



Obtención y caracterización de un sistema de liberación de Sr⁺² a partir de entrecruzamiento iónico de alginato

María Luz Torrez^{1,2}, Juan Manuel Fernandez², Tamara Oberti¹

1. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata (UNLP –CONICET), Diag. 113. y 64 (1900), La Plata, Argentina.
2. Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115 (1900), Argentina.

*E-mail: toberti@inifta.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Alginato de sodio
Liberación Sr⁺²
Biomaterial

RESUMEN

El hueso es un órgano con funciones críticas para la fisiología humana, ya que no solo se encarga de la protección y soporte de otros tejidos, sino que también interviene en la homeostasis mineral, regula el pH sanguíneo y aloja a múltiples células progenitoras. El tejido óseo posee la capacidad única de poder repararse a sí mismo sin dejar cicatrices, no obstante, bajo algunas situaciones, tales como: grandes fracturas óseas, enfermedades como tumores o situaciones metabólicas, esta capacidad se ve limitada por lo que se requiere la anteversión médica para el tratamiento del daño óseo. Los procedimientos para este tipo de lesiones tienen un impacto clínico y económico enorme. Por ello, en el presente trabajo se aborda dicha problemática mediante la ingeniería de tejido óseo la cual utiliza distintos materiales que puedan servir de relleno del daño óseo para guiar su reparación. Un posible material podría ser a base de alginato ya que posee propiedades acordes para la aplicación buscada: buena biocompatible, baja toxicidad y económicamente accesible, aunque presenta buena solubilidad en agua. A partir de la incorporación de iones Ca⁺² y Sr⁺² a soluciones de alginato de sodio se logró un material entrecruzado, con mayor estabilidad en medios acuosos, como sistema de liberación de Sr⁺². La importancia de este catión se debe a que se ha demostrado su efecto anabólico sobre el hueso. Se analizó la concentración de los iones empleados como entrecruzados y los tiempos de gelación sobre la liberación de estroncio. Dichos sistemas fueron caracterizados por ensayos de hinchamiento y degradación encontrándose que el porcentaje del ion liberado depende del tiempo de gelación de las muestras, ya que al cabo de 6 días se cuantificó en el medio un 28,5 %, 24,8 % y 17,1 % de Sr⁺² para 1, 12 y 24 h de gelación, respectivamente.

Obtaining and characterizing a Sr⁺² release system from alginate ionic crosslinking

KEYWORDS

Sodium alginate
Sr⁺² release
biomaterials

ABSTRACT

Bone is an organ with critical functions for human physiology. Bone tissue has the unique ability to repair itself without scarring, however, under some situations, such as: bone fractures or diseases, this ability is limited and requires expensive clinical interventions for the treatment of bone damage. Thus, in the present work, this problem is addressed through bone tissue engineering, which uses different materials to serve as fillers for bone damage to guide its repair. A possible material could be an alginate base since it has good properties: biocompatible, low toxicity and economically accessible, although it is soluble in water. From the incorporation of Ca⁺² and Sr⁺² ions to sodium alginate solutions, a cross-linked material will be obtained, with greater stability in aqueous media, as a Sr⁺² release system. The concentration of the ions used as crosslinking and the gelation times on the strontium release were analyzed. These systems were characterized by swelling and degradation tests, finding that the percentage of the ion released depends on the gelation time of the samples, since after 6 days 28,5 %, 24,8 % and 17,1 % were quantified in the medium for 1, 12 and 24 h of gelation, respectively.

1. Introducción

El alginato de sodio es un polisacárido natural aniónico, no ramificado presente en algas pardas o bacterias, ampliamente investigado para su uso en una gran cantidad de aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, relativo bajo costo y capacidad de gelación cuando se lo entrecruza con cationes divalentes, particularidad que lo hace único al compararlo con otros polianiones. Esta propiedad se encuentra directamente relacionada con su composición (Tan et al., 2020; Torres et al., 2019) y la afinidad por los cationes divalentes está dada de manera exclusiva por los bloques poliguluronato (poliG) que componen la estructura del polímero natural. Se conoce que la selectividad por los metales aumenta marcadamente con el incremento en el contenido de bloques de α -L-guluronato (G) en el polisacárido, mientras que los bloques de polimanuronato (poliM) y los bloques de residuos alternados MG prácticamente no muestran selectividad, aunque sí se ha demostrado que los iones Ca^{+2} pueden unirse de manera inespecífica al poliM (Mørch et al., 2006). A su vez, la afinidad del alginato por estos metales aumenta en el orden $\text{Mg}^{+2} \ll \text{Ca}^{+2} < \text{Sr}^{+2} < \text{Ba}^{+2}$.

El ranelato de estroncio (RaSr) es una sal orgánica que ha sido utilizada como medicamento antiosteoporótico empleada principalmente en el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas debido a la actividad del Sr^{+2} como droga anabólica y anticatabólica ósea, es decir presenta un mecanismo de acción dual, ya que inhibe la actividad osteoclástica disminuyendo la resorción ósea y estimula la actividad osteoclástica, incrementando la formación de hueso. El Sr^{+2} , por analogía con el Ca^{+2} , puede actuar uniéndose al receptor sensor de Ca^{+2} (CaRS) y de esta manera mediar tanto un aumento en la apoptosis de osteoclastos como en la replicación de preosteoblastos y osteoblastos (Lino et al., 2016; Lino et al., 2018). También, se ha demostrado un efecto directo de Sr^{+2} (tanto en su forma RaSr como SrCl_2) en la enzima fosfatasa alcalina (FAL), proveniente de extractos de células de la línea establecida UMR106, encontrándose además un aumento de afinidad de la enzima por su sustrato de manera dependiente de la concentración de Sr^{+2} (Fernández et al., 2014). Sin embargo, su uso se ha asociado a eventos cardiovasculares al ser administrado vía oral (EMA, 2014; Molinuevo et al., 2017), por ello, resulta interesante desarrollar un sistema de liberación de Sr^{+2} que actué localmente en el sitio óseo a reparar con el fin de evitar los efectos secundarios mencionados.

Por su parte, los hidrogeles de alginato pueden ser utilizados para la liberación controlada, específicamente localizada, de fármacos encapsulados en el polímero; lo que es usualmente deseable para permitir concentraciones locales favorables y sostenidas en el tiempo con una exposición mínima a otros tejidos (Langer, 1998; Langer, 2000).

En el presente trabajo se desarrollan hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente con Sr^{+2} como principio activo para su evaluación como sistema de liberación de drogas con acción local.

2. Materiales y métodos

Reactivos

Cloruro de calcio (CaCl_2 93%, Cicarelli), Cloruro de estroncio (SrCl_2 99.9%, Sigma), Cultivo celular: medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM. En polvo, alto en glucosa, con L-glutamina y rojo de fenol. Sin HEPES, piruvato de sodio ni bicarbonato de sodio), Gibco®, Thermo Fisher Scientific. (Buenos Aires, Arg.). Material de cultivo celular, Nunc (CABA, Arg.). Alginato de sodio comercial (Sigma Aldrich, CAS Number 9005-38-3)

Obtención de hidrogeles

Los hidrogeles fueron obtenidos a partir de una solución al 2 % p/v de alginato de sodio en agua destilada a la que se incorporaron soluciones de CaCl_2 y/o SrCl_2 . Brevemente, la solución de polímero fue esterilizada por autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 15 minutos y las soluciones de sales preparadas en agua bidestilada se esterilizaron por filtración con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,22 μm (Corning®). Luego, la solución de alginato se transfirió a una placa de cultivo de 24 pocillos colocando 1 ml de la solución por pocillo. El entrecruzamiento se llevó a cabo con el agregado de 500 μL de una solución de CaCl_2 25 mM, junto con distintas concentraciones de SrCl_2 (0,05; 0,10; 0,25 ó 0,50 mM). Además, se sintetizó un hidrogel sólo con iones Ca^{+2} para ser utilizada como condición control. A su vez, cada una de estas variables fue sometida a 1, 12 y 24 h de gelación; dejando las placas en agitación constante durante el tiempo correspondiente en un agitador elíptico (Fábrica de aparatos científicos S.A.).

Una vez finalizado el periodo de entrecruzamiento, los hidrogeles fueron congelados a -4 °C durante la noche para su posterior secado por liofilización a -40 °C; en un liofilizador Scientz 10N provisto por Hiotek, China.

Liberación de Sr⁺²

Para el análisis del perfil de liberación de Sr⁺² por parte de los hidrogeles se colocó 1 mL de DMEM en cada pocillo y se los mantuvo en una estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO₂. Se recolectó el medio a 1, 2, 3 y 6 días y se monitoreó la cantidad del ion presente en el sobrenadante usando un espectrofotómetro de absorción atómica (AA-7000, Shimadzu). Para relacionar la absorbancia con la cantidad de ion presente se realizó una curva de calibración con estándar de Sr⁺² de concentraciones entre 0,5 y 2 ppm en DMEM. El mecanismo de difusión de Sr⁺² hacia el exterior del hidrogel se estimó utilizando los datos experimentales, empleando el modelo Ritger-Peppas (Ritger y Peppas, 1987) a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_f} = k t^n \quad (1)$$

Donde k es una constante del sistema que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el disolvente y soluto (Sr⁺²). Por su parte, n es un exponente difusional que describe el mecanismo de transporte de agua en la membrana, es decir que otorga información sobre el mecanismo físico que controla la liberación del soluto. Por otro lado, M_t y M_f corresponden a la masa de droga acumulada al tiempo t y en el tiempo final del ensayo, respectivamente. Mediante los datos experimentales (hasta 60 % de la liberación respecto del máximo) se puede realizar un gráfico de $\log (M_t / M_f)$ frente a $\log t$, en el cual el valor n se ve representado en la pendiente y k se obtiene a partir de la intersección de la recta con el eje Y.

Estudio de hinchamiento y degradación

Se estudió la capacidad máxima de hinchamiento en los hidrogeles obtenidos. Para ello, los materiales obtenidos fueron congelados a -4 °C y luego secados hasta peso constante en liofilizador (peso seco, w_0) y posteriormente fueron inmersos en agua destilada a 37 °C. A intervalos regulares de tiempo, las membranas fueron retiradas y pesadas nuevamente, esta vez en estado húmedo (peso húmedo, w_s). El contenido de agua absorbida por el hidrogel se calculó como la diferencia entre w_s y w_0 , mientras que el porcentaje de hinchamiento (swelling, Sw) se definió como:

$$\% S_w = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (2)$$

Además, se analizó la degradación de los hidrogeles luego del estudio de hinchamiento. Para ello, luego de cada período de tiempo evaluado, se retiraron las muestras del agua destilada y se congelaron a -4 °C durante la noche para su posterior liofilización hasta peso constante (peso final seco, w_d). De esta manera, se comparó el peso inicial seco (w_0) de las muestras con el peso final seco luego del proceso de hinchamiento (w_d), empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{(w_0 - w_d)}{w_0} \times 100 \quad (3)$$

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

3. Resultados y Discusión

Obtención de hidrogeles

En este trabajo se pretendió desarrollar un hidrogel para ser utilizado en ingeniería de tejido óseo, como sistema de liberación de Sr⁺² como droga osteoinductora. Estudios previos (Fernández et al., 2013) demostraron que concentraciones de RaSr cercanas a 0,1 mM resultan óptimas para el incremento de la función y actividad osteoblástica. Además, se ha reportado que los niveles séricos de Sr⁺² en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis en tratamientos a largo plazo con RaSr se encuentran entre los 0,1 - 0,2 mM (Marie, 2008). Es por ello por lo que se seleccionaron concentraciones de Sr⁺² que pudiera, luego de su liberación, alcanzar una concentración de 0,1 mM. Sin embargo, luego de realizar algunos ensayos preliminares, se observó que los hidrogeles no poseían una estabilidad adecuada para su aplicación como soporte en el sitio de lesión. Por lo tanto, para aumentar la estabilidad del material sin incrementar la concentración de Sr⁺², la cual podría llegar a tener efectos tóxicos, se procedió a realizar entrecruzamientos con el agregado de Ca⁺² a distintos tiempos de gelación.

En la siguiente imagen (Figura 1) se muestran las membranas obtenidas con concentraciones de Sr⁺² de 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 mM a 1, 12 y 24 h de gelación. En todos los casos los hidrogeles se

aditivaron con una solución de ion Ca^{+2} 25 mM con el objetivo de favorecer el entrecruzamiento iónico de manera estable en caso de que las

concentraciones de Sr^{+2} no fueran suficientes para lograrlo. También se preparó una membrana sin Sr^{+2} como condición control.

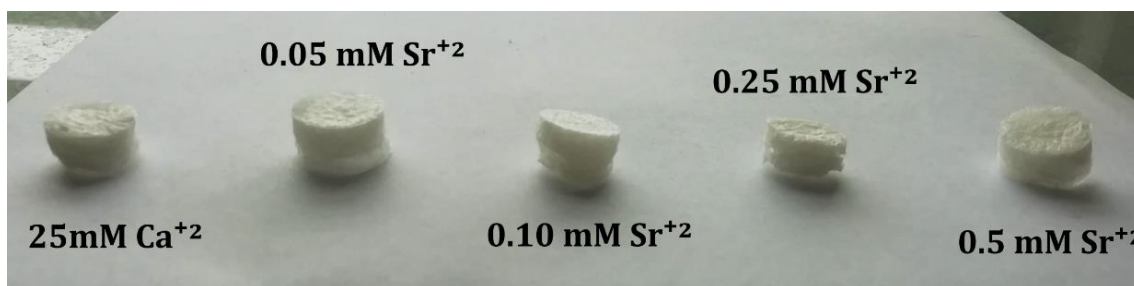


Figura 1. Hidrogeles en estado seco, luego de 24h de gelación.

Liberación de Sr^{+2}

La cinética de liberación del ion Sr^{+2} a partir de los hidrogeles obtenidos se evaluó luego de 1, 2, 3 y 6 días; se estudiaron los perfiles de liberación y se evaluó el mecanismo de transporte del catión involucrado en este proceso, desde la matriz polimérica. En la Figura 2 se exhibe el perfil de liberación de los materiales luego de 24 h de gelación. En ella, se puede observar que, con el transcurso del tiempo, la liberación del catión

aumenta de manera constante y de forma dependiente con la concentración de Sr^{+2} utilizada para preparar el hidrogel, de tal manera que el porcentaje del ion que difundió al medio luego de 6 días de cultivo fue de 10,7%, 12,3%, 13,6% y 17,1% para las concentraciones 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM y 0,5 mM respectivamente. En el caso de los hidrogeles con 1 y 12 h de gelación se observó un comportamiento similar, es decir, la liberación de Sr^{+2} aumenta con la concentración de estroncio utilizada en el hidrogel.

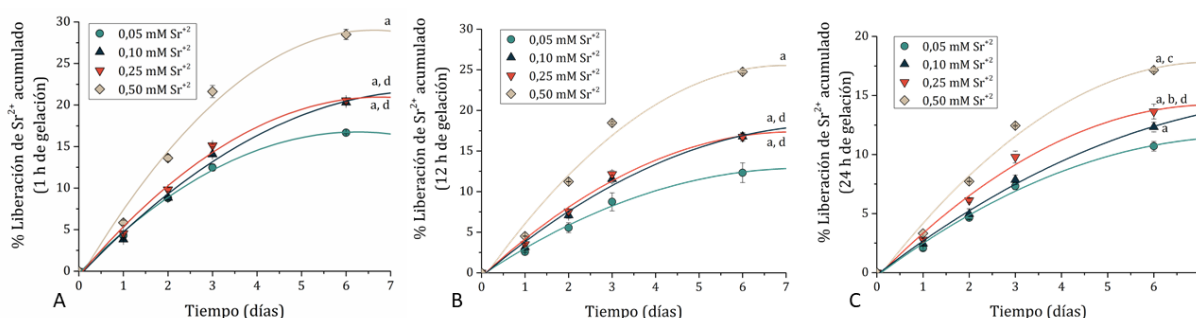


Figura 2. Liberación de Sr^{+2} a 1, 2, 3 y 6 días en hidrogeles con A) 1h de gelación B) 12 h de gelación C) 24 h de gelación.

a: $p < 0,001$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , b: $p < 0,01$ vs 0,10 mM Sr^{+2} , c: $p < 0,5$ vs 0,25 mM Sr^{+2} , d: $p < 0,001$ vs 0,50 mM Sr^{+2} .

A su vez, en la Figura 3 se muestran los porcentajes de liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para todos los hidrogeles con 1, 12 y 24 h de gelación. Cuando se evalúa la difusión del ion en hidrogeles con la misma carga inicial, puede observarse claramente que el tiempo de gelación tiene una influencia directa en la liberación, siendo esta inversamente proporcional al tiempo de gelación. Tal es el caso de los hidrogeles con 0,5 mM de Sr^{+2} , en los cuales puede apreciarse que el porcentaje de liberación fue de 28,5 %, 24,8 % y 17,1 % para 1, 12 y 24 h de gelación, respectivamente. Este mismo comportamiento fue observado para los hidrogeles restantes.

El método de gelación utilizado consiste en un proceso de intercambio iónico entre el Na^+ del alginato de sodio soluble en agua y los iones Sr^{+2} de la sal de SrCl_2 para obtener el gel en transición. Se ha demostrado que la gelación puede encontrarse distribuida de manera heterogénea en el alginato, ya que la mayor concentración de cationes divalentes se concentra en la superficie y disminuye de manera gradual hacia el centro del gel (Dragnet, 2009; Skjåk-Bræk et al., 1989). Estos autores indicaron que la difusión de iones crea una zona clara de gelificación que se mueve desde la superficie al centro del gel. El grado de homogeneidad en los hidrogeles de alginato puede ser controlado utilizando distintos parámetros, que involucran la concentración de iones, la cantidad de tiempo en la que el alginato se

encuentra en presencia de estos y el peso molecular del polímero. Esto indicaría, por lo tanto, que un mayor tiempo de gelación da lugar a una mayor difusión de los cationes hacia el centro de los hidrogeles, estimulado a su vez por la agitación, permitiendo la formación de interacciones iónicas más estables y que, por lo tanto, limitan la liberación de iones como el Sr^{+2} .

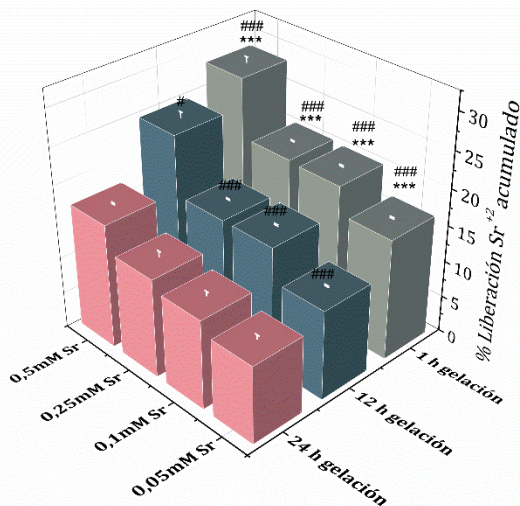


Figura 3. Liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para hidrogeles de 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación. #: $p < 0,5$ vs 12 h gelación, ***: $p < 0,001$ vs. 12 h gelación, ###: $p < 0,001$ vs 24 h gelación.

Además, a partir de las curvas de liberación (Figura 1) para cada condición de concentración de Sr^{+2} y tiempo de gelación utilizados, se procedió al análisis de los mecanismos de transporte asociados al proceso de liberación del principio activo desde el polímero. Para ello se utilizó el modelo de Ritger-Peppas, el cual proporciona información a partir del valor del exponente n de la ecuación matemática correspondiente (Ecuación 1); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Exponente difusional n para hidrogeles preparados con diferentes concentraciones de Sr^{+2} , luego de 1, 12 y 24 h de gelación.

Concentración Sr^{+2} (mM)	n 1 h gelación	n 12 h gelación	n 24 h gelación
0,05	1,03	1,11	1,17
0,1	1,20	1,01	1,16
0,25	1,11	1,14	1,10
0,5	1,22	1,21	1,31

Todos los valores calculados arrojaron un valor de $n > 1$ lo que indica una forma extrema de transporte conocida en la bibliografía como Super Caso II.

Este proceso de difusión de basa en que durante su desarrollo ocurre un proceso de plastificación como consecuencia de una disminución de las fuerzas atractivas entre las cadenas del polímero, que acelera la absorción de solvente sobre el final del proceso de penetración, y resulta en un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas (Ritger y Peppas, 1987; Llabot et al., 2004).

Estudio de hinchamiento y degradación

Durante el estudio de la cinética de hinchamiento en agua a 37 °C, todos los hidrogeles sintetizados a 1, 12 y 24 h de gelación mostraron un rápido incremento durante los primeros 5 minutos para luego alcanzar el equilibrio a los 120 minutos (2 h).

En la Figura 4 puede apreciarse que en todas las membranas el porcentaje máximo de hinchamiento superó el 4000%, logrando alcanzar valores de 10000% para algunos casos. En la Figura 4.A se encuentran representados los perfiles de hinchamiento para los cinco hidrogeles a 1 h de gelación. Aquellos correspondientes a 0,05 mM y 0,10 mM Sr^{+2} presentaron un porcentaje de hinchamiento muy superior a las matrices con mayor concentración del metal. Es posible que la presencia de un mayor número de átomos de Sr^{+2} favorezca la fuerza de las interacciones iónicas en la red de alginato, lo que implicaría la formación de redes más rígidas y, por lo tanto, con una menor tasa de hinchamiento.

Un efecto similar se observa en la figura 4.B, en hidrogeles con 12 h de gelación, en donde además se puede apreciar que la membrana que posee solo iones Ca^{+2} tiene un porcentaje de hinchamiento aún menor que los materiales con ambos cationes. Sin embargo, esta tendencia no se observa en hidrogeles con 24 h de gelación (Figura 4.C), indicando que posiblemente exista en este ensayo un factor adicional con influencia sobre la tasa de hinchamiento, además de la afinidad de los cationes.

Con el fin de visualizar el efecto del tiempo de gelación en la estabilidad de los hidrogeles, se presenta, en la Tabla 3, el porcentaje final de hinchamiento de estos luego de 24 h. En el presente trabajo se planteó la posibilidad de gelificar el alginato a tres tiempos distintos, bajo la hipótesis de

que cuanto mayor fuera el contacto de los iones con las cadenas del polímero, mejor sería la difusión de estos a lo largo de la matriz, por lo que se lograría obtener un hidrogel homogéneo con interacciones electrostáticas más estables que disminuirían la tasa de hinchamiento. Sin embargo, puede observarse

que solo los hidrogeles 0,05 y 0,10 mM Sr^{+2} cumplieron con esta predicción. Por el contrario, en 0,25 y 0,50 mM Sr^{+2} se encontró el efecto inverso, mientras que en el control sólo con Ca^{+2} se observaron fluctuaciones en el hinchamiento sin una tendencia clara.

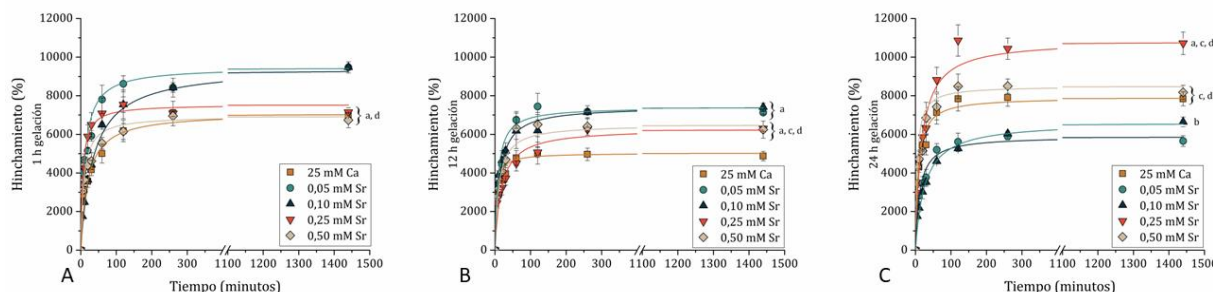


Figura 4. Hinchamiento de hidrogeles a 1, 12 y 24 h. a: $p < 0,001$ vs 25 mM Ca^{+2} ; b: $p < 0,5$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , c: $p < 0,001$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , d: $p < 0,01$ vs 0,10 mM Sr^{+2} , f: $p < 0,001$ vs 0,50 Mm Sr^{+2} .

Tabla 3 Porcentaje de hinchamiento para hidrogeles luego de 24 h. a: $p < 0,05$ vs misma concentración a 12 h gelación ([12 h]), b: $p < 0,001$ vs [12 h]. c: $p < 0,01$ vs misma concentración a 24 h gelación ([24 h]), d: $p < 0,001$ vs [24 h].

Concentración	1 h gelación	12 h gelación	24 h gelación
25 mM Ca^{+2}	6976 ± 84 ^{b, c}	4347 ± 240 ^d	7837 ± 363
0,05 mM Sr^{+2}	9473 ± 288 ^{b, d}	7123 ± 65 ^d	5655 ± 273
0,10 mM Sr^{+2}	9169 ± 126 ^{b, d}	7411 ± 201 ^d	6644 ± 252
0,25 mM Sr^{+2}	7144 ± 238 ^{a, d}	6297 ± 142 ^d	10718 ± 581
0,50 mM Sr^{+2}	6740 ± 400 ^c	6244 ± 443 ^d	8174 ± 360

Al finalizar este estudio, se evaluó el porcentaje de degradación de los hidrogeles encontrando que, luego de 24 h en agua, la degradación fue de alrededor de 30% o más para todos los casos (Tabla 4). Estos resultados indican una gran pérdida de masa en un lapso muy acotado, obteniéndose con el paso del tiempo, hidrogeles muy frágiles con inestabilidad entre las cadenas poliméricas, lo cual genera una gran dificultad a la hora realizar una lectura correcta sobre el mecanismo de difusión del solvente en los hidrogeles.

Bajpai y Sharma (2004) estudiaron el comportamiento de perlas de alginato entrecruzadas con Ca^{+2} . Ellos observaron que, después de lograr un máximo de hinchamiento en buffer fosfato salino (PBS, del inglés phosphate-buffered saline) estas comenzaban a perder peso hasta que finalmente se disolvían por completo. El mecanismo propuesto por los autores para explicar este comportamiento consiste, inicialmente, en el intercambio entre los iones Na^{+} de la solución externa y los iones Ca^{+2} unidos de manera

inespecífica a los grupos COO^{-} de las secuencias de polimanuronato. Como resultado, la repulsión electrostática entre los grupos carboxilo provoca la relajación de las cadenas, lo que favorece el hinchamiento del gel. Luego, avanzando en el proceso, los iones Ca^{+2} unidos a los grupos COO^{-} de las unidades de poliguluronato (que forman la estructura de “caja de huevo”) también comienzan a intercambiar iones Na^{+} con el medio, provocando la desintegración de las perlas.

En el presente trabajo se ha observado un comportamiento similar a pesar de no utilizar buffer fosfato como medio para el estudio que, incluso, coincide con el mecanismo difusivo del ion Sr^{+2} hallado al evaluar su liberación. Esto corrobora que el agua destilada no se encuentra completamente libre de iones, ya que además se ha demostrado que la ausencia de Na^{+} tanto en agua desionizada como en buffers (por ejemplo, Tris-HCl) evita casi por completo el hinchamiento de los materiales entrecruzados (Bajpai y Sharma, 2004; Mørch et al., 2006).

Zhou y colaboradores (Zhou et al., 2018) sintetizaron redes poliméricas de poli(acrilamida semi-interpenetradas con alginato, el cual fue entrecruzado iónicamente con soluciones al 0,1 M de los iones Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} y Ca^{+2} . Estos hidrogeles fueron sometidos a un ensayo de hinchamiento con PBS durante 100 h, en el cual todos los materiales mostraron porcentajes significativamente menores con respecto a un hidrogel control sin entrecruzamiento iónico. A su vez, el orden creciente de hinchamiento observado fue $\text{Sr}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Zn}^{+2} \approx \text{Ca}^{+2}$, demostrando que este fenómeno está fuertemente ligado a la naturaleza del metal utilizado. Por otro lado, Bajpai & Sharma (2004) observaron que el hinchamiento en PBS de las perlas de alginato se reducía de manera inversamente proporcional a la concentración de la solución de CaCl_2 utilizada para su entrecruzamiento. Mørch et al. (2006) fabricó perlas de los iones Ca^{+2} , Ba^{+2} y Sr^{+2} que gelificaron durante 10 minutos; utilizando alginatos con distinta composición de manurónico (M) y gularónico (G): uno con alto contenido de M (FM= 0,60) y otro con alto contenido de G (FG=0,66); observando que el radio de las perlas en solución salina se ve sumamente disminuido cuando el alginato rico en G es entrecruzado con Ba^{+2} y Sr^{+2} debido a la gran afinidad que tiene la subunidad de gularónico por estos iones. A su vez, al aumentar a 24 h el tiempo de gelación de los materiales, se obtuvieron geles aún más compactos.

Todo lo mencionado anteriormente indica que el hinchamiento de los hidrogeles de alginato está directamente relacionado al tipo y concentración del ion utilizado, la relación M/G del polímero y el tiempo de gelación. Esto concuerda con la hipótesis propuesta en este trabajo, que plantea que para hidrogeles de igual composición se obtienen materiales más estables y con hinchamientos menores cuanto mayor es el período de tiempo utilizado para la gelación. Varios autores concordaron en este sentido, independientemente del tipo de polímero o ion en particular utilizado en sus respectivos trabajos, lo que lleva a pensar que el método de síntesis para la formación de estos hidrogeles es determinante.

Por otro lado, la degradabilidad de un biomaterial es un factor principal en la regeneración de tejidos y la liberación de drogas. En este sentido, materiales con alta tasa de degradabilidad, como es en el caso del presente trabajo, presentan aplicación solo en casos puntuales donde se requiera un suministro de la

droga por un período muy acotado de tiempo. Además, este tipo de materiales también puede ser utilizado como parte de sistemas más complejos en los que cumpla la función de liberar Sr^{+2} dentro, por ejemplo, de un scaffold realizado de otro material polimérico más resistente.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se logró obtener una familia de hidrogeles de alginato con una gran capacidad de hinchamiento que, además, pueden actuar como sistema de liberación de droga. Estos materiales podrían utilizarse en aplicaciones que requieran una liberación de drogas catiónicas bivalente en un periodo corto de administración en sitios localizados a tratar.

5. Agradecimientos

Se agradece a CONICET, UNLP y CIC PBA por la financiación para la concreción del presente trabajo.

6. Referencias

- Bajpai, S. K.; y Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers* 59(2), 129-140.
- Draget, K. I. (2009). Alginates. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 807-828). Woodhead Publishing.
- European Medicines Agency. PRAC recommends suspending use of Protelos/Osseor (strontium ranelate).
- Fernández, J. M.; Molinuevo, M. S.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; Cortizo, A. M.; McCarthy, A. D. (2013). Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *European journal of pharmacology* 706 (1-3), 41-47
- Fernández, J. M.; Molinuevo, M. S.; McCarthy, A. D.; Cortizo, A. M. (2014). Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn^{2+} and Mg^{2+} . *Biometals* 27(3), 601-607.
- Hurtel-Lemaire, A. S.; Mentaverri, R.; Caudrillier, A.; Cournaire, F.; Wattel, A.; Kamel, S.; Brazier, M. (2009). The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis new insights into the associated signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 284(1), 575-584.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature-London* 392, 5-10.

- Langer, R. (2000). Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research* 33(2), 94-101.
- Lino, A.; Fernández, J.M.; Molinuevo, S.; Cortizo, A.M.; McCarthy, A. (2016). Efectos in vivo del Ranelato de Estroncio sobre células progenitoras de médula ósea de ratas diabéticas. *Actualizaciones en Osteología* 12(2), 78-86.
- Lino, A.; McCarthy, A.; Fernández, J.M. (2018). Evaluation of strontium-containing PCL-PDIPF scaffolds for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Annals of Biomedical Engineering* 47(3), 902-912.
- Llabot, J. M.; Manzo, R. H.; Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International journal of pharmaceutics* 276(1-2), 59-66.
- Marie, P. J. (2008). Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporosis international* 19(12), 1813-1813.
- Molinuevo, M. S.; Fernández, J. M.; Cortizo, A. M.; McCarthy, A. D.; Schurman, L.; Sedlinsky, C. (2017). Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 450, 94-104.
- Mørch, Y. A.; Donati, I.; Strand, B. L.; & Skjåk-Bræk, G. (2006). Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules* 7(5), 1471-1480.
- Ritger, P. L.; Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release* 5(1), 37-42.
- Skjåk-Bræk, G.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate polymers* 10(1), 31-54.
- Tan, L.L.; Sampathkumar, K.; Wong, J.H.; Loo, S.H. (2020). Divalent cations are antagonistic to survivability of freeze-dried probiotics encapsulated in cross-linked alginate. *Food and Bioproducts Processing* 124, 369-377.
- Torres, M.L.; Fernandez, J.M.; Dellatorre, F.G.; Cortizo, A.M.; Oberti, T.G. (2019). Purification of Alginate Improves its Biocompatibility and Eliminates Cytotoxicity in Matrix for Bone Tissue Engineering. *Algal Research* (40), 101499.
- Zhou, Q.; Kang, H.; Bielec, M.; Wu, X.; Cheng, Q.; Wei, W.; Dai, H. (2018). Influence of different divalent ions cross-linking sodium alginate-polyacrylamide hydrogels on antibacterial properties and wound healing. *Carbohydrate polymers* 197, 292-304.