

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL  
COMPLEJO AMPICILINA-SAL SÓDICA DEL POLI(ÁCIDO MALEICO-ALT-  
ISOBUTILENO) PAM-4Na SOBRE DIFERENTES CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus***

**DIANA CONSTANZA ANGULO NIEVA**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2016**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL  
COMPLEJO AMPICILINA-SAL SÓDICA DEL POLI(ÁCIDO MALEICO-ALT-  
ISOBUTILENO) PAM-4Na SOBRE DIFERENTES CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus***

**DIANA CONSTANZA ANGULO NIEVA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICA**

**TUTORES  
ANDRÉS FELIPE DÁVALOS VÉLEZ, MsC.  
CONSTAIN HUGO SALAMANCA MEJIA, PhD.**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2016**

**Aprobado por:**

---

**Leonardo Herrera Orozco, PhD  
Evaluador Externo**

---

**Andrés Felipe Dávalos Vélez, MSc.  
Director del Proyecto**

---

**Constain Salamanca Mejía, PhD  
Co-Director del Proyecto**

**Santiago de Cali, 03 de Junio de 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres que son la fuente de mi motivación, que me han apoyado a lo largo de mi carrera, y siempre confiaron en que podía alcanzar todas mis metas. También quiero agradecer a mi abuela y demás familiares que han estado presentes en muchos momentos valiosos durante los últimos años. Quiero agradecer a mis tutores, los profesores Constain y Andrés, por guiarme en el desarrollo de este proyecto gracias a sus conocimientos y esfuerzos invertidos durante el mismo. A la Universidad Icesi por brindarme una formación integral, que me permitió crecer profesional y personalmente; y por último, quiero agradecer a aquellas personas que de una y otra forma hicieron posible la realización de este proyecto.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	12
2.1. Pregunta de investigación y justificación .....	12
2.2. Marco teórico y estado del arte .....	13
2.2.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	13
2.2.2. Resistencia antibiótica y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.2.3. Sistemas de polielectrólitos .....	21
2.2.4. Espectroscopia infrarroja .....	23
2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido .....	23
2.2.6. Pruebas de microdilución en caldo .....	23
2.3. Objetivos .....	24
2.3.1. Objetivo General.....	24
2.3.2. Objetivos Específicos .....	24
2.4. Metodología.....	24
2.4.1. Materiales .....	25
2.4.2. Obtención de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na.....	25
2.4.2.1. Hidrólisis básica del poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) en medio acuoso PAM-4.....	25
2.4.2.2. Purificación de sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na 25	
2.4.2.2.1. Ultrafiltración .....	25
2.4.2.2.2. Liofilización .....	26
2.4.3. Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) .....	27
2.4.3.1. Caracterización del material polimérico por FTIR .....	27
2.4.3.2. Caracterización térmica por DSC.....	27
2.4.4. Pruebas de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria de los tratamientos.....	28
2.4.4.1. Preparación de reactivos y materiales necesarios para la prueba de microdilución en caldo.....	28
2.4.4.2. Pruebas de microdilución .....	29

2.4.4.3. Análisis estadístico.....	31
<b>2.4.5. Matriz Marco-Lógico.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Resultados y discusión.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.1. Obtención de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.2. Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno).....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.3. Pruebas de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria de los tratamientos.....</b>	<b>38</b>
<b>2.6. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>2.7. Recomendaciones.....</b>	<b>53</b>
<b>2.8. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>53</b>
<b>3. ANEXOS.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Metodología para la preparación de reactivos y materiales.....</b>	<b>57</b>
3.1.1. Preparación de agar nutritivo marca Merck® (solubilidad 20 g/L).....	57
3.1.2. Preparación de solución salina estéril al 0,85% para inóculo.....	57
3.1.3. Preparación del inóculo desde la cepa criopreservada.....	57
3.1.4. Preparación de solución de ampicilina trihidrato de 1024 µg/mL y 64 µg/mL.....	58
3.1.5. Preparación de la solución polimérica de la sal sódica del poli (ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4 de 1024 µg/mL.....	58
3.1.6. Preparación de los complejos de asociación a temperatura ambiente.....	58
3.1.7. Preparación de los complejos de asociación a 0°C.....	59
<b>3.2. Prueba de microdilución en caldo.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias de los ensayos realizados en la experimentación.....</b>	<b>60</b>

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fenotipos de Resistencia a $\beta$ -lactámicos en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
<b>Tabla 2.</b> Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Descripción de todos los ensayos realizados para las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300 .....	30
<b>Tabla 4.</b> Matriz Marco-Lógico .....	32
<b>Tabla 5.</b> CMI de ampicilina para las cepas de estudio reportado por la CLSI .....	38
<b>Tabla 6.</b> CMI para <i>S. aureus</i> ATCC® reportado por la CLSI .....	38
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina-PAM-4Na .....	39
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina-PAM-18Na .....	40
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina- Eudragit E-100 .....	40
<b>Tabla 10.</b> Características de cepas de <i>S. aureus</i> .....	46
<b>Tabla 11.</b> Razón $I_3/I_1$ del pireno en diferentes solventes.....	50
<b>Tabla 12.</b> Ensayo 1.....	60
<b>Tabla 13.</b> Ensayo 2.....	61
<b>Tabla 14.</b> Ensayo 3.....	62
<b>Tabla 15.</b> Ensayo 4.....	63
<b>Tabla 16.</b> Ensayo 5.....	63
<b>Tabla 17.</b> Ensayo 6.....	64
<b>Tabla 18.</b> Ensayo 7.....	64
<b>Tabla 19.</b> Ensayo 8.....	65
<b>Tabla 20.</b> Ensayo 9.....	65

