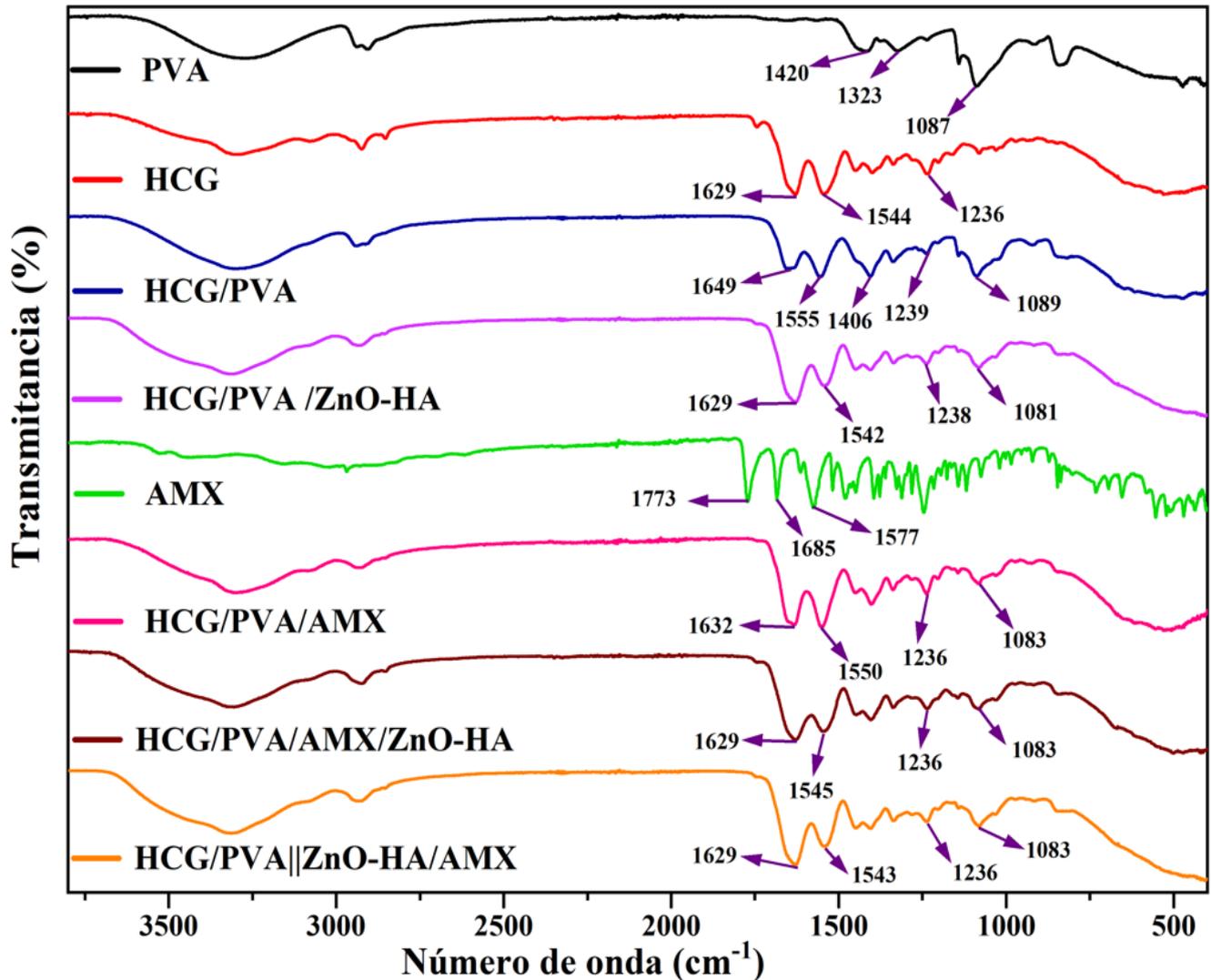
A fin de discernir las interacciones producidas entre los diferentes grupos funcionales involucrados en las matrices del compuesto, basados en HCG/PVA conteniendo Nps de ZnO funcionalizadas con HA y matrices sin Nps. Los espectros FTIR de los materiales puros como HCG, PVA, Nps de ZnO, HA, AMX y los respectivos compósitos preparados, fueron comparados. En el espectro IR de la **Figura 23** (línea negra), se observó que el PVA mostró bandas muy similares al reportado en la literatura (Sobhanian et al., 2019). Se encontraron picos en 1420, 1323 y 1087 cm^{-1} , los cuales son correspondientes a las vibraciones de flexión de los grupos C-H, CH-OH y al estiramiento simétrico del C-O, respectivamente. En el espectro de las matrices compuesto como esponja, la de HCG/PVA (M1, línea azul), mostró tres señales de intensidad media en 1649, 1555 y 1239 cm^{-1} que son asignadas a las mismas vibraciones detectadas en el FTIR del HCG, antes mencionadas en la **Figura 19**. No obstante, los desplazamientos hacia mayores números de onda son debido a los enlaces de hidrógeno originados por los grupos C=O, N-H e hidroxilo presentes en la estructura del colágeno y PVA. También se identificaron dos picos en 1406 y 1089 cm^{-1} , el primero es debido al solapamiento entre la flexión del C-H en el PVA (en 1420 cm^{-1}) y la flexión asimétrica del CH_3 en el HCG (en 1400 cm^{-1}); mientras que el segundo es debido al estiramiento del grupo C-O en el PVA; el cual confirma la presencia del PVA en la mezcla polimérica. Por tanto, se puede afirmar que la organización estructural de los compuestos en las esponjas no se ve alterada. Por otro lado, en el espectro de la matriz M2 (Línea morada), se observaron señales similares al mostrado en el FTIR de M1, pero en 1629, 1542 y 1238 cm^{-1} ; vibraciones muy parecidas al del colágeno puro correspondientes a la amida I, amida II y amida III, respectivamente. Esto muestra que la incorporación de las Nps modificadas tampoco altera la integridad estructural ni del HCG ni del PVA ya que también se identificó el pico de vibración característico en 1081 cm^{-1} . Por tanto, se puede afirmar que las esponjas conforman un compuesto con ambas matrices ya que no altera su identidad fisicoquímica.

En el caso de las muestras M3 y M4 que contienen la AMX en mezcla con HCG, PVA y ZnO-HA, respectivamente; también se pudo observar que la integridad estructural de cada uno se retiene ya que se identificó en los espectros IR (línea rosada y marrón respectivamente), señales muy parecidas a las mencionadas anteriormente tanto para M1 como para el HCG, PVA y ZnO-HA puros. Por otro lado, algo muy similar se observó en el FTIR de M5 (línea anaranjada), donde la AMX fue cargada sobre las Nps modificadas y luego incorporadas en la mezcla polimérica. Además, la notoria intensidad característica en todos los espectros de

las matrices y que hacen referencia a las señales del HCG y PVA puros, comparado al de las Nps modificadas y el fármaco, respectivamente; es debido a que estos se encuentran en mayor proporción, razón por lo cual causa que las bandas específicas de la AMX o las mismas Nps sean solapadas casi completamente y difíciles de identificar en el compuesto.

Figura 23

Espectros FTIR del PVA, HCG, M1, M2, AMX, M3, M4 y M5.



4.3.3. Grado de hinchamiento y Porosidad

El hinchamiento y la porosidad, son parámetros clave que definen muchas veces la aplicación de los biomateriales poliméricos en la medicina; especialmente de matrices porosas tales como las esponjas o scaffolds, que debido a sus características macroporosas pueden absorber grandes cantidades de líquidos a través de su superficie. Así mismo, en procesos de liberación, estos parámetros son críticos ya que afectan directamente la velocidad y el

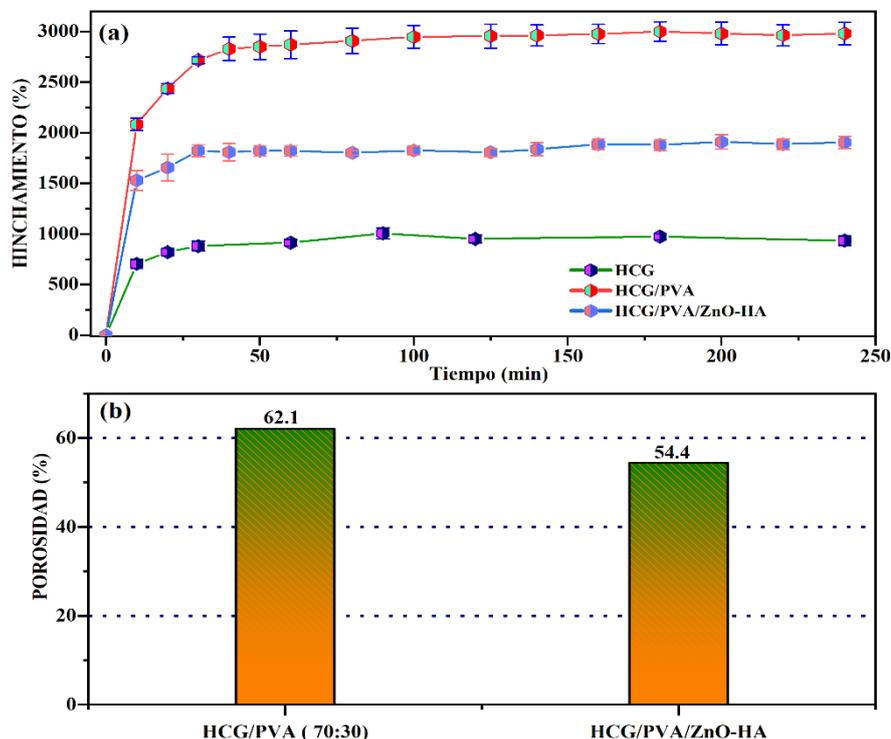
mecanismo de liberación del principio bioactivo (Y. A. Khan et al., 2020; Wang et al., 2018). En la **Figura 24 (a)**, se muestra el perfil de hinchamiento en PBS a pH 7.4 de las matrices de HCG (línea azul), HCG/PVA (M1, línea roja) y HCG/PVA/ZnO-HA (M2, línea celeste); encontrándose que la matriz de HCG puro absorbe líquido más lentamente, durante todo el proceso de las 4 h de estudio y alcanzando un máximo hinchamiento de $\sim 950\%$, donde se satura completamente. Mientras que las matrices compuestas M1 y M2, mostraron una absorción bastante más rápida, alcanzando un hinchamiento máximo en $\sim 3000\%$ y 1900% , respectivamente. La diferencia entre los resultados encontrados, radica en las interacciones producidas dentro de la red macroporosa; ya que, en el caso de la matriz de colágeno puro, una especie tipo anfótera. En condiciones de pH casi neutro, presenta los grupos colgantes de las cadenas peptídicas en estado de carga positiva y negativa en equilibrio. Por lo cual, el hinchamiento, solo está relacionado a las interacciones hidrogeno y Vander Waals que se producen entre los residuos de aminoácidos que conforman la estructura helicoidal y el medio circundante. No obstante, la mayor capacidad de hinchamiento de M1 respecto a la de HCG, es resultado del incremento en las interacciones hidrogeno y Vander Waals que se generan en la red de la matriz compuesta al contacto con el medio. Además, este incremento en el hinchamiento e interacciones es consecuente a la abundante presencia de los grupos hidroxilo que conforma el PVA en la matriz; lo cual causa que incremente la hidrofelicidad del sistema y una mayor movilidad de las cadenas en los polímeros. Por otro lado, el menor hinchamiento mostrado por M2 respecto a M1, esta probablemente relacionado a la alta presencia de fuerzas intermoleculares, producidas entre las cadenas del colágeno y PVA con los grupos superficiales del HA sobre la superficie de las Nps modificadas. Lo cual, conlleva a la disminución en la movilidad de las cadenas poliméricas y a la reducción parcial de la hidrofelicidad de la matriz e hinchamiento.

Por otra parte, la porosidad de las muestras M1 y M2 (**Figura 24 (b)**), presentaron resultados de $62.1 \pm 2.3\%$ y $54.4 \pm 1.2\%$, respectivamente; valores similares al reportado por Khani et al., (2018) para hidrogeles de doble red basados en quitosano/PVA. Además, matrices como estas deben su porosidad en gran medida a la mayor cantidad de HCG presente en el compósito, ya que se ha reportado mayor porosidad cuando la relación de masas para el HCG/PVA es mayor a 60:40 (Wang et al., 2018). No obstante, la disminución en la porosidad de la matriz M2, está asociada principalmente a la ocupación de las vacantes presentes en la red macroporosa por parte de las Nps de ZnO-HA y al incremento en las interacciones débiles

como Van der Waals que se generan entre las cadenas de los polímeros con los grupos externos asociados al HA en la superficie de las Nps de ZnO.

Figura 24

a) Grado de hinchamiento y b) Porosidad.



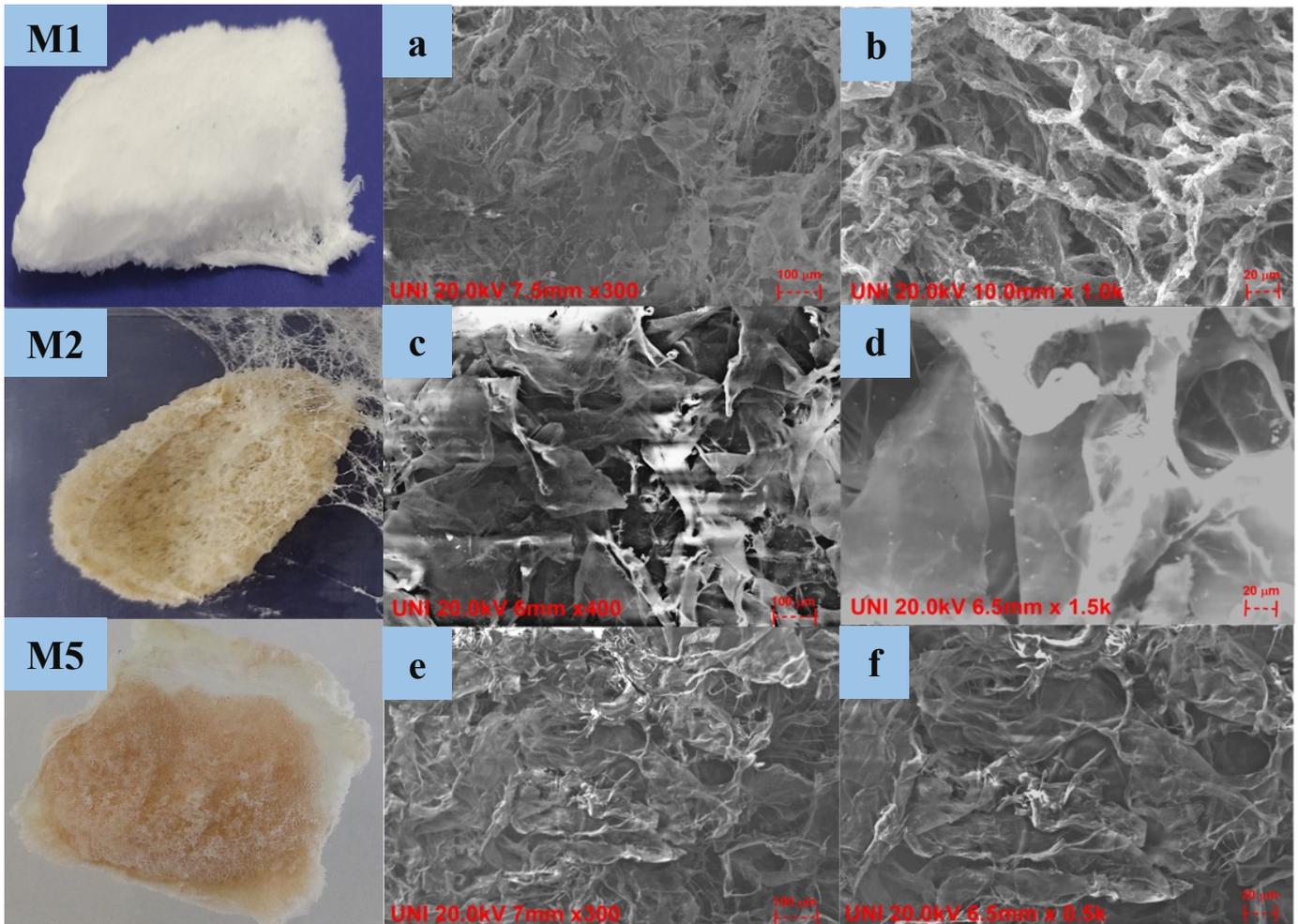
4.3.4. Análisis SEM

Los detalles morfológicos de las diferentes matrices híbridas son mostrados en la **Figura 25** (a-f). En esta se muestra la estructura e interconexiones porosas; las cuales, proveen la capacidad de penetración del agua a través de las esponjas híbridas. Los microgramas SEM de M1 (**a y b**), mostraron que la matriz presenta una estructura morfológica irregular en forma de delgados pliegues superpuestos (paredes de los poros) a una magnificación de x300; mientras que a x1.0k de magnificación, se observó una disposición estructural más ordenada con la clara disposición de los poros en la red de la matriz. Además, esta disposición presento poros con un tamaño promedio de $87.4 \pm 5.6 \mu\text{m}$. Por otro lado, M2 (**c y d**), mostro características superficiales más rugosas y compactas a una magnificación de x400, con paredes porosas más gruesas tal como como también se observa a una mayor magnificación de x1.5k. Donde, se puede notar la disposición estructural de los poros con una forma más regular y de un tamaño medio de $58.3 \pm 10.0 \mu\text{m}$, tamaño menor a lo encontrado en M1. Esta diferencia es debido a que M2 contiene dentro de la estructura porosa Nps de ZnO-HA; las cuales, también se pueden observar relativamente en el micrograma SEM (**d**) de mayor

magnificación como pequeños puntos blancos distribuidos sobre las redes poliméricas. Además, esta diferencia también se puede observar claramente en la apariencia física de las matrices donde M1 presenta una coloración blanca y suave con un mayor grosor; mientras que M2 muestra una apariencia de color amarillenta y más compacta con menor grosor. El análisis morfológico de la matriz M5 (e y f), la cual contiene Nps de ZnO-HA cargadas con el fármaco AMX en su superficie, mostraron una superficie rugosa e irregular, tanto a una magnificación de x300 como a x0.5k. Lo cual, puede ser debido a las interacciones que se producen entre el fármaco con la superficie de las Nps y a su vez con la red polimérica, que físicamente se puede observar por el color rosa-blancuecina que presenta. Además, en comparación a M2, no se observa puntos o grumos que indiquen la presencia de las Nps, esto es porque posiblemente se encuentran interpenetradas más internamente dentro de las redes porosas cuyo tamaño promedio es de $51.4 \pm 11.3 \mu\text{m}$.

Figura 25

Microgramas SEM de las esponjas a diferentes magnificaciones: a) x300 y b) x1.0k de M1(HCG/PVA); c) x400, d) x1.5k de M2 (HCG/PVA/ZnO-HA) y e) x300, f) x0.5k de M5(HCG/PVA||ZnO-HA/AMX).



4.4. Análisis de la liberación *in - vitro*

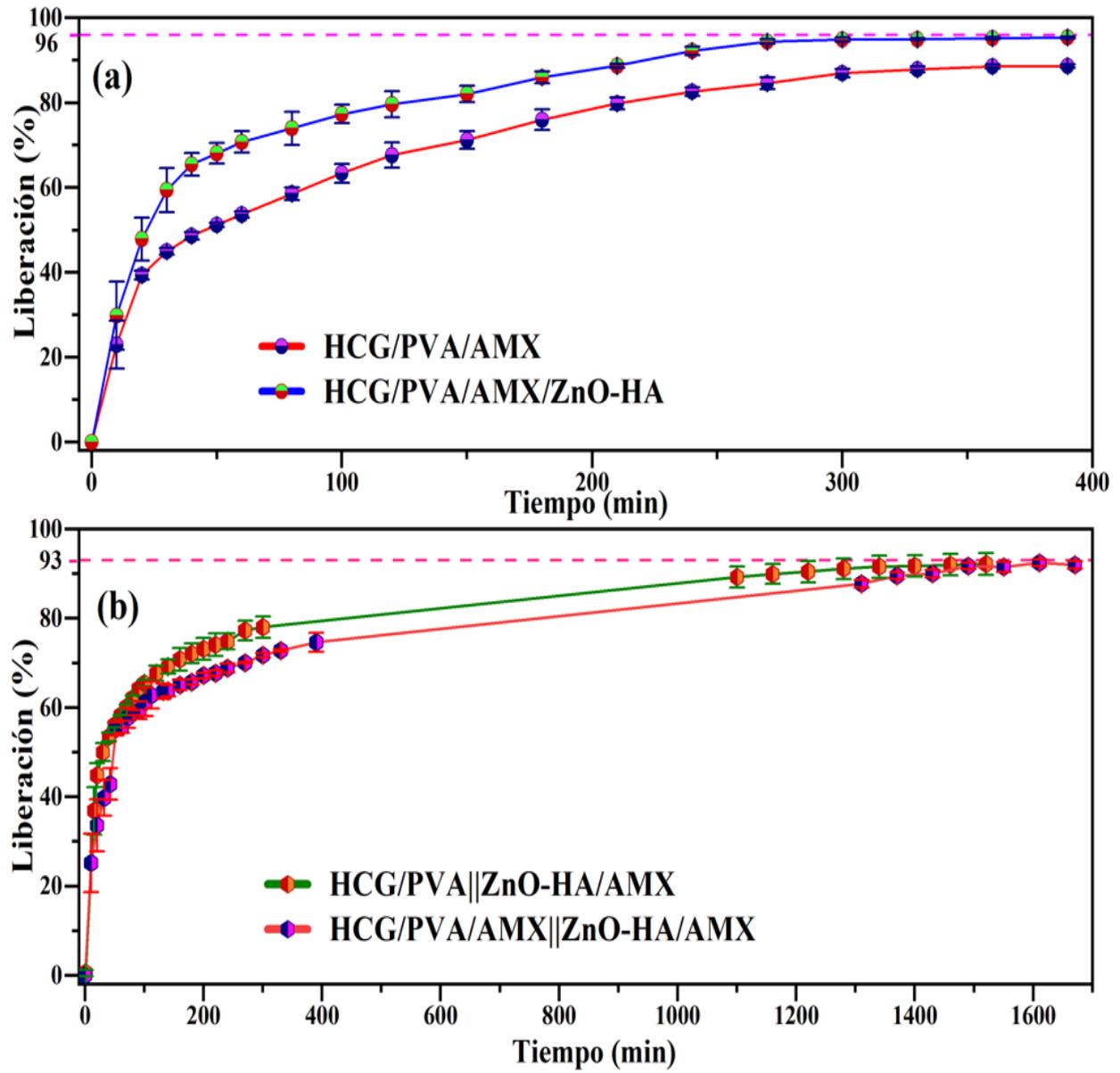
Estudiar perfiles cinéticos de liberación para principios activos como los fármacos, no es tan sencillo como aparenta; ya que estos son afectados por una variedad de factores, tales como la composición, método de preparación de la matriz portadora y en especial el medio de liberación. Además, también influyen directamente factores como la humectabilidad superficial de la matriz, la degradación, hinchamiento y, sobre todo, los tipos de interacciones físicas y químicas que se producen entre los componentes de la matriz y el fármaco, que para el presente trabajo se basa en HCG, PVA y Nps modificadas (Y. A. Khan et al., 2020). Los análisis cuantitativos sobre la liberación porcentual de la AMX, desde las matrices híbridas (M3, M4, M5 y M6), fueron determinados a través de UV-Visible, en PBS a pH 7.4. Usando estos resultados, los perfiles de la cinética de liberación fueron graficadas en función del tiempo; tal como se muestra en la **Figura 26 (a-b)**. Estos perfiles mostraron tres fases de liberación para el fármaco AMX. Por tanto, en el estudio de liberación para dicho fármaco desde las matrices M3 (HCG/PVA/AMX) y M4 (HCG/PVA/AMX/ZnO-HA); donde el fármaco está cargado únicamente en la matriz polimérica mas no en la superficie de las Nps, se observó que la velocidad de liberación es aproximadamente el 45 % y 60 %, respectivamente, durante los primeros 30 min y que representa al fármaco distribuido más externamente en la superficie de las esponjas. En la segunda etapa, la liberación fue gradualmente más lenta, durante los próximos 240 min; tiempo en el cual, la cantidad de fármaco presente en el medio fue de 94.4 % y 84.6 %, respectivamente. Valores de fármaco que está asociado a la AMX distribuido más internamente en la matriz y cuyo camino de salida es mayor al presentado en la primera etapa. Finalmente, durante la última fase, se observó una liberación cuasi estacionaria y estable hasta que se completó el estudio en 6.5 h. Además, donde la eficacia total de la liberación fue de 95.4 % y 88.7 %, respectivamente. Si bien los resultados deberían concordar directamente con el grado de hinchamiento; es decir, a mayor hinchamiento mayor porcentaje de fármaco liberado. Sin embargo, no es el caso ya que M3 similar a M1(sin fármaco y de mayor hinchamiento), mostro una liberación ligeramente más lenta respecto a M4 de composición similar a M2 (que no tiene fármaco y menor hinchamiento que M1). Estas diferencias, están relacionadas a la intensidad de las fuerzas intermoleculares producidas en la matriz, ya que en M3, compuesta solo de HCG y PVA, las interacciones son más intensas entre las cadenas de los polímeros y el fármaco libre dentro de la red de la matriz híbrida. Sobre todo, las interacciones tipo hidrogeno, debido a que ambos polímeros presentan grupos (carboxílicos, hidroxilos, aminos) altamente afines

con el medio acuoso y los grupos de la AMX; lo cual causa que la difusión del fármaco hacia el medio de liberación sea parcialmente más lenta que en M4. Donde las interacciones disminuyen, debido al entorno generado por la ocupación de vacantes por parte de las Nps de ZnO-HA, dentro de la red porosa de la matriz.

Por otra parte, la cinética de liberación desde las matrices M5 y M6, al igual que en M3 y M4, presenta tres etapas. Sin embargo, la rapidez de liberación fue totalmente diferente y mucho más lenta, ya que la primera etapa muestra una velocidad de liberación similar en ambas matrices, durante los primeros 70 min y un ~ 60 % de liberación. Esta etapa rápida se asocia al fármaco libre más externo distribuido en la matriz, que en el caso de M5 representa a la porción de fármaco salido desde la superficie de las Nps durante la dispersión por sonicación antes de ser agregado a la matriz y para M6 al fármaco libre distribuido en la matriz y también a la porción salida desde las Nps durante la dispersión. En la segunda etapa, se observó una liberación más gradual y prolongada respecto al mostrado por M3 y M4 para la misma etapa, hasta que alcanza un estado cuasi estacionario a partir de los 1340 min (~ 22 h). Durante esta etapa con cinética de liberación más controlada y prolongada en el tiempo, es debido principalmente a interacciones de fuerzas susceptibles generadas entre la AMX y ciertos grupos funcionales del HA (Carboxilatos e hidroxilos) no anclados a la superficie de las Nps; que en primera instancia causan un retraso en la salida del fármaco hacia la matriz y, lo cual genera que la salida del fármaco sea más compleja. En el caso de M5, representa a la AMX que sale desde la superficie de las Nps y atraviesa toda la red porosa; mientras que para M6 corresponde tanto la porción gradual de fármaco que sale de la superficie de las Nps y también la porción de fármaco libre más interno distribuido en la matriz esponjosa. Finalmente, durante la tercera etapa se encontró una liberación cuasi estacionaria y estable hasta que se completa el estudio en 26.5 h con ~ 92 % de liberación total. Por tanto, en base a todo lo mencionado anteriormente, se observa que la liberación en M5 y M6 es bastante más lenta y sostenida en el tiempo, ya que el fármaco recorre una trayectoria más compleja que en M3 y M4; donde la AMX está libre en la red porosa como una mezcla sola o junto a las Nps modificadas.

Figura 26

Perfil de liberación de la AMX en a) M3 y M4, b) M5 y M6.



Conclusiones

En el presente trabajo, fueron preparadas exitosamente esponjas compuestas, basadas en colágeno aniónico tipo I (extraído desde el tendón de bovino), PVA y Nps de ZnO modificadas superficialmente con HA. Esto con el fin de aprovechar la naturaleza porosa y biocompatible de la matriz para su potencial uso como sistema portador para el estudio de liberación del fármaco AMX. Los resultados FTIR, DRX y RAMAN, demostraron que las Nps de ZnO fueron correctamente sintetizadas y modificadas superficialmente con HA, además, fueron de estructura tipo hexagonal wurzita con un tamaño de cristal de 31 nm y 38.1 nm. Así mismo, de un diámetro hidrodinámico de 92 nm y 130 nm, respectivamente. Por otro lado, de acuerdo a las imágenes SEM, mostraron una morfología semiesférica con un tamaño promedio de 47.57 nm y 58.67 nm respectivamente.

Las caracterizaciones FTIR, masa molar viscosimétrica y DSC, comprobaron que el colágeno extraído presentó un 2.704 % (m/m) de eficiencia de obtención, corresponde al colágeno tipo I, con señales IR características, asociadas a la amida I, II y III, además, con una masa molar promedió de ~369 kDa y una T_D de 58.8 °C.

Por otra parte, los resultados FTIR relacionado a las matrices porosas, mostraron que estas conforman un compuesto híbrido, debido a que el HCG, PVA y Nps conservan su identidad; ya que no se encontraron cambios significativos en las señales IR de cada sustancia pura. Además, la presencia de ligeros desplazamientos en algunas señales, es solo consecuencia de interacciones moleculares o debido a la combinación de señales solapadas entre grupos del HCG y PVA. No obstante, las esponjas referenciales M1 y M2, mostraron una un grado de hinchamiento máximo de ~3000 % y 1900 %; también un nivel de porosidad de 62.1 % y 54.4 % respectivamente. Por otro lado, los análisis SEM mostraron que las matrices M1, M2 y M5, presentan características superficiales irregulares y con una distribución estructural de tamaño de poro menor a 100 μm .

Los patrones de liberación desde las matrices, mostraron un mecanismo trifásico: una inicial rápida y abrupta, seguida por una más lenta y controlada, finalmente una cuasi estacionaria y estable facilitando una eficacia de liberación entre 88-96 % en 6.5 h para M3 y M4; mientras que una eficacia de ~92 % en 26.5 h para M5 y M6. Por tanto, tener al fármaco encapsulado en las Nps funcionalizadas e incorporadas dentro de la matriz no solo permitió retrasar la velocidad de salida de la AMX en comparación a estar únicamente distribuida en la red polimérica, sino que también se sostiene en el tiempo y con una alta eficiencia.

Recomendaciones

Si bien el presente trabajo abre un puente sinérgico, entre la química de los biopolímeros y los nanomateriales basados en metales bioactivos y su aplicación en el campo biofarmacéutico, aún quedan muchas incógnitas por resolver, dentro ellas está el estudio de la cinética de liberación e hinchamiento, tanto en las condiciones desarrolladas en la presente investigación, así como también en otras condiciones de pH. Lo cual, permita sacarles el máximo provecho a las propiedades químicas y biocompatibles del HCG, PVA y Nps.

Por tanto, basado en todo lo descrito y los resultados encontrados, la matriz híbrida desarrollada, se puede proyectar a futuro como una buena alternativa para ser usada como un posible bioadhesivo en la protección contra bacterias y en la aceleración de cicatrización de heridas; tanto de origen quirúrgico o de cualquier naturaleza en un grado crítico. No obstante, para ello se recomienda posteriores estudios, tales como la actividad biológica relacionada a la actividad antibacteriana *in-vivo* e *in-situ*, biodegradabilidad de la matriz, propiedades mecánicas, citotoxicidad de la amoxicilina en uso superficial, entre muchas otras.

Referencias bibliográficas

- Abd El-aziz, A. M., El-Maghraby, A. and Taha, N. A. (2017). Comparison between polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber and polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber/hydroxyapatite (HA) for removal of Zn²⁺ ions from wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(8), 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.025>
- Aboorvakani, R., Kennady Vethanathan, S. J. and Madhu, K. U. (2020). Influence of Zn concentration on zinc oxide nanoparticles and their anti-corrosion property. *Journal of Alloys and Compounds*, 834. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.155078>
- Afghan, N. (2016). *Mechanical Properties of Poly (vinyl alcohol) Based Blends and composites* (Issue May). Western University.
- Ahmadian, Y., Bakravi, A., Hashemi, H. and Namazi, H. (2018). Synthesis of polyvinyl alcohol/CuO nanocomposite hydrogel and its application as drug delivery agent. *Polymer Bulletin*, 76(4), 1967–1983. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2477-9>
- Ajit S. Narang, R.-K. C. and M. A. H. (2020). Nanoparticles and Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Impact of Size and Structure on Functionality. In R. B. and G. F. A. Shaker A. Mousa (Ed.), *The Road from Nanomedicine to Precision Medicine* (1st ed., Vol. 4, pp. 239–261). Jenny Stanford Publishing Pte. Ltd. <https://doi.org/10.4324/9781003027010>
- Akhavan BJ, Khanna NR, V. P. (2022). Amoxicillin (2021st ed., pp. 1–602). StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/>
- Akhilesh Kumar, M., Anamika, M. and Nidhi, M. (2020). Nanoengineered polymeric biomaterials for drug delivery system. In M. Mozafari (Ed.), *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery* (pp. 117–144). Woodhead Publishing.
- al Abdullah, K., Awad, S., Zaraket, J. and Salame, C. (2017). Synthesis of ZnO Nanopowders by Using Sol-Gel and Studying Their Structural and Electrical Properties at Different Temperature. *Energy Procedia*, 119, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.080>
- Alagha, A., Nourallah, A. and Hariri, S. (2019). Characterization of dexamethasone loaded collagen-chitosan sponge and in vitro release study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101449>
- Alazzawi, H. F., Salih, I. K. and Albayati, T. M. (2021). Drug delivery of amoxicillin molecule as a suggested treatment for covid-19 implementing functionalized mesoporous SBA-15 with aminopropyl groups. *Drug Delivery*, 28(1), 856–864. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1914778>
- Ali, K., Saquib, Q., Ahmed, B., Siddiqui, M. A., Ahmad, J., Al-Shaeri, M., Al-Khedhairi, A. A. and Musarrat, J. (2020). Bio-functionalized CuO nanoparticles induced apoptotic activities in human breast carcinoma cells and toxicity against *Aspergillus flavus*: An in vitro approach. *Process Biochemistry*, 91, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.008>
- Arif, M., Alagawany, ;, Abd El-Hack, ;, Saeed, ; and Arain, ; (2019). Humic acid as a feed additive in poultry diets: a review. 20(3), 167–172.
- Ashlee D, B., Hugh D.C, S. and Robert O, W. I. (2019). Modified Release Solid Oral Dosage Forms. In *Essential Pharmaceutics* (pp. 59–72). Springer Nature.
- Aslam, M., Kalyar, M. A. and Raza, Z. A. (2018). Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polymer Engineering and Science*, 58(12), 2119–2132. <https://doi.org/10.1002/pen.24855>
- Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G. and Sánchez, M. L. (2017). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(1), 20–26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>

- Aziz, N. D., Ouda, M. H. and Ismael, A. H. (2022). Hepatotoxic effect of amoxicillin / clavulanate combination in human : A review. *Kerbala Journal Pharmacy and Pharmaceutical*, 1(20), 36–48. <https://www.iasj.net/iasj/article/232477>
- Bal-Ozturk, A., Karal-Yilmaz, O., Akguner, Z. P., Aksu, S., Tas, A. and Olmez, H. (2019). Sponge-like chitosan-based nanostructured antibacterial material as a topical hemostat. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(19), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.47522>
- Basel, A. W., Adewale, A., Anne Adebukola, A., Oluyomi Stephen, A., Abbas, A., Javed, A., Mazaher, A., Sohail, A. and Rafieh, A. (2020). *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery* (Masoud Mozafari, Ed.). Elsevier Ltd.
- Basit, E. L. M. A. W. (2018). Modified-release oral drug delivery. In K. M. G. T. Michael E. Aulton (Ed.), *Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines* (fifth, pp. 564–579). Book Aid International.
- Bhasarkar, J. B. and Bal, D. K. (2021). Nanomaterial-based advanced oxidation processes for degradation of waste pollutants. In V. P. P. Bharat Bhanvase, Shirish Sonawane (Ed.), *Handbook of Nanomaterials for Wastewater Treatment* (pp. 811–831). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821496-1.00003-9>
- Bhatt, P. and Singh, V. K. (2022). Effect of humic acid on soil properties and crop production– A review. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 92(12). <https://doi.org/10.56093/ijas.v92i12.124948>
- Biswal, T., BadJena, S. K. and Pradhan, D. (2020). Sustainable biomaterials and their applications: A short review. *Materials Today: Proceedings*, 30, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.437>
- Boni, R., Ali, A., Shavandi, A. and Clarkson, A. N. (2018). Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0491-8>
- Botella, J. M. M. (2022). Estructura tridimensional de las proteínas. *Proteínas fibrosas. Proteínas globulares*.
- Burch, D. G. S. and Sperling, D. (2018). Amoxicillin—current use in swine medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(3), 356–368. <https://doi.org/10.1111/jvp.12482>
- Cabrera, E. L. (2019). Obtención de fibras electrohiladas de alcohol polivinílico y fluoresceína empleando un inyector coaxial. Universidad Autónoma de Puebla.
- Cao, D., Gong, S., Shu, X., Zhu, D. and Liang, S. (2019). Preparation of ZnO Nanoparticles with High Dispersibility Based on Oriented Attachment (OA) Process. *Nanoscale Research Letters*, 14. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3038-3>
- Capella-Monsonís, H., Coentro, J. Q., Graceffa, V., Wu, Z. and Zeugolis, D. I. (2018). An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens. *Nature Protocols*, 13(3), 507–529. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.117>
- Carvalho, A. M., Marques, A. P., Silva, T. H. and Reis, R. L. (2018). Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications. *Marine Drugs*, 16(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md16120495>
- Chamundeeswari, M., Jeslin, J. and Verma, M. L. (2018). Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 849–865. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00841-1>
- Chaudry, Z. F., Rocha, J. L., Plepis, A. M. G., Rossi, M. and Goissis, G. (2017). Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. *Polímeros*, 7(2), 40–46. <https://doi.org/10.1590/s0104-14281997000200006>
- Coelho, R. C. G., Marques, A. L. P., Oliveira, S. M., Diogo, G. S., Pirraco, R. P., Moreira-Silva, J., Xavier, J. C., Reis, R. L., Silva, T. H. and Mano, J. F. (2017). Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential

- application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 78, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.122>
- Cortés, H., Hernández-Parra, H., Bernal-Chávez, S. A., del Prado-Audelo, M. L., Caballero-Florán, I. H., Borbolla-Jiménez, F. v., González-Torres, M., Magaña, J. J. and Leyva-Gómez, G. (2021). Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. *Materials*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/ma14123197>
- Cotton, G. C., Lagesse, N. R., Parke, L. S. and Meledandri, C. J. (2018). Antibacterial nanoparticles. In *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology* (2nd ed., Vols. 1–5, pp. 65–82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10409-6>
- Damiri, F., Bachra, Y., Bounacir, C., Laaraibi, A. and Berrada, M. (2020). Synthesis and Characterization of Lyophilized Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked with Benzaldehyde for Controlled Drug Release. *Journal of Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8747639>
- de Marco, B. A., Natori, J. S. H., Fanelli, S., Tótolí, E. G. and Salgado, H. R. N. (2017). Characteristics, Properties and Analytical Methods of Amoxicillin: A Review with Green Approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(3), 267–277. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1281097>
- Deepali, S. and Karan, V. (2018). Advancements and Potential Prospects of Polymer/Metal Oxide Nanocomposites: From Laboratory Synthesis to Commercialization. In Shakeel Ahmed, Suvardhan Kanchi, Saiqa Ikram and Krishna Bisetty (Eds.), *Biocomposites: Biomedical and environmental applications* (pp. 27–63). Pan Stanford Publishing .
- Delice, S., Isik, M. and Gasanly, N. M. (2019). Traps distribution in sol-gel synthesized ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 245, 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.02.123>
- Deshmukh, K., Basheer Ahamed, M., Deshmukh, R. R., Khadheer Pasha, S. K., Bhagat, P. R. and Chidambaram, K. (2017). Biopolymer Composites with High Dielectric Performance: Interface Engineering. In J.-J. C. K.K. Sadasivuni, J. Kim, M.A. AlMaadeed, D. Ponnamma (Ed.), *Biopolymer Composites in Electronics* (pp. 27–128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6>
- Di Martino, A., Drannikov, A., Surgutskaia, N. S., Ozaltin, K., Postnikov, P. S., Marina, T. E. and Sedlarik, V. (2019). Chitosan-collagen based film for controlled delivery of a combination of short life anesthetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.228>
- Domínguez, P. (2008). Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: Revisión y relevancia.
- Donnaloja, F., Jacchetti, E., Soncini, M. and Raimondi, M. T. (2020). Natural and synthetic polymers for bone scaffolds optimization. *Polymers*, 12(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/POLYM12040905>
- Duan, G., Bagheri, A. R., Jiang, S., Golenser, J., Agarwal, S. and Greiner, A. (2017). Exploration of Macroporous Polymeric Sponges As Drug Carriers. *Biomacromolecules*, 18(10), 3215–3221. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00852>
- Duo, S., Zhang, L., Zhong, R., Liu, Z., Huang, L., Liu, T. and Zhang, Y. (2018). Controllable tartaric acid modified ZnO crystals and their modification-determined optical, superhydrophilic/hydrophilic and photocatalytic properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 768, 214–229. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.07.195>
- Ebru, A., Burcu, O. and Gulgun, Y. (2017). Porous Scaffolds. In A. T. Mehdi Razavi (Ed.), *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation* (pp. 27–180). Woodhead Publishing. <https://books.google.com.pe/books?id=rJepDQAAQBAJ&pg=PA168&dq=ZnO+nanoparticles&hl=es->

419&sa=X&ved=2ahUKEwi8wsXvnqb2AhVNH7kGHe3sBZc4FBDoAXoECAsQAg#v=onepage&q=ZnO nanoparticles&f=false

- Fassihi, R. (2018). Modified-Release Delivery Systems: Extended-Release Capsule Platform. In *Pharmaceutical Dosage Forms Capsules* (pp. 317–344). Taylor & Francis Group.
- Fatima, N., Jamal, A., Huang, Z., Liaquat, R., Ahamad, B., Haider, R., Ali, M. I., Shoukat, T., Alothman, Z. A., Ouladsmame, M., Ali, T., Ali, S., Akhtar, N. and Sillanpää, M. (2021). Extraction and chemical characterization of humic acid from nitric acid treated lignite and bituminous coal samples. *Sustainability* (Switzerland), 13(16). <https://doi.org/10.3390/su13168969>
- Fenton, O. S., Olafson, K. N., Pillai, P. S., Mitchell, M. J. and Langer, R. (2018). Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Advanced Materials*, 30(29), 1–29. <https://doi.org/10.1002/adma.201705328>
- Festas, A. J., Ramos, A. and Davim, J. P. (2019). Medical devices biomaterials – A review. *Journal of Materials: Design and Applications*, 234(1), 218–228. <https://doi.org/10.1177/1464420719882458>
- Furtado, M., Chen, L., Chen, Z., Chen, A. and Cui, W. (2022). Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. In *Engineered Regeneration* (Vol. 3, Issue 3, pp. 217–231). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.05.002>
- Gaganjot Kaur, Jasleen Grewal, Kiran Jyoti, Upendra K.Yain, Ramesh Chandra, J. M. (2018). Oral Controlled and Sustained Drug Delivery Systems: Concepts, advances, preclinical and clinical status. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (pp. 567–590). William Andrew, Elsevier.
- Gholamali, I. and Alipour, E. (2020). Carboxymethyl Chitosan/Starch/CuO Nanocomposite Hydrogels for Controlled Release of Amoxicillin. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 6(4), 398–406. <https://doi.org/10.1007/s40883-020-00173-z>
- Golodnizky, D. and Davidovich Pinhas, M. (2020). The effect of the hlb value of sucrose ester on physiochemical properties of bigel systems. *Foods*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/FOODS9121857>
- González-Masis, J., Cubero-Sesin, J. M., Guerrero, S., González-Camacho, S., Corrales-Ureña, Y. R., Redondo-Gómez, C., Vega-Baudrit, J. R. and Gonzalez-Paz, R. J. (2020). Self-assembly study of type I collagen extracted from male Wistar Hannover rat tail tendons. *Biomaterials Research*, 24(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00197-0>
- Gowri, M., Latha, N., Suganya, K., Kumar, S. K., Alahmadi, T. A., Alharbi, S. A., Murugan, M. and Rajan, M. (2020). Amoxicillin loaded Nickel functionalized polymeric bentonite carrier for enhanced therapeutic activity. *Journal of Polymer Research*. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02340-w>
- Grønlien, K. G., Pedersen, M. E., Sanden, K. W., Høst, V., Karlsen, J. and Tønnesen, H. H. (2019). Collagen from Turkey (*Meleagris gallopavo*) tendon: A promising sustainable biomaterial for pharmaceutical use. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100166>
- Grønlien, K. G., Pedersen, M. E. and Tønnesen, H. H. (2020). A natural deep eutectic solvent (NADES) as potential excipient in collagen-based products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.026>
- Gu, Z., Huang, K., Luo, Y., Zhang, L., Kuang, T., Chen, Z. and Liao, G. (2018). Double network hydrogel for tissue engineering. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10(6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1520>
- Gujral, G., Kapoor, D. and Jaimini, M. (2018). An updated review on modified release tablets. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(4), 5–9. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i4.1722>

- Gupta, M., Tomar, R. S., Kaushik, S., Mishra, R. K. and Sharma, D. (2018). Effective antimicrobial activity of green ZnO nano particles of *Catharanthus roseus*. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02030>
- Haifei Zhang. (2018). *Ice Templating and Freeze-drying for Porous Materials and their Applications*. Wiley-VCH.
- Hasnidawani, J. N., Azlina, H. N., Norita, H., Bonnia, N. N., Ratim, S. and Ali, E. S. (2016). Synthesis of ZnO Nanostructures Using Sol-Gel Method. *Procedia Chemistry*, 19, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.095>
- He, C., Abraham, B., Fan, H., Harmer, R., Li, Z., Galoppini, E., Gundlach, L. and Teplyakov, A. v. (2018). Morphology-Preserving Sensitization of ZnO Nanorod Surfaces via Click-Chemistry. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(4), 768–772. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.7b03388>
- Heimbuck, A. M., Priddy-Arrington, T. R., Sawyer, B. J. and Caldorera-Moore, M. E. (2019). Effects of post-processing methods on chitosan-genipin hydrogel properties. *Materials Science and Engineering C*, 98, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.119>
- Herrera-Rivera, R., Olvera, M. D. L. L. and Maldonado, A. (2017). Synthesis of ZnO Nanopowders by the Homogeneous Precipitation Method: Use of Taguchi's Method for Analyzing the Effect of Different Variables. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 16–20. <https://doi.org/10.1155/2017/4595384>
- Hezma, A. M., Rajeh, A. and Mannaa, M. A. (2019). An insight into the effect of zinc oxide nanoparticles on the structural, thermal, mechanical properties and antimicrobial activity of Cs/PVA composite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 581(August), 123821. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123821>
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M. and Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food Chemistry*, 301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
- Hossain, A., Roy, S. and Guin, P. S. (2017). The Importance of Advance Biomaterials in Modern Technology: A Review. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 10(4), 441. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2017.00073.6>
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A. and Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 59–81. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1802517>
- Iosub, C. S., Olaret, E., Grumezescu, A. M., Holban, A. M. and Andronescu, E. (2017). Toxicity of nanostructures: a general approach. In *Nanostructures for Novel Therapy: Synthesis, Characterization and Applications* (pp. 793–809). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00029-3>
- Iqbal, B., Muhammad, N., Rahim, A., Iqbal, F., Sharif, F., Safi, S. Z., Khan, A. S., Gonfa, G., Uroos, M. and Rehman, I. U. (2018). Development of collagen/PVA composites patches for osteochondral defects using a green processing of ionic liquid. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(10), 590–596. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1474358>
- Jacob, J., Haponiuk, J. T., Thomas, S. and Gopi, S. (2018). Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry*, 9, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.002>
- Jain, N., Singh, V. K. and Chauhan, S. (2017). A review on mechanical and water absorption properties of polyvinyl alcohol based composites/films. *Journal of the Mechanical Behavior of Materials*, 26(5–6), 213–222. <https://doi.org/10.1515/jmbm-2017-0027>
- Jaramillo, A. F., Baez-Cruz, R., Montoya, L. F., Medinam, C., Pérez-Tijerina, E., Salazar, F., Rojas, D. and Melendrez, M. F. (2017). Estimation of the surface interaction mechanism of

- ZnO nanoparticles modified with organosilane groups by Raman Spectroscopy. *Ceramics International*, 43(15), 11838–11847. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.06.027>
- Jiang, S., Cheong, J. Y., Nam, J. S., Kim, I. D., Agarwal, S. and Greiner, A. (2020). High-density Fibrous Polyimide Sponges with Superior Mechanical and Thermal Properties. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(16), 19006–19014. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c02004>
- John E. Bennett, R. D. & M. J. B. (2020). Principles and Practice of Infectious Diseases. In *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (9th ed., Vol. 35, Issue 3). Elsevier Inc.
- Juergen Siepmann, F. S. (2013). The Modified-Release Drug Delivery Landscape. In M. E. L. Michael J. Rathbone, Jonathan Hadgraft, Michael S. Roberts (Ed.), *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (second, Vol. 57, Issue 2, pp. 17–34). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2003.10.011>
- Justine, M., Joy Prabu, H., Johnson, I., Magimai Antoni Raj, D., John Sundaram, S. and Kaviyarasu, K. (2020). Synthesis and characterizations studies of ZnO and ZnO-SiO₂nanocomposite for biodiesel applications. *Materials Today: Proceedings*, 36, 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.034>
- K. P. Jayadevan, T. Y. T. (2008). Oxide Nanoparticles. In H.S.Nalwa (Ed.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (2nd ed., Vol. 8, pp. 333–376). American Scientific Publishers. <https://doi.org/10.1201/noe0849396397.ch287>
- Kargozar, S., Ramakrishna, S. and Mozafari, M. (2019). Chemistry of biomaterials: future prospects. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.07.003>
- Khan, I., Saeed, K. and Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, Y. A., Ozaltin, K., Bernal-Ballen, A. and Di Martino, A. (2020). Chitosan-alginate hydrogels for simultaneous and sustained releases of ciprofloxacin, amoxicillin and vancomycin for combination therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102126>
- Khorasani, M. T., Joorabloo, A., Moghaddam, A., Shamsi, H. and MansooriMoghadam, Z. (2018). Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 1203–1215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.010>
- Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. and Shanmugam, A. (2017). Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(September 2016), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.006>
- K.Shanmugam, R. S. (2018). Bioceramics—An introductory overview. In S. Thomas, P. Balakrishnan and M. S. Sreekala (Eds.), *Fundamental Biomaterials: Ceramics* (pp. 1–43). Woodhead Publishing,Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/c2016-0-03513-1>
- Kumari, B. (2018). Recent Development in Floating Drug Delivery System: A Review. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(2), 131–139. <https://doi.org/10.31024/ajpp.2018.4.2.6>
- Lallo da Silva, B., Caetano, B. L., Chiari-Andréo, B. G., Pietro, R. C. L. R. and Chiavacci, L. A. (2019). Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.013>
- LEE, C. H. L. A. Y. (2014). BIOMEDICAL APPLICATIONS AND TISSUE ENGINEERING OF COLLAGEN. In K. C. ASHIM K. MITRA, CHI H. LEE (Ed.), *Advanced Drug Delivery* (pp. 445–487). John Wiley & Sons, Inc.
- Leone, F., Cataldo, R., Mohamed, S. S. Y., Manna, L., Banchemo, M., Ronchetti, S., Mandras, N., Tullio, V., Cavalli, R. and Onida, B. (2019). Nanostructured zno as multifunctional carrier

- for a green antibacterial drug delivery system—a feasibility study. *Nanomaterials*, 9(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nano9030407>
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A. D., Campos-Montiel, R. G. and Aguirre-álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163931>
- Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S. and Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
- Li, L., Xie, C. and Xiao, X. (2020). Polydopamine modified TiO₂ nanotube arrays as a local drug delivery system for ibuprofen. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101537>
- Lin, K., Zhang, D., Macedo, M. H., Cui, W., Sarmiento, B. and Shen, G. (2018). Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Advanced Functional Materials*, 29(3), 1–16. <https://doi.org/10.1002/adfm.201804943>
- Mahdavi, S., Molodi, P. and Zarabi, M. (2018). Functionalized MgO, CeO₂ and ZnO nanoparticles with humic acid for the study of nitrate adsorption efficiency from water. *Research on Chemical Intermediates*, 44(9), 5043–5062. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3408-y>
- Malathi, S., Balashanmugam, P., Devasena, T. and Kalkura, S. N. (2021). Enhanced antibacterial activity and wound healing by a novel collagen blended ZnO nanoparticles embedded niosome nanocomposites. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102498>
- Manikandan, B., Endo, T., Kaneko, S., Murali, K. R. and John, R. (2018). Properties of sol gel synthesized ZnO nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29(11), 9474–9485. <https://doi.org/10.1007/s10854-018-8981-8>
- Marin, Ștefania, Kaya, M. G. A., Ghica, M. V., Dinu-Pîrvu, C., Popa, L., Udeanu, D. I., Mihai, G. and Enachescu, M. (2018). Collagen-polyvinyl alcohol-indomethacin biohybrid matrices as wound dressings. *Pharmaceutics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040224>
- Martínez, C. M., Gun'ko, Y. and Vallet, R. M. (2018). ZnO nanostructures for drug delivery and theranostic applications. *Nanomaterials*, 8(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/nano8040268>
- Matinong, A. M. E., Chisti, Y., Pickering, K. L. and Haverkamp, R. G. (2022). Collagen Extraction from Animal Skin. *Biology*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/biology11060905>
- Meyer, M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMedical Engineering Online*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>
- Ming, Y., Xia, Y. and Ma, G. (2022). Aggregating particles on the O/W interface: Tuning Pickering emulsion for the enhanced drug delivery systems. *Aggregate*, 3(2). <https://doi.org/10.1002/agt2.162>
- Miotto, M., Olimpieri, P. P., di Rienzo, L., Ambrosetti, F., Corsi, P., Lepore, R., Tartaglia, G. G. and Milanetti, E. (2019). Insights on protein thermal stability: A graph representation of molecular interactions. *Bioinformatics*, 35(15), 2569–2577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1011>
- Murugesan, G., Latha, N., Suganya, K., Murugan, M., Munusamy, M. A. and Rajan, M. (2018). Stimulus-responsive zinc oxide-functionalized macromolecular humic acid nanocarrier for enhancement of antibacterial activity of ciprofloxacin hydrochloride. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 1109–1116. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.120>

- Murugesan, S., Gowramma, B., Lakshmanan, K., Reddy Karri, V. V. S. and Radhakrishnan, A. (2020). Oral Modified Drug Release Solid Dosage Form with Special Reference to Design; An Overview. *Current Drug Research Reviews*, 12(1), 16–25. <https://doi.org/10.2174/2589977511666191121094520>
- Naidu, N. A., Wadher, K. and Umekar, M. (2021). An Overview on Biomaterials: Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(1-s), 154–161. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i1-s.4723>
- Nasim Kiaie, F. A. and M. R. (2017). Particles/Fibers/Bulk. In A. T. Mehdi Razavi (Ed.), *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation* (Vol. 7, Issue 1, pp. 7–25). Woodhead Publishing, Elsevier Ltd.
- Naveed UIHaq, A., Nadhman, A., Ullah, I., Mustafa, G., Yasinzai, M. and Khan, I. (2017). Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity. *Journal of Nanomaterials*, 2017(1–15). <https://doi.org/10.1155/2017/8510342>
- NEACSU, I.-A., MELENTE, A. E., HOLBAN, A.-M., FICAI, A., DITU, L.-M., KAMERZAN, C.-M., TIHĂUAN, B. M., NICOARA, A. I., BEZIRTZOGLU, E., CHIFIRIUC, M.-C. and PIRCALABIORU, G. G. (2019). Novel hydrogels based on collagen and ZnO nanoparticles with antibacterial activity for improved wound dressings. *Romanian Biotechnological Letters*, 24(2), 317–323. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.2/317.323>
- Niinomi, M. (2019). Design and development of metallic biomaterials with biological and mechanical biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 107(5), 944–954. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36667>
- Olaru, A. G., Butculescu, V., Dumitriu, C., Badea, N., Popescu, S., Ungureanu, C. and Pirvu, C. (2022). Biopolymers as intermediate layers for amoxicillin grafting on antibacterial surface. *Surfaces and Interfaces*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.102224>
- Ouni, B., Larbi, T. and Amlouk, M. (2022). Vibrational, Electronic and Structural Study of Sprayed ZnO Thin Film Based on the IR-Raman Spectra and DFT Calculations. *Crystal Structure Theory and Applications*, 11(02), 23–38. <https://doi.org/10.4236/csta.2022.112002>
- Patini, R., Mangino, G., Martellacci, L., Quaranta, G., Masucci, L. and Gallenzi, P. (2020). The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: a systematic review. *Antibiotics*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010022>
- Patra, N., Salerno, M. and Cernik, M. (2017). Electrospun polyvinyl alcohol/pectin composite nanofibers. In *Electrospun Nanofibers* (pp. 599–608). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00022-2>
- Peltonen, L., Singhal, M. and Hirvonen, J. (2020). Principles of nanosized drug delivery systems. In *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery* (pp. 3–25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102985-5.00001-2>
- Pitt Kendall. (2022). *Pharmaceutical Development*. In R. D. Raynond G.Hill (Ed.), *Drug Discovery and Development: Technology in Transition* (3rd ed., pp. 233–243). Elsevier Ltd. [https://books.google.com.pe/books?id=pOIuEAAAQBAJ&pg=PA241&dq=pharmaceutical+forms+of+modified+delivery&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiXyLmSmYX3AhWEtZUCHaRnCi04UBDoAXoECAoQAQ#v=onepage&q=pharmaceutical forms of modified delivery&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=pOIuEAAAQBAJ&pg=PA241&dq=pharmaceutical+forms+of+modified+delivery&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiXyLmSmYX3AhWEtZUCHaRnCi04UBDoAXoECAoQAQ#v=onepage&q=pharmaceutical%20forms%20of%20modified%20delivery&f=false)
- Ponciano, R. C. de O., Costa, A. C. F. de M., Barbosa, R. C., Fook, M. V. L. and Ponciano, J. J. (2021). Chitosan and hydroxyapatite scaffolds with amoxicillin for bone repair. *Research, Society and Development*, 10(5), e13410514790. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14790>
- Popko, I. M. and K. (2017). Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Photoinactivation of Pathogens. In R. S. Mahendra Rai (Ed.), *Metal Nanoparticles in Pharma* (pp. 267–279). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63790-7_12

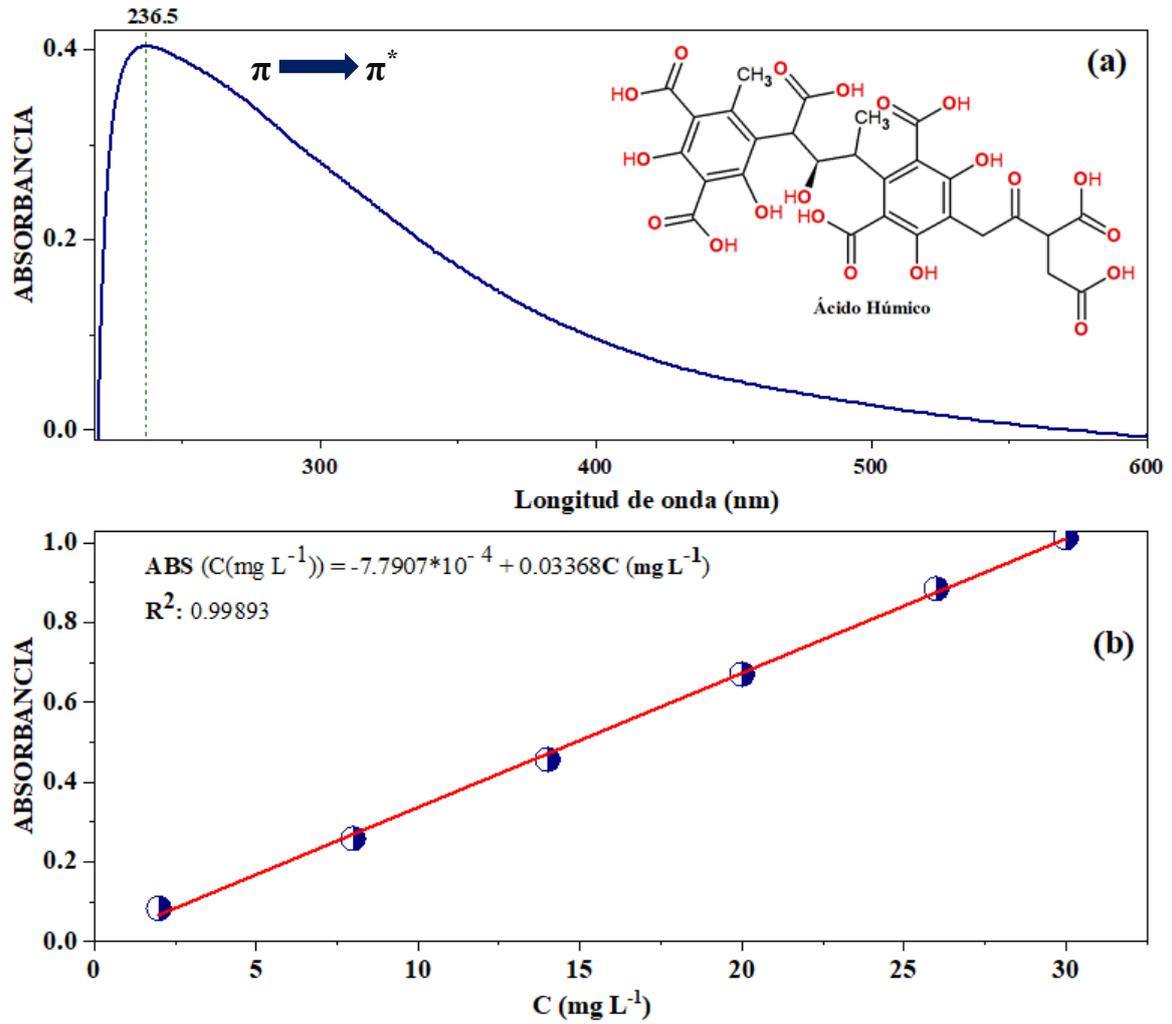
- Preetha, B., Sreekala, M. S. and Sabu, T. (2018). Fundamental Biomaterials: Metals. In S. T. Preetha Balakrishnan, Sreekala M.S (Ed.), Fundamental Biomaterials: Metals. Woodhead Publishing,Elsevier Ltd.
- Preetha, B., V.G. Geethamma, Meyyapallil Sadasivan, S. and Sabu, T. (2018). Polymeric biomaterials: State of the art and new challenges. In S. M. S. Sabu Thomas, Preetha Balakrishnan (Ed.), Fundamental Biomaterials: Polymers (pp. 1–35). Woodhead Publishing,Elsevier Ltd.
- Priyanka, B., Sonia, T., Nazma, I., Vishnukant K, M. and Ambikanandan, M. (2021). Polymers in drug delivery: An update. In A. S. Ambikanandan Misra (Ed.), Applications of Polymers in Drug Delivery (2nd ed.). Elsevier Inc.
- Promoting the Quality of Medicines(PQM). (2017). Product Information Report: Amoxicillin. In U.S. Pharmacopeial Convention.
- Pujari, S. P., Scheres, L., Marcelis, A. T. M. and Zuilhof, H. (2014). Covalent surface modification of oxide surfaces. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(25), 6322–6356. <https://doi.org/10.1002/anie.201306709>
- Radulescu, D. M., Neacsu, I. A., Grumezescu, A. M. and Andronescu, E. (2022). New Insights of Scaffolds Based on Hydrogels in Tissue Engineering. *Polymers*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/polym14040799>
- Rahale, C. S., Lakshmanan, A., Sumithra, M. G. and Kumar, E. R. (2021). Humic acid involved chelation of ZnO nanoparticles for enhancing mineral nutrition in plants. *Solid State Communications*, 333. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2021.114355>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S. S., Sharifi, F., Jalilian, E., Nuutila, K., Giatsidis, G., Mostafalu, P., Derakhshandeh, H., Yue, K., Swieszkowski, W., Memic, A., Tamayol, A. and Khademhosseini, A. (2018). Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 127, 138–166. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.04.008>
- Sarah J. Trenfield, A. W. B. (2020). Modified drug release: Current strategies and novel technologies for oral drug delivery. In H. A. S. MARTINS, JOÃO PEDRO (Ed.), *Nanotechnology for Oral Drug Delivery* (pp. 177–197). Elsevier Inc.
- Sawant, A., Kamath, S., Kg, H. and Kulyadi, G. P. (2021). Solid-in-Oil-in-Water Emulsion: An Innovative Paradigm to Improve Drug Stability and Biological Activity. *AAPS PharmSciTech*, 22(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02074-y>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. and Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913–922.
- Schroepfer, M. and Meyer, M. (2017). DSC investigation of bovine hide collagen at varying degrees of crosslinking and humidities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.124>
- Seyedsina Moeinzadeh, E. J. (2017). Nanoparticles and their Applications. In Bharat Bhushan (Ed.), *Nanotechnology Reviews* (4th ed., pp. 335–361). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3>
- Shakeel. Ahmed, Saiqa, I., Svarhan, K. and Krishna, B. (2018). *Biocomposites:Biomedical and Enviromental Applications* (K. B. Shakeel Ahmed, Saiqa Ikram, Svarhan Kanchi, Ed.; Vol. 148). Pan Stanford Publishing.
- Sheikholeslam, M., Wright, M. E. E., Jeschke, M. G. and Amini-Nik, S. (2018). Biomaterials for Skin Substitutes. *Advanced Healthcare Materials*, 7(5), 1–20. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700897>
- Shukla, S. (2011). FREEZE DRYING PROCESS: A REVIEW. 2(12), 3061–3068. www.ijpsr.com

- Siamidi, M. V. and A. (2020). Biopolymers, liposomes, and nanofibers as modified peroral drug release formulants. In C. D. NATASSA PIPPA (Ed.), *Nanomaterials for clinical applications: Case Studies in Nanomedicines* (pp. 252–270). Elsevier Inc.
- Sionkowska, A., Skrzyński, S., Śmiechowski, K. and Kołodziejczak, A. (2016). The review of versatile application of collagen. *Polymers for Advanced Technologies*, 28(1), 4–9. <https://doi.org/10.1002/pat.3842>
- Siswanto, Rochman, N. T. and Akwalia, P. R. (2017). Fabrication and characterization of Zinc Oxide (ZnO) nanoparticle by sol-gel method. *Journal of Physics: Conference Series*, 853(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/853/1/012041>
- Sobhanian, P., Khorram, M., Hashemi, S. S. and Mohammadi, A. (2019). Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 977–987. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.045>
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M. and Zeugolis, D. I. (2018). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials*, 31(1), 1–39. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
- Staicu, T., Cîrcu, V., Ioniț, G., Ghica, C., Popa, V. T. and Micutz, M. (2015). Analysis of bimodal thermally-induced denaturation of type I collagen extracted from calfskin. *RSC Advances*, 5(48), 38391–38406. <https://doi.org/10.1039/c5ra02708j>
- Sun, L., Li, B., Song, W., Si, L. and Hou, H. (2017). Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. *Process Biochemistry*, 63, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.003>
- Suparno, O. and Prasetyo, N. B. (2019). Isolation of collagen from chicken feet with hydro-extraction method and its physico-chemical characterisation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 335(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/335/1/012018>
- Swiech, W. M., Hamerton, I., Zeng, H., Watson, D. J., Mason, E. and Taylor, S. E. (2017). Water-based fractionation of a commercial humic acid. Solid-state and colloidal characterization of the solubility fractions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 508, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.08.031>
- Taghzouti, O. K., el Mabrouk, K., Bricha, M. and Nouneh, K. (2019). Controlled adsorption and release of amoxicillin in GO/HA composite materials. *SN Applied Sciences*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0240-y>
- Tai, Z., Huang, Y., Zhu, Q., Wu, W., Yi, T., Chen, Z. and Lu, Y. (2020). Utility of Pickering emulsions in improved oral drug delivery. *Drug Discovery Today*, 25(11), 2038–2045. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.012>
- Tan, Y. and Chang, S. K. C. (2018). Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*, 242(September), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.013>
- Thambavita, D., Galappathy, P., Mannapperuma, U., Jayakody, L., Cristofolletti, R., Abrahamsson, B., Groot, D. W., Langguth, P., Mehta, M., Parr, A., Polli, J. E., Shah, V. P. and Dressman, J. (2017). Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Amoxicillin Trihydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(10), 2930–2945. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.068>
- Troy, E., Tilbury, M. A., Power, A. M. and Wall, J. G. (2021). Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym13193321>

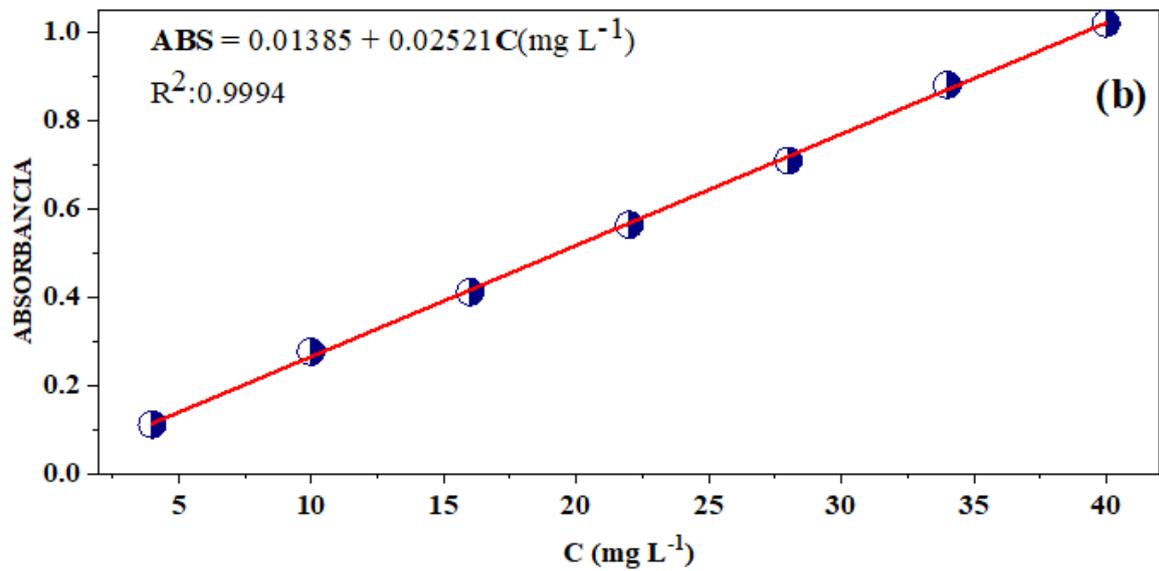
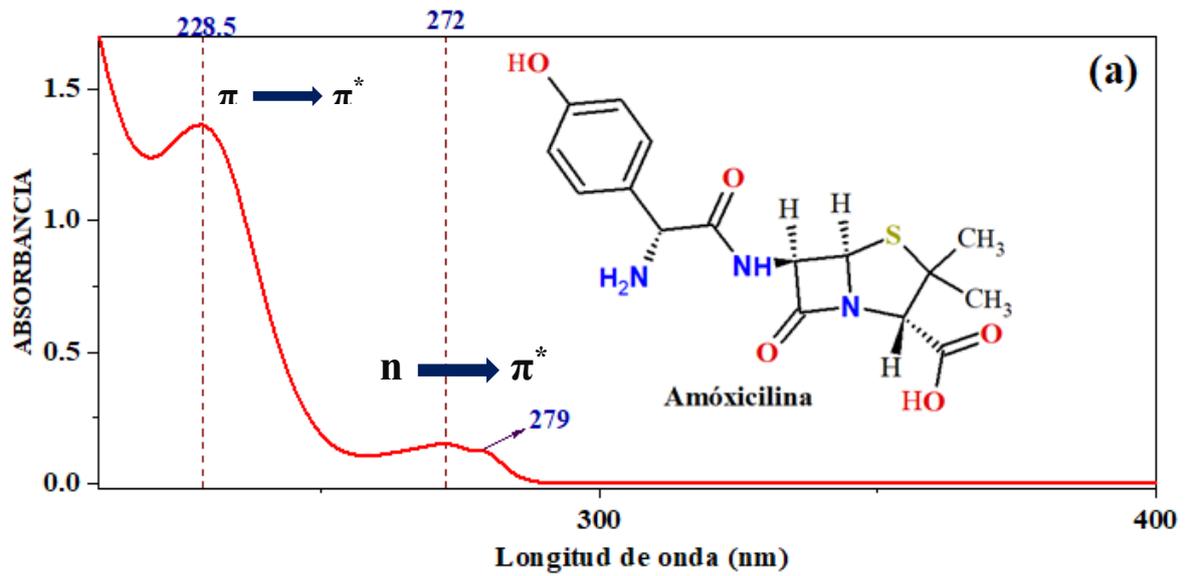
- Ungula, J. and Dejene, B. F. (2016). Effect of solvent medium on the structural, morphological and optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by the sol-gel method. *Physica B: Condensed Matter*, 480, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2015.10.007>
- Vasif Hasirci, N. H. (2018). *Fundamentals of biomaterials*. Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-88-470-1195-3_1
- Vedhanayagam, M., Unni Nair, B. and Sreeram, K. J. (2018). Collagen-ZnO Scaffolds for Wound Healing Applications: Role of Dendrimer Functionalization and Nanoparticle Morphology. *ACS Applied Bio Materials*, 1(6), 1942–1958. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00491>
- Wang, M., Li, J., Li, W., Du, Z. and Qin, S. (2018). Preparation and characterization of novel poly (vinyl alcohol)/collagen double-network hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(2017), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.200>
- Wells, C. M., Beenken, K. E., Smeltzer, M. S., Courtney, H. S., Jennings, J. A. and Haggard, W. O. (2018). Ciprofloxacin and Rifampin Dual Antibiotic-Loaded Biopolymer Chitosan Sponge for Bacterial Inhibition. *Military Medicine*, 183, 433–444. <https://doi.org/10.1093/milmed/usx150>
- Xu, T., Ding, Y., Liang, Z., Sun, H., Zheng, F., Zhu, Z., Zhao, Y. and Fong, H. (2020). Three-dimensional monolithic porous structures assembled from fragmented electrospun nanofiber mats/membranes: Methods, properties, and applications. *Progress in Materials Science*, 112, 100656. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100656>
- Yaser, D. (2019). *Applications in Nanomedicine and Drug Delivery Systems*. In *Biomaterials Science and Technology: Fundamentals and Developments* (pp. 197–234). Taylor & Francis Group, LLC.
- Yaser Dahman. (2019). *Biomaterials Science and Technology :Fundamentals and Developments*. Taylor & Francis Group.
- Zachary I. Stryker, M. R. and S. A. M. (2020). Multifunctional Gold Nanoparticles in Drug Delivery Systems. In R. B. and G. F. A. Shaker A. Mousa (Ed.), *The Road from Nanomedicine to Precision Medicine* (A, Vol. 4, pp. 215–238). Jenny Stanford Publishing Pte. Ltd.
- Zhang, L., Li, Z., Xiao, Y., Liu, Z., Pei, Y., Wang, G. and Tang, K. (2020). Dissolution of collagen fibers from tannery solid wastes in salt aqueous solutions: Hofmeister series evaluation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(4), 1225–1233. <https://doi.org/10.1002/jctb.6311>
- Zindani, D., Kumar, K. and Paulo Davim, J. (2019). Metallic biomaterials-A review. In *Mechanical Behaviour of Biomaterials* (pp. 83–99). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102174-3.00004-8>

Anexos

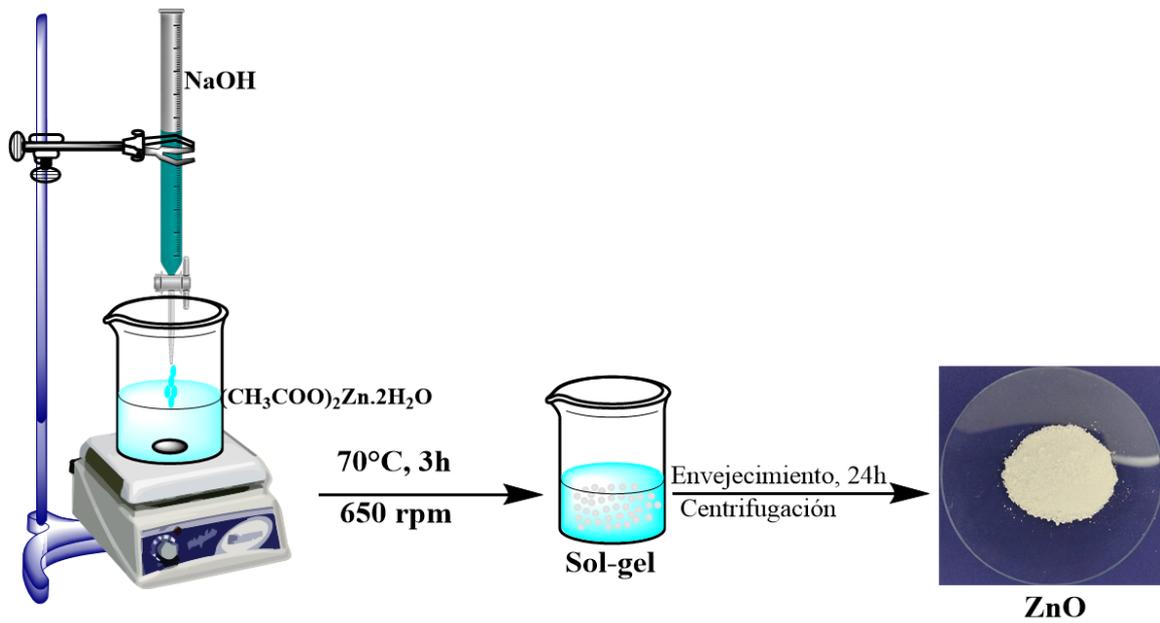
Anexo 1: Espectro UV-Visible (a) y curva de calibración (b) del ácido húmico



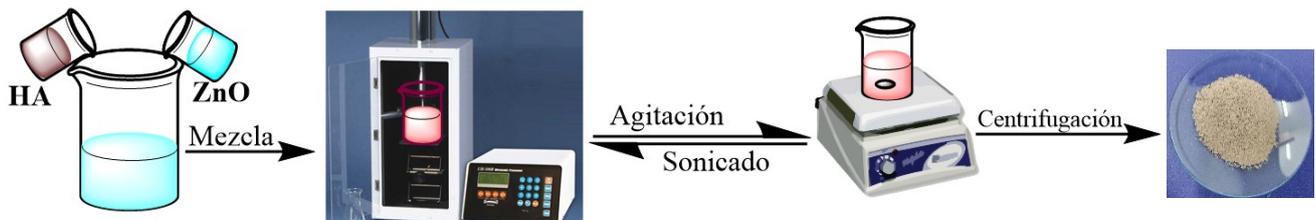
Anexo 2: Espectro UV-Visible (a) y curva de calibración (b) de la Amoxicilina.



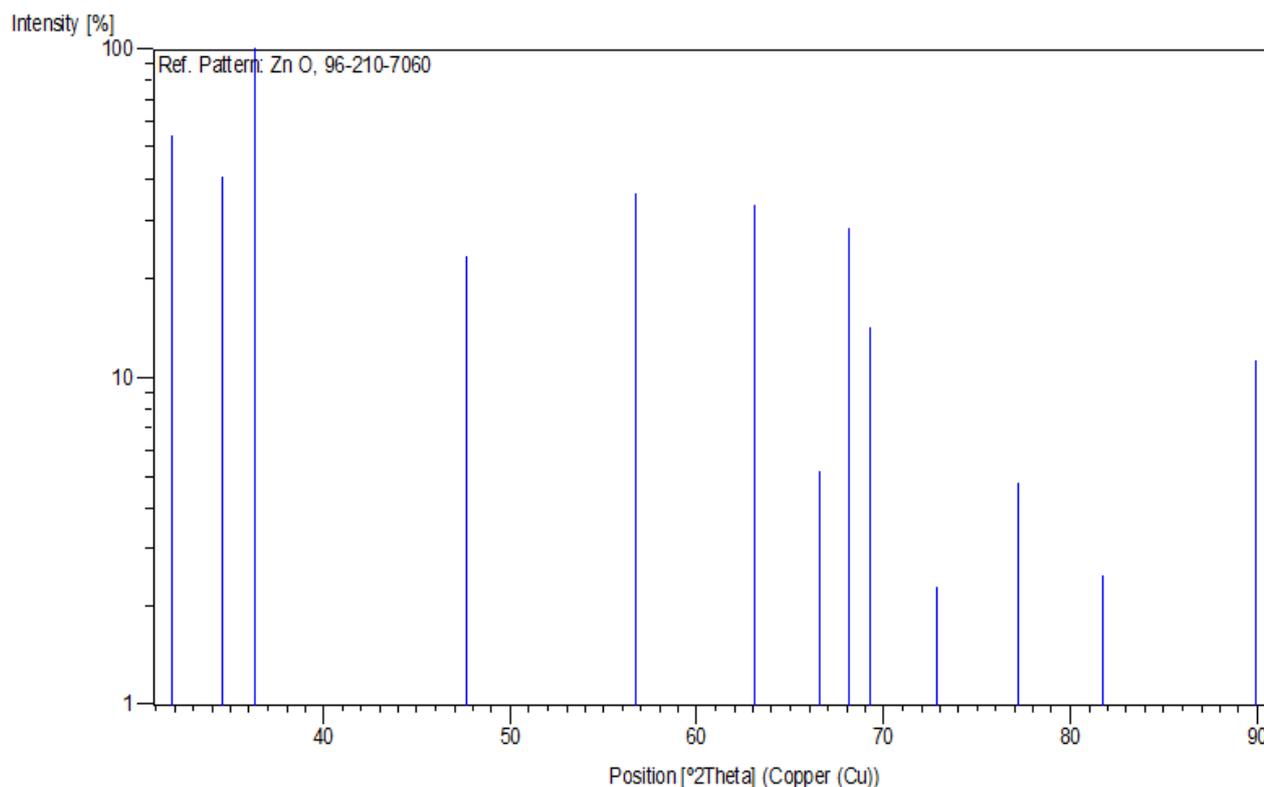
Anexo 3: Esquema representativo del proceso de síntesis de las Nps de ZnO.



Anexo 4: Proceso esquemático de la funcionalización de las Nps de ZnO.



Anexo 5: Carta cristalográfica DRX del patrón estándar de ZnO.



Subfiles and Quality

Subfiles: User Inorganic
Quality: None ()

Comments

Creation Date: 8/02/2021 17:55:55
Modification Date: 8/02/2021 17:55:55
Publication title: Atomic displacement, anharmonic thermal vibration, expansivity and pyroelectric coefficient thermal dependences in Zn O.
COD database code: 2107059

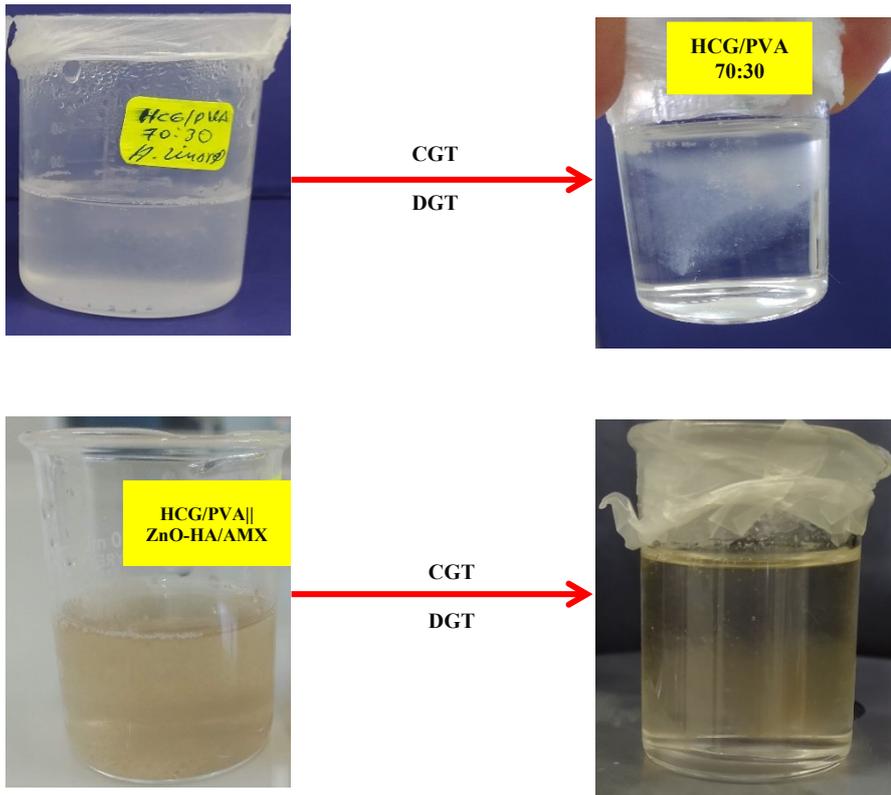
References

Structure: Albertsson, J., Abrahams, S.C., Kvick, A., *Acta Crystallographica B* (39,1983-), **45**, 34 - 40, (1989)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	1	0	0	2.80765	31.847	54.5
2	0	0	2	2.59400	34.550	40.8
3	1	0	1	2.46925	36.354	100.0
4	1	0	2	1.90530	47.694	23.4
5	1	1	0	1.62100	56.745	36.1
8	1	1	2	1.37466	68.161	28.6
9	2	0	1	1.35509	69.284	14.1
10	0	0	4	1.29700	72.870	2.3
11	2	0	2	1.23462	77.205	4.8
12	1	0	4	1.17744	81.721	2.5
13	2	0	3	1.08992	89.942	11.2

Anexo 6: Formación de la doble red en el hidrogel para la obtención de las esponjas por liofilización.





Certificado

Certificamos que **Linares-paisig, H.; Valderrama-negrón, A.C.; Carlos-salazar, M.** apresentou(aram) o trabalho "LIBERACIÓN DE AMÓXICILINA DESDE ESPONJAS DE COMPÓSITO DE COLÁGENO/ALCOHOL POLIVINÍLICO CONTENIENDO NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO HÚMICO." no **35º Congresso Latinoamericano de Química e 61º Congresso Brasileiro de Química**, realizados de 14 a 18 de Novembro de 2022, no Centro de Eventos do Windsor Flórida Hotel, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Rio de Janeiro, 18 de Novembro de 2022.

*Jorge Cardoso Messeder
Presidente do 35º CLAQ*

*Florinda do Nascimento Cersósimo
Presidente do 61º CBQ*