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de los $\beta$ -lactámicos .....	15
<b>Figura 2.</b> Inducción de la síntesis de $\beta$ -lactamasa estafilocócica en presencia de penicilina.....	18
<b>Figura 3.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> : Mecanismo de resistencia a meticilina.....	21
<b>Figura 4.</b> Formación de un ionómero, a partir de la hidrólisis básica de copolímeros que contienen anhídrido maléico en su estructura.....	22
<b>Figura 5.</b> Proceso de ultrafiltración del material polimérico PAM-4Na en una celda marca Amicon® .....	26
<b>Figura 6.</b> Proceso de liofilización del material polimérico PAM-4Na en un equipo marca EYELA FDU-1110.....	27
<b>Figura 7.</b> Proceso de hidrólisis en medio acuoso para la obtención del sistema ionomérico PAM-4Na.....	34
<b>Figura 8.</b> Espectro IR del material polimérico PAM-4 (material precursor) .....	35
<b>Figura 9.</b> Espectro IR del material polimérico PAM-4Na (producto final) .....	36
<b>Figura 10.</b> Termograma de los polímeros PAM-4 y PAM-4Na .....	37
<b>Figura 11.</b> Descripción grafica de la composición de un ensayo. Tomado de: (Bauista-Erazo, 2015).....	41
<b>Figura 12.</b> Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na .....	43
<b>Figura 13.</b> Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na .....	44
<b>Figura 14.</b> Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na .....	44
<b>Figura 15.</b> Estructura química del PAM-18Na.....	47
<b>Figura 16.</b> Esquema del monómero de la matriz polimérica de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno).....	47
<b>Figura 17.</b> Estructura química del Eudragit E-100.....	48
<b>Figura 18.</b> Estructura del pireno .....	48
<b>Figura 19.</b> Espectros de emisión fluorescente del pireno en diferentes solventes	49
<b>Figura 20.</b> Espectros de emisión fluorescente del pireno en el sistema PAM-18Na: ampicilina en medio acuoso.....	50
<b>Figura 21.</b> Espectros de emisión fluorescente del pireno en el sistema PAM-4Na: ampicilina en medio acuoso.....	51



## RESUMEN

Aunque casi desde su descubrimiento los antibióticos han experimentado problemas de resistencia, en los últimos años, la situación se ha agudizado debido a la aparición de nuevas cepas multirresistentes a los antibióticos de uso tradicional y de otro lado, al bajo interés de la industria farmacéutica en descubrir nuevos fármacos. En Colombia, se han aislado cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* que han incrementado los índices de morbimortalidad asociado a este agente patógeno, lo cual ha generado una gran preocupación debido a las limitaciones en las opciones terapéuticas y los costos que estos conllevan.

Con el objetivo de buscar nuevas estrategias para solucionar la problemática planteada anteriormente, el grupo de Investigación en Fisicoquímica Farmacéutica de la Universidad Icesi, ha trabajado en el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y biofarmacéuticas de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, gracias a asociaciones con sistemas poliméricos hidrosolubles, capaces de auto-organizarse en solución acuosa, en los que es posible incorporar dichas moléculas farmacológicas. Continuando con esta línea de investigación, el proyecto evaluó, a través de pruebas de microdilución en caldo, el efecto antimicrobiano del antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina asociado al material polimérico sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, usando proporciones matriz polimérica:fármaco 1:1.

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias del complejo de asociación ampicilina: PAM-4Na, obteniendo 0.125  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, 1  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 y 16  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300. Al hacer una comparación entre los resultados del tratamiento ampicilina, con los obtenidos por este complejo de asociación, no se evidenció un cambio en las concentraciones mínimas inhibitorias.

A partir de estos resultados, se demostró que el polímero sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na no tiene la capacidad de potenciar el efecto antimicrobiano del fármaco ampicilina, debido a que la longitud de la cadena alquílica del polímero, no genera pseudofases hidrófobas que puedan retener terceros componentes, y por lo tanto, no puede emplearse como agente bioprotector que ayude a evadir los mecanismos de resistencia presentes en las cepas bacterianas.

**Palabras claves:** concentración mínima inhibitoria, microdilución en caldo, *Staphylococcus aureus*, PAM-4Na, ampicilina, complejos de asociación.

## ABSTRACT

Even though, almost since the discovery of antibiotics, these have experienced resistance problems, in recent years the situation has worsened due to the emergence of new strains, multi-resistant to traditionally used antibiotics, and, furthermore, to the low interest of the pharmaceutical industry in the search for new drugs. In Colombia, multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, that have increased the morbidity and mortality rates associated with this pathogen, have been isolated, which has become of great concern, due to the limited therapeutic options and the costs they entail.

In order to seek for new strategies to address the issues raised above, the research group in Pharmaceutical Physical Chemistry from the University Icesi, has worked on improving the physicochemical, microbiological and biopharmaceutical properties of  $\beta$ -lactam antibiotics, thanks to the associations to water-soluble polymeric systems, capable of self-organization in aqueous solution, where it is possible to incorporate such drug molecules. Following-up this research line, the project assessed, through broth microdilution, the antimicrobial effect of the  $\beta$ -lactam antibiotic Ampicillin, associated with the polymeric material PAM-4Na, on strains of *Staphylococcus aureus*, using a 1:1 matrix proportions of polymer:drug.

The minimum inhibitory concentrations of the association complex with ampicillin, PAM-4Na, were determined, obtaining 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the *S. aureus* strain ATCC® 25923, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the *S. aureus* strain ATCC® 29213 and 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the *S. aureus* strain ATCC® 43300. When making a comparison between the results of the ampicillin treatment, with the ones obtained by this association complex, no change was shown in the minimum inhibitory concentrations.

From these results, it was shown that the PAM-4Na polymer does not have the ability to potentiate the antimicrobial effect of the ampicillin drug, because the length of the alkyl chain of the polymer, does not generate hydrophobic pseudo-phases that could retain third components, and therefore, cannot be used as a bioprotector agent that helps to circumvent the resistance mechanisms present in bacterial strains.

**Key Words:** minimum inhibitory concentrations, broth microdilution, *Staphylococcus aureus*, PAM-4Na, ampicillin, association complexes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde el principio los antibióticos han desempeñado un papel esencial en la disminución de la morbimortalidad causada por las enfermedades infecciosas, sin embargo, el mal uso y abuso de estos fármacos han ejercido una inmensa presión de selección para el surgimiento y la diseminación de los mecanismos de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas (García, José, & Rica, 2001).

La diseminación de estos mecanismos de resistencia no conoce barreras geográficas, biológicas ni sociales. Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar estos fenómenos de resistencia; no obstante, la letalidad de muchas infecciones causadas por bacterias multirresistentes es similar a la observada antes de la introducción de los antibióticos como agentes terapéuticos. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos resistentes es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos es mucho más lento (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2002).

*Staphylococcus aureus* es un patógeno que a principios de 1940 era susceptible a la penicilina, un antibiótico de tipo  $\beta$ -lactámico, no obstante, cuatro años después se encontraron los primeros informes de cepas penicilino resistentes (Rice, 2006). La resistencia a estos fármacos se produce por la adquisición de genes que, entre otros, codifican enzimas conocidas como  $\beta$ -lactamasas, que inhiben la actividad terapéutica del antibiótico. La incidencia de enfermedades infecciosas por *S. aureus* y sus complicaciones, ha aumentado considerablemente en los últimos años, debido a la mayor frecuencia de procedimientos invasivos y al aumento de la resistencia de las cepas bacterianas a los antibióticos disponibles. Este cambio de epidemiología del patógeno, en combinación con la virulencia inherente del mismo, ha impulsado una necesidad urgente de mejorar las estrategias para prevenir y tratar las patologías causadas por *S. aureus*. (Arroyave, Atehortúa, & Jaimes, 2014).

Siguiendo esta línea de interés, el Grupo de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica (GIFF) de la Universidad Icesi, ha trabajado en el mejoramiento de las propiedades físicoquímicas de antibióticos  $\beta$ -lactámicos asociados a sistemas poliméricos, gracias a la solubilización del fármaco en pseudofases poliméricas que proporcionan un efecto de barrera física frente a los sistemas enzimáticos.

Continuando con los trabajos anteriores, el objetivo de este proyecto de investigación fue determinar, por medio de pruebas de microdilución en caldo, el efecto antimicrobiano del antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina asociado al material polimérico sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre cepas de *S. aureus* con diferentes grados de susceptibilidad a dicho antibiótico.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1. Pregunta de investigación y justificación

Las enfermedades infecciosas son las responsables de más del 85% de las muertes en el mundo (OMS, Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2001). El control de estas enfermedades ha contribuido al incremento significativo de la expectativa de vida, gracias al uso de vacunas y antibióticos, sin embargo, la resistencia a estos agentes, ha afectado negativamente el resultado de los tratamientos (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2002). La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con enormes implicaciones sociales y económicas, el desarrollo de nuevos antibióticos se está estancado, siendo pocos los incentivos de la industria farmacéutica para elaborar otros medicamentos que permitan combatir la problemática mundial de la resistencia, por lo tanto, puede llegar a ser una amenaza para la estabilidad mundial y la seguridad de los países (OMS, Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2001).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre los factores considerados como causantes de la resistencia antimicrobiana, están el uso inapropiado de antibióticos, la falta de sistemas de vigilancia efectivos en cada país y la ausencia de legislación que permita el control en el mercado de la venta de medicamentos. La identificación y vigilancia de nuevos patrones de resistencia a nivel local, nacional y global, permiten un análisis de la distribución y comportamiento de los patógenos multirresistentes, además del diseño y la implementación de guías sobre el uso racional de antibióticos (Briceño, Correa, Valencia, & Torres, 2010).

En Colombia, la magnitud del problema ha fomentado la implementación de sistemas de vigilancia por diversos grupos, uno de ellos, el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, ha estudiado y reportado desde el año 2001 diferentes mecanismos y patrones de resistencia en bacterias Gram negativas hospitalarias, y para ello, ha constituido una red de 14 hospitales de tercer nivel en siete ciudades principales del país, al que ha denominado Grupo para el Estudio de la Resistencia Nosocomial en Colombia. Esta información ha servido como base para trabajar con los comités de infecciones hospitalarias, buscando herramientas para entender y disminuir el problema de la resistencia a los antibióticos (Hernández-Gómez, Blanco, Mota, & Correa, 2014).

Por otro lado, *S. aureus* merece un análisis y vigilancia especial por ser el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados y por la aparición de cepas resistentes con alta morbilidad y mortalidad en casos ambulatorios, incluso en Colombia. El alto grado de resistencia a la oxacilina y a otros antimicrobianos de forma concomitante, limita las opciones terapéuticas con un grave impacto en la mortalidad en pacientes críticos. Actualmente, las cepas de *S. aureus* tienen un

amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes (Perazzi, y otros, 2010).

Entre los mecanismos de resistencia que presenta este microorganismo, particularmente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se encuentra la producción de enzimas hidrolíticas de tipo  $\beta$ -lactamasas, que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico, causando la pérdida de la actividad biológica y por lo tanto, una falla en el efecto terapéutico. Esta problemática es más relevante cuando sucede con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos más convencionales, como la ampicilina y la amoxicilina, que son medicamentos de amplia utilización y bajo costo (Arenas, Mora, Salamanca, & Jaramillo, 2012).

Así pues, se han propuesto diferentes alternativas para solucionar la problemática planteada anteriormente, entre ellas se encuentra la utilización de matrices farmacéuticas que actúen como vehículos farmacológicos e inhiban los mecanismos de resistencia que presenta este microorganismo; por ejemplo, el uso de diversos complejos de asociación fármaco-polímero, nanopartículas, liposomas, polímeros entrecruzados y andamios, en los cuales se ha observado un aumento en la actividad antimicrobiana del fármaco, en experimentos a nivel *in vitro* o en modelos animales (Bautista-Erazo, 2015).

Continuando con esta línea de interés, la finalidad de este proyecto es obtener información que permita establecer el uso y eficacia del antibiótico ampicilina cuando está asociado a la matriz polimérica anfifílica PAM-4Na, el cual, podría potenciar el efecto antimicrobiano del antibiótico actuando como reservorio bioprotector, frente algunos mecanismos de resistencia presentes en cepas de *S. aureus*.

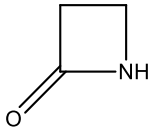
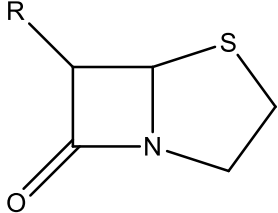
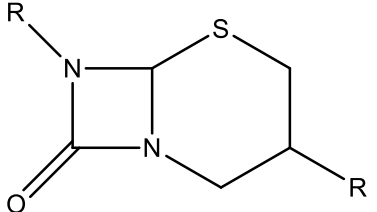
## **2.2. Marco teórico y estado del arte**

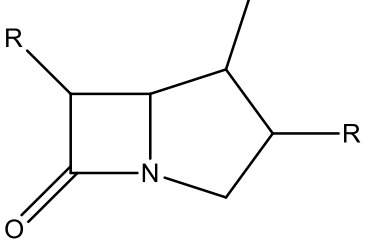
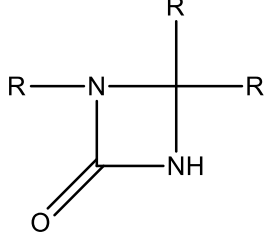
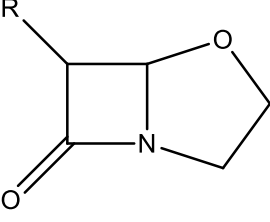
### **2.2.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos**

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina cuando observó que el crecimiento de *S. aureus* en algunos de los tubos de ensayo utilizados para el cultivo, se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*. Este hongo producía una sustancia capaz de impedir el crecimiento no sólo de diferentes tipos de estafilococos, sino también de muchos estreptococos. Por otro lado, en 1930, Cecil George Paine, un joven microbiólogo, utilizó por primera vez la penicilina como tratamiento tópico en varios sujetos con infecciones cutáneas y oculares. Sin embargo, debido a problemas de estabilidad química, el primer tratamiento parenteral con penicilina, tuvo que esperar hasta 1940. En la actualidad, los  $\beta$ -lactámicos son los antibióticos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales (Suárez & Gudíol, 2009).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son moléculas de origen natural o semisintético, capaces de inhibir la última etapa de la síntesis de la pared bacteriana, este grupo se caracteriza por poseer en su estructura un anillo  $\beta$ -lactámico y constituir la familia más numerosa de antibióticos. Son compuestos de acción bactericida lenta, es decir que provocan la lisis bacteriana paulatinamente, presentan escasa toxicidad y muestran un amplio margen terapéutico. No obstante, a pesar de que este grupo de fármacos se ha ido ampliando con nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gramnegativos, la aparición de la resistencia antibiótica ha limitado el uso empírico de estos medicamentos y su eficacia en determinadas situaciones (Seija & Vignoli, 2008).

La presencia del anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 1) define químicamente a esta familia de antibióticos. Dicha estructura determina el mecanismo de acción del antibiótico (inhibición de la síntesis de la pared celular), la baja toxicidad del mismo (actúa sobre la pared celular del microorganismo), y el principal mecanismo de resistencia de esta familia de antibióticos ( $\beta$ -lactamasas). Los diferentes tipos de cadenas lineales junto con las características propias del núcleo químico, que está formado por dos anillos, modifican las propiedades del antibiótico y dan lugar a los diferentes grupos  $\beta$ -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Lo mencionado anteriormente modifica las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas (Silver, 2011).

 <p>Anillo <math>\beta</math>-lactámico + Anillo secundario = Núcleo del <math>\beta</math>-lactámico → GRUPO ANTIBIÓTICO</p>			
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 $\alpha$ -cefalosporínico	CEFALOSPORINAS

	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	CARBAPENEMAS
	Ninguno	Monobactamo	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	ÁCIDO CLAVULÁNICO

**Figura 1.** Estructura química de los  $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La pared celular es una estructura que envuelve las bacterias y se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática; está compuesta por peptidoglucano. El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla. Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática; luego se da la formación de enlaces interpeptídicos, a partir de pentapéptidos y con la participación de enzimas transpeptidasas. El anillo  $\beta$ -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (“*penicillin binding protein*” proteína de unión a la penicilina). Sin la pared celular, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los  $\beta$ -lactámicos) inhiben su crecimiento en

presencia del  $\beta$ -lactámico, pero no se destruyen completamente (Drawz & Bonomo, 2010).

### **2.2.2. Resistencia antibiótica y *Staphylococcus aureus***

En Colombia, el estudio del problema de la resistencia a los antibióticos por parte de los patógenos bacterianos hospitalarios, se inició en la década de los años noventa, pero solamente hasta la década pasada se han hecho estudios de forma continua, por ejemplo, en el año 2001 inició la vigilancia por parte del Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO), conformado por 8 hospitales de tercer nivel, para el año 2006 hacían parte de dicha red más de 25 instituciones hospitalarias de segundo y tercer nivel, e incluso hospitales fuera de Bogotá. Actualmente esta cuenta con más de 30 instituciones de varias regiones del país. Por otra parte, el grupo del Centro de Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) con sede en Cali, inició los proyectos de investigación en esta área en el 2001, con un número de participantes que supera la decena y se encuentran en Bogotá, Medellín, Cali, Bucaramanga, Barranquilla y Pereira.

El fenómeno de la resistencia a nivel hospitalario depende en una gran proporción de las tasas locales de utilización de antibióticos y de las estrategias de control de infección. La mayoría de las redes establecidas en el país se han enfocado a la identificación de indicadores de resistencia hospitalaria, en algunas ocasiones con esfuerzos de control de infecciones, y con menor frecuencia a la medición del uso de antibióticos a nivel hospitalario. Por lo anterior, en la mayoría de los casos solo hay datos microbiológicos y algunos datos de control de infecciones (Red Nacional de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud, 2009).

Luego de la búsqueda a través del portal PubMed de la biblioteca del Congreso de los Estados Unidos, realizada por la Red Nacional de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud, solo se encontraron 29 resultados correspondientes a estudios de vigilancia de la resistencia o reportes de brotes en el país. Lo anterior, obligó a la Red Nacional a llevar a cabo una revisión sistemática de la resistencia bacteriana en el país, hallando que las tasas de resistencia son muy altas en todos los sitios estudiados. Dichas tasas son muy similares o más elevadas a las encontradas en Norteamérica o Europa, y con frecuencia, inferiores a las que se reportan para India y otros países asiáticos (Red Nacional de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud, 2009). De acuerdo a lo anterior, existe una creciente preocupación por los problemas médicos y de salud pública asociada directamente con el desarrollo y la propagación de microorganismos resistentes en las instituciones hospitalarias, en la comunidad y en el medio ambiente.



La resistencia antibiótica se refiere a la capacidad de un microorganismo de sobrevivir a concentraciones de antibióticos que matan a células sensibles de la misma cepa (American Academy of Microbiology, 2008).

Ésta se produce como consecuencia de la capacidad natural de adaptación de las poblaciones bacterianas. El resultado son cambios a nivel fisiológico, celular y estructural debido a modificaciones en la composición genética de las células. Dichos cambios incluyen mutaciones, adquisición de genes de otros organismos a través de mecanismos de transferencia horizontal, y combinaciones de estos dos tipos de eventos (American Academy of Microbiology, 1999).

Uno de los microorganismos con mayor impacto sobre la salud, debido a la resistencia que ha presentado a múltiples antibióticos, incluyendo a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es *S. aureus*, una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de catalasa, inmóvil, y no esporulada, que se encuentra ampliamente distribuida por el mundo. Desde su descubrimiento, este microorganismo es considerado un patógeno con un gran potencial de causar múltiples infecciones en el humano y en los animales, dichas infecciones ocurren regularmente en pacientes hospitalizados y tienen severas consecuencias, a pesar de la terapia antimicrobiana disponible. *S. aureus* es la especie responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos, hasta infecciones graves que amenazan la vida. La diseminación de la resistencia antimicrobiana entre cepas de *S. aureus* es de gran importancia en salud pública, puesto que este microorganismo ha desarrollado resistencia rápidamente a todos los antibióticos introducidos para uso clínico (Cervantes, García, & Salazar, 2014).

Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en *S. aureus*: producción de enzimas inactivadoras (penicilinasas o  $\beta$ -lactamasas), modificación de las Proteínas de unión a penicilinas (PBPs) y la resistencia intrínseca a meticilina, debida a la presencia del gen *mecA*; siendo éste último, el mecanismo más importante desde el punto de vista clínico y el más estudiado. Aunque la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia puede variar según el área geográfica y el tipo de paciente, se puede dar la posibilidad de que en una misma cepa coexistan distintos mecanismos (Vaez, Tabaraei, Moradi, & Ghaemi, 2011).

### 1. Producción de enzimas $\beta$ -lactamasas

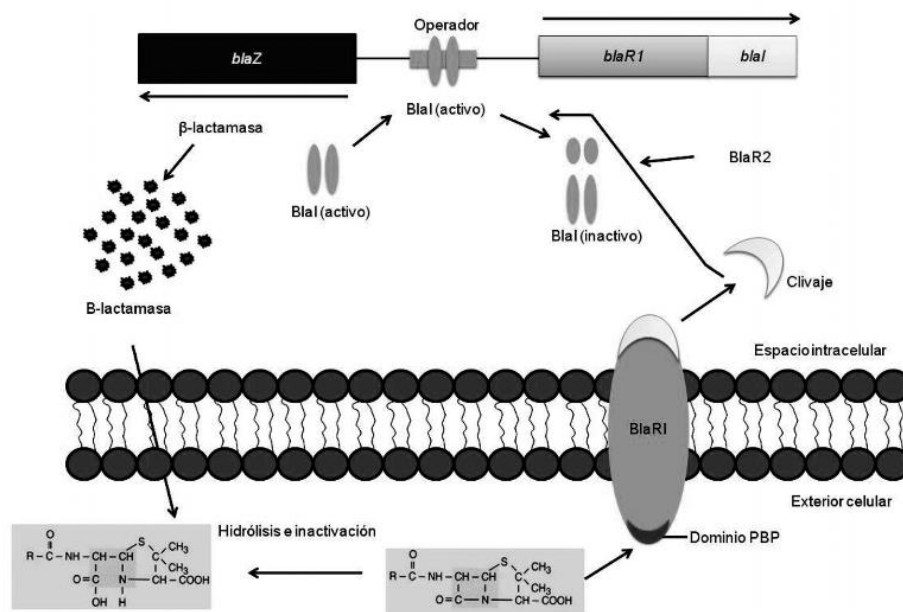
La resistencia a penicilina se debe a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas y es conferida por una penicilinasas plasmídica, inducible, que inactiva la penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la  $\beta$ -lactamasas, aumenta la síntesis de esta enzima. Esta penicilinasas es inactivada por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Las cefalosporinas no son hidrolizadas.

**Tabla 1.** Fenotipos de Resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*

Mecanismo	Penicilina G, Carboxipenicilinas y Ureidopenicilinas	Penicilina + Inhibidor de $\beta$ -lactamasa	Oxacilina	Cefalosporinas y Carbapenemes
Ninguno	S	S	S	S
Producción de $\beta$ -lactamasa	R	S	S	S
Producción de PBP2a ( <i>mecA</i> )	R	R	R	R
BORSA	R	S/R	R	S
MODSA	S	S	R	S

S-sensible. R-resistente

Este mecanismo de resistencia es mediado por *blaZ*, gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (Figura 2). La proteína BlaI, proteína de unión al ADN, se une a la región del operón, reprimiendo así la transcripción tanto de *blaZ* como de *blaR1-blaI*. En ausencia de penicilina, la  $\beta$ -lactamasa se expresa a bajo nivel. La unión de penicilina al receptor transmembrana (sensor-transductor) BlaR1 estimula la autoactivación catalítica, dividiéndose a sí mismo. BlaR1 activa, directa o indirectamente (mediante la proteína BlaR2) divide a BlaI produciendo fragmentos inactivos, permitiendo entonces, el inicio de la transcripción de *blaZ* y *blaR1-blaI*. La  $\beta$ -lactamasa, enzima de producción extracelular, inactiva entonces, la penicilina (Chamber, 1997).



**Figura 2.** Inducción de la síntesis de  $\beta$ -lactamasa estafilocócica en presencia de penicilina

La presión ejercida por el amplio uso de la penicilina hizo que las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se hicieran más prevalentes. El incremento de la resistencia a penicilina en *S. aureus*, producto del uso clínico de este fármaco, no se debió sólo a la selección de unos pocos microorganismos mutantes que eran capaces de producir  $\beta$ -lactamasas; evidencias genéticas indican que los genes que codifican su producción se encuentran en plásmidos, y esta información puede ser transferida de un microorganismo a otro por transducción *in vivo*, este mecanismo desarrollado por *S. aureus* ha sido demostrado en todo el mundo (Lowy, 2003).

En la actualidad más del 90% de las cepas de *S. aureus* han desarrollado resistencia a penicilina. Sin embargo, cuando la cepa es sensible, este antibiótico constituye un tratamiento de primera línea y de amplio uso; además, presenta una buena disponibilidad con relación a otros antimicrobianos, dado su bajo costo y su toxicidad selectiva; debido a que actúa inhibiendo a síntesis del peptidoglucano, principal constituyente de la pared celular bacteriana, la cual no está presente en las células eucariotas del hospedero (Kanafani & Fowler, 2006).

### 1.2. Hiperproducción de $\beta$ -lactamasas (Resistencia “border-line” a oxacilina)

En ausencia de *mecA*, la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* puede deberse a la producción excesiva de  $\beta$ -lactamasas, conociéndose a los microorganismos que expresan esta forma de resistencia, como cepas con resistencia borderline (Borderline resistant *S. aureus*-BORSA) (resistencia fronteriza) o resistencia de bajo nivel. Dicho mecanismo, es una hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa estafilocócica normal, mediada por plásmidos. Estas cepas producen altas cantidades de enzima, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la  $\beta$ -lactamasa, sean degradadas, presentando una resistencia límite a oxacilina con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de hasta 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las cepas hiperproductoras de  $\beta$ -lactamasas poseen un plásmido común de  $\beta$ -lactamasa que codifica a la  $\beta$ -lactamasa estafilocócica del tipo A. Se cree que la acción de resistencia no es sólo debida a una hiperproducción, sino también a una nueva  $\beta$ -lactamasa cuyo gen no se ha identificado aún (Gil, 2000).

## 2. Modificación de las PBPs

Corresponde a una modificación mínima (modified *S. aureus*, MODSA) de las Proteínas de unión a Penicilinas (PBPs), con baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Al igual que el mecanismo anterior, la respuesta es límite. Estas cepas no producen  $\beta$ -lactamasas y presentan bajos niveles de resistencia a meticilina, ello puede ser debido a la hiperexpresión de alguna de estas PBPs o a la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico.

### 3. Resistencia a meticilina

Debido a la resistencia a penicilina de las cepas *S. aureus*, a finales de los años 50, se introdujeron cefalosporinas estables a  $\beta$ -lactamasas y penicilinas semisintéticas. Entre estas estuvo la meticilina, como antibiótico de elección en el tratamiento de *Staphylococcus aureus*.

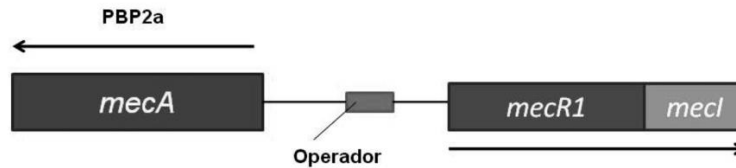
La meticilina es un derivado semisintético de la penicilina, usado por primera vez en 1959 en Europa, sin embargo, en 1960, se detectó la primera cepa de *S. aureus* meticilina resistente (“methicilin resistan *S. aureus*”, MRSA). Más tarde, en 1963, se reportó el primer brote nosocomial causado por cepas MRSA; desde entonces se han notificado cepas MRSA en todo el mundo. En la actualidad, MRSA es el patógeno Gram positivo, resistente a los antibióticos más comúnmente identificado en los hospitales; a pesar que el 25% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes externos son resistentes a meticilina, la mayoría de las cepas son recuperadas de individuos que muy probablemente adquieren la infección en el hospital (Velásquez-Meza, 2005).

La resistencia a meticilina fue denominada “intrínseca” debido a que no se produce destrucción del antibiótico por acción de enzimas  $\beta$ -lactamasas y es conferida por una proteína de unión a penicilina (PBP) adicional denominada PB2' o PBP2a, la cual no está presente en las cepas susceptibles a meticilina (Naimi, Ledell, Sabetti, & Borchardt, 2003).

Las PBPs son enzimas que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglucano durante la síntesis de la pared celular. *S. aureus* produce al menos cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4), que son inhibidas por los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo la meticilina. Las cepas MRSA además de sintetizar estas PBPs, producen una PBP adicional conocida como PBP2a. Esta proteína permite que, en presencia de meticilina, al ser inhibidas las PBPs normales, continúe la síntesis de pared celular; debido a que bloquea la unión de cualquier antibiótico  $\beta$ -lactámico a sus sitio activo; pero permite que continúe el proceso de transpeptidación. La PBP2a es una transpeptidasa clase B, de alto peso molecular que cataliza la formación de puentes cruzados en el peptidoglucano de la pared celular. Asistida por el dominio transglicosilasa de la PBP2a nativa de *S. aureus*, toma el control de la función biosintética de la pared celular en presencia de  $\beta$ -lactámicos, cuando normalmente las PBPs son inactivadas al ligarse a estos antibióticos (Hanssen & Ericson, 2006).

Las cepas de *S. aureus*, que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas (a excepción de las nuevas cefalosporinas anti-MRSA, ceftobiprol y ceftarolina) y carbapenemes. El gen *mecA*, responsable de la resistencia a meticilina en *S. aureus*, se encuentra formando parte del llamado SCC*mec* y se encuentra localizado en el cromosoma bacteriano de cepas MRSA. El complejo denominado gen *mec*, una porción de ADN cromosómico adicional, es exclusivo de las cepas meticilino-resistentes. El complejo *mec* contiene el gen *mecA* (gen estructural para la PBP2a); *mecI* (represor) y *mecR1* (inactivador de *mecI*), que actúan como

elementos reguladores que controlan la transcripción del *mecA* (Figura 3) (Shore, Rossney, & Keane, 2003).



**Figura 3.** *Staphylococcus aureus*: Mecanismo de resistencia a meticilina

En la actualidad, parece poco el interés de la industria farmacéutica por el desarrollo o búsqueda de nuevos antibióticos; lo anterior sumado al incremento de la resistencia por parte de los microorganismos hace urgente la búsqueda de estrategias que permitan controlar o mitigar este fenómeno.

### 2.2.3. Sistemas de polielectrólitos

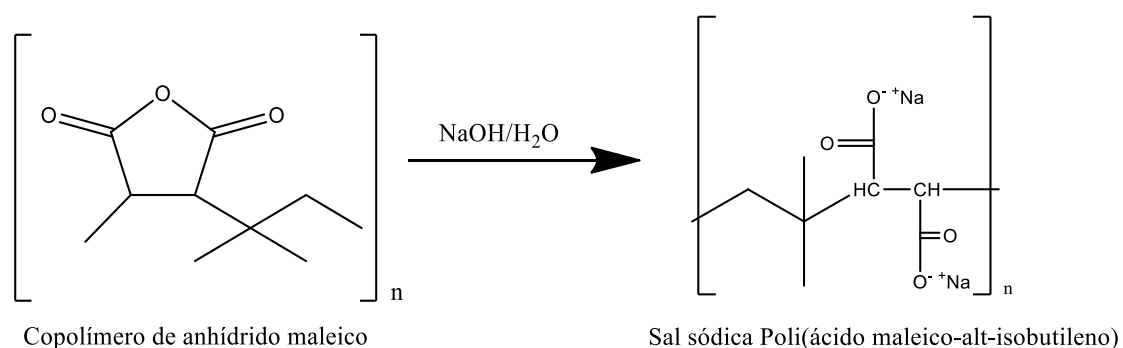
De acuerdo a lo planteado anteriormente, es innegable que se deben buscar nuevas alternativas para tratar de solucionar la problemática de la resistencia antibiótica. Entre las opciones se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas con mayor potencial antibiótico frente a los microorganismos resistentes o capaces de inhibir las  $\beta$ -lactamasas. Por otra parte, otra estrategia consiste en el mejoramiento de las características fisicoquímicas de los fármacos ya existentes y la bioprotección por fenómenos de asociación con matrices macromoleculares biocompatibles (Huh & Know, 2011).

La estrategia consiste en asociar fármacos con sistemas poliméricos hidrosolubles con capacidad de auto-organizarse en solución acuosa generando microdepósitos, en los cuales, es posible incorporar moléculas farmacológicas a partir de la asociación o solubilización en pseudofases poliméricas, que proporcionan un efecto de barrera física frente a los sistemas enzimáticos (Arenas, Mora, Salamanca, & Jaramillo, 2012). En otras palabras, la opción novedosa que se quiere investigar, es la asociación antibiótico-polímero en los que se supone que el polímero o matriz actúa como un reservorio bioprotector del antibiótico, ocasionando que la degradación del antimicrobiano, por las enzimas  $\beta$ -lactamasas, se vea disminuida (Barajas-Jordán, 2013).

Los anteriores sistemas poliméricos consisten en polielectrólitos, los cuales son sistemas macromoleculares que presentan una fracción significativa de cargas en su cadena principal polimérica, comúnmente denominados poli-iones. Estos se

pueden clasificar según la carga como aniónicos o catiónicos; o bien, según la composición de monómeros como homopolímeros o copolímeros. Para el caso de copolímeros, se pueden subclasificar según la distribución secuencial de los comonómeros, como aleatorios, alternantes y en bloque (Salamanca, 2007).

En el ámbito de la industria farmacéutica los polímeros que se emplean principalmente como sistemas de transporte de fármacos o como sistemas contenedores o reservorios de fármacos, son aquellos que presentan en su estructura macromolecular, grupos tales como, éster, lactónico, carboxilato y anhídrido, los cuales son grupos funcionales biocompatibles. De esta manera, los copolímeros que contienen grupos anhídridos, como el itacónico o maleico, pueden ser utilizados en el diseño y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas. La gran utilización del anhídrido maleico como precursor de sistemas macromoleculares, reside en su tendencia a formar copolímeros alternantes, que pueden posteriormente ser convertidos a polielectrólitos, debido al rompimiento hidrolítico del grupo anhídrido, que da origen a la formación de dos grupos carboxilato (Figura 4), confiriéndole de esta manera las características de macro-ion soluble en agua.



**Figura 4.** Formación de un ionómero, a partir de la hidrólisis básica de copolímeros que contienen anhídrido maléico en su estructura

En el Grupo de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica (GIFF) de la Universidad Icesi se han desarrollado una serie de estudios tanto físicoquímicos como microbiológicos sobre los complejos de asociación ampicilina-polímero, particularmente, uno de ellos es el complejo ampicilina-PAM-18Na - sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno). Este polímero tiene diversas propiedades, tales como: anfifílico, polielectrolítico, soluble en agua, biocompatible y biodegradable. Por ende, es adecuado como excipiente farmacéutico para el transporte de fármacos. Al tener un carácter dual de polaridad, este polímero exhibe un comportamiento en solución peculiar: se ovilla intramolecularmente para formar pseudofases poliméricas en un proceso termodinámicamente favorable (espontáneo) (Salamanca, 2007); por medio de un modelo matemático de pseudofase y pruebas de asociación, el GIFF ha demostrado que efectivamente la ampicilina se retiene (más del 90%) en las pseudofases poliméricas que genera el PAM-18Na en solución (Bautista-Eraza, 2015), y por lo tanto, esta asociación

disminuye significativamente la concentración mínima para inhibir el crecimiento bacteriano respecto a la concentración del fármaco libre.

En el presente proyecto, se utilizó la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na obtenido a partir de una hidrólisis básica en medio acuoso del poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4. Siguiendo con dicho proceso, se caracterizó el material polimérico por medio de espectroscopia FTIR y calorimetría de barrido diferencial (DSC).

#### **2.2.4. Espectroscopia infrarroja**

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibraciones específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas, y posiblemente, el acoplamiento vibracional. Esta técnica se usa generalmente de forma cualitativa para identificar grupos funcionales y de forma cuantitativa para determinar la concentración de una muestra (Skoog, Holler , & Crouch, 2008). Al emplear esta técnica se logró una caracterización estructural del polímero, identificando los grupos funcionales y las interacciones que se hayan generado en el polímero.

#### **2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica térmica en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. Esta técnica permite estudiar las diferencias transiciones de fase que sufre la materia cuando se realizan ciclos de calentamiento/enfriamiento, esta información se puede relacionar con las interacciones intermoleculares y el nivel de organización de las moléculas (Skoog, Holler, & Nieman, 1992). Por ejemplo, en algunos materiales altamente organizados se observarán transiciones como punto de fusión o cristalización indicando la naturaleza cristalina del polímero, mientras que en materiales con menos organización molecular se observarán transiciones vítreas indicando una naturaleza amorfa.

#### **2.2.6. Pruebas de microdilución en caldo**

Según el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), la prueba de microdilución en caldo es un método de sensibilidad a antibióticos que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar), el cual determina las concentraciones

mínimas inhibitorias para dichos fármacos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de un antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de un microorganismo. Esta prueba se realiza incubando una cantidad conocida de bacteria con diluciones definidas del antibiótico. La prueba es incubada por 18 a 20 horas a 35°C y se realiza la lectura de los resultados examinando la turbidez (indicador de crecimiento) (Clinical and Laboratory Standards Institute , 2012).

## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto antimicrobiano del antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina asociado a la sal sódica del polímero poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM4-Na sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300).

### **2.3.2. Objetivos Específicos**

- Sintetizar el material polimérico sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na mediante hidrólisis básica usando hidróxido de sodio.
- Caracterizar por espectroscopia FTIR y calorimetría de barrido diferencial (DSC) el material polimérico obtenido.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria generada por la asociación entre ampicilina y la sal sódica del polímero poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300) usando proporciones matriz polimérica:fármaco 1:1.

## **2.4. Metodología**

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Icesi, específicamente en los laboratorios de Microbiología y Físicoquímica Farmacéutica. Esta metodología hace parte de una línea de investigación instaurada en el año 2013 por el Grupo de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica (GIFF) de la Universidad Icesi, el cual tiene como objetivo lograr la evaluación de la actividad antibiótica de la ampicilina asociada al material polimérico PAM4-Na en cepas de *S. aureus* con diferentes grados de susceptibilidad a dicho antibiótico.



### 2.4.1. Materiales

Los materiales y compuestos empleados en la sección experimental fueron: ampicilina trihidratada la cual fue proporcionada por Laboratorios Tecnoquímicas S.A; lote 0000008006, con su correcto certificado de análisis de control de calidad. Para el proceso de hidrólisis se utilizó como material polimérico de partida el poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4 marca Aldrich® e hidróxido de sodio (NaOH) marca Aldrich®. Por otro lado, se emplearon cepas certificadas de *S. aureus* ATCC® 25923, *S. aureus* ATCC® 25213 y *S. aureus* ATCC® 43300. Estos microorganismos se obtuvieron en el año 2013 de la empresa comercializadora Microbiologics Inc®. Las anteriores cepas se han preservado a -80°C según el procedimiento de criopreservación descrito en la tesis de pregrado de Barajas-Jordán (2013). Los medios de cultivos empleados para el crecimiento y realizar las pruebas de microdilución en caldo se emplearon: agar nutritivo marca Merck® y caldo Mueller-Hilton con ajuste de cationes de la empresa Thermo Scientific en presentación de tubos de ensayo con 11 mL del caldo estéril.

### 2.4.2. Obtención de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na

#### 2.4.2.1. Hidrólisis básica del poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) en medio acuoso PAM-4

La síntesis de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na se llevó a cabo mediante una hidrólisis con hidróxido de sodio (NaOH) en medio acuoso, empleando una metodología previamente estandarizada por el Laboratorio de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica (GIFF), para ello, se utilizó como precursor el poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4. Se prepararon 1000 mL de NaOH, pesando 30 g de NaOH, en 1000 mL de agua destilada a un vaso de precipitados de 2000 mL. Posteriormente, se pesó 50 g del poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4 y se adicionaron a la solución acuosa de NaOH con agitación magnética constante a una temperatura de 40.0°C, hasta obtener una dispersión homogénea.

#### 2.4.2.2. Purificación de sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na

##### 2.4.2.2.1. Ultrafiltración

Con el fin de concentrar el polímero y eliminar los iones resultantes de la reacción de hidrólisis, se llevó a cabo un proceso de ultrafiltración. Este proceso se realizó

utilizando una celda de ultrafiltración marca Amicon® y membranas de celulosa con un tamaño de retención de poro de 5.000 Da, que posee una capacidad de 350mL, dicha celda se llenó completamente con la dispersión polimérica con agitación magnética. Cuando se alcanzó un volumen de 100 mL aproximadamente de dispersión polimérica se almacenó en la nevera hasta ultrafiltrar los mililitros restantes de la dispersión ya mencionada (Figura 5).



**Figura 5.** Proceso de ultrafiltración del material polimérico PAM-4Na en una celda marca Amicon®

#### 2.4.2.2.2. Liofilización

Una vez la dispersión polimérica se encontraba concentrada, se llevó a cabo un proceso de liofilización empleando un equipo marca EYELA FDU-1110, esto con el fin de obtener la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM4-Na en estado sólido. Este proceso realiza una separación de fases de la solución polimérica, a partir de la sublimación del solvente acuoso (Figura 6).



**Figura 6.** Proceso de liofilización del material polimérico PAM-4Na en un equipo marca EYELA FDU-1110

### **2.4.3. Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno)**

#### **2.4.3.1. Caracterización del material polimérico por FTIR**

Luego de obtener el material polimérico en estado sólido, se procedió a caracterizar la muestra por medio de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), con el fin de evaluar las señales correspondientes al grupo anhídrido del precursor y los grupos carboxilatos y ácidos carboxílicos del producto final. El espectro se tomó en el equipo marca thermo Fisher scientific nicolet 6700 y los resultados obtenidos se analizaron usando el software Origin 2015.

#### **2.4.3.2. Caracterización térmica por DSC**

La sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na, se estudió en un equipo DSC Q 2000 de la marca TA instruments. El polímero se analizó con una metodología de calentamiento y enfriamiento de  $-90^{\circ}\text{C}$  a  $250^{\circ}\text{C}$  a una rampa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

## 2.4.4. Pruebas de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria de los tratamientos

### 2.4.4.1. Preparación de reactivos y materiales necesarios para la prueba de microdilución en caldo

Antes de llevar a cabo la metodología aquí mencionada, es necesario tener en cuenta el manejo adecuado y seguro de las cepas bacterianas de *S. aureus*. Según el manual de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la utilización del agente biológico en estudio debe desarrollarse con buenas prácticas de laboratorio correspondientes a un nivel de bioseguridad 2 (Tabla 2) (OMS, Manual de bioseguridad en el laboratorio , 2005).

**Tabla 2.** Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo.

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (Véase la parte IV del presente manual). CSB: cámara de seguridad biológica.

Como se mencionó anteriormente la prueba de microdilución se empleó para determinar la susceptibilidad al antibiótico en estudio, según el manual estándar estadounidense para laboratorios y clínicas.

En el anexo 3.1. (Metodología para la preparación de reactivos y materiales) se encuentra detallada la metodología para la preparación de los insumos necesarios

para realizar la prueba de microdilución. En dicho anexo se disponen la preparación de los medios de cultivo, inóculos de las cepas bacterianas y las soluciones de los tratamientos en estudio (antibiótico y polímero).

#### 2.4.4.2. Pruebas de microdilución

Las pruebas de microdilución en caldo se llevaron a cabo en placas estériles de 96 pozos con fondo redondo, las cuales están compuestas por columnas enumeradas de izquierda a derecha del 1 al 12 y por filas de arriba a abajo de la A hasta la H; las columnas 11 y 12 corresponden a un control negativo y positivo, respectivamente. El control negativo está compuesto el caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes (CAMHB), y el control positivo consiste en la siembra del inóculo de la cepa bacteriana en el caldo CAMHB. Se sembraron en dichas placas diluciones dobles seriadas con el tratamiento de estudio (antibiótico, polímero, complejo antibiótico:polímero), con sus respectivos controles positivo y negativo. Cada pozo contiene aproximadamente un inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL que posteriormente se incubarán a 35°C de 18 a 20 horas.

La interpretación de los resultados consistió en observar la presencia de un precipitado cremoso o turbidez como prueba positiva de crecimiento, por el contrario la ausencia de dicho precipitado en el pozo y que este se encuentre traslúcido, significa que no hubo crecimiento de la cepa bacteriana.

En la Tabla 3 se muestran todos los ensayos realizados durante la experimentación para las cepas de *S. aureus* ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300. Cabe mencionar que los factores de temperatura y tiempo se refieren a que los tratamientos, una vez preparados, fueron sometidos al congelador (-13.4°C) y a la incubadora (30°C) por períodos de 12, 24 y 48 horas.

**Tabla 3.** Descripción de todos los ensayos realizados para las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300

No	Ensayos	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Concentraciones evaluadas (µg/mL)
1	PAM-4Na		-	0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32
2	PAM-18Na	-	-	
3	Eudragit E-100	-	-	
4	Ampicilina	-	-	
5	Ampicilina: PAM-4Na	-13.4	12	
6	Ampicilina: PAM-4Na	-13.4	24	
7	Ampicilina: PAM-4Na	-13.4	48	
8	Ampicilina: PAM-4Na	30	12	
9	Ampicilina: PAM-4Na	30	24	
10	Ampicilina: PAM-4Na	30	48	
11	Ampicilina: PAM-18Na	-13.4	12	
12	Ampicilina: Eudragit E-100	-13.4	12	

#### 2.4.4.3. Análisis estadístico

La recolección de datos se realizó de manera cualitativa, por medio de una inspección visual. Para el análisis estadístico se reportó como 1 (uno) el crecimiento bacteriano y 0 (cero) la ausencia del mismo; se aplicó un diseño de regresión que se ajusta a un modelo matemático probabilístico, el cual estima la probabilidad de crecimiento teniendo en cuenta los tres factores evaluados, temperatura (-13.4; 30°C), tiempo (12,24,48 h) y concentración (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 µg/mL). Este modelo de regresión se asemeja al modelo de superficies de respuesta, el cual, encuentra niveles óptimos de un factor sobre una respuesta, por lo tanto, aplicando este modelo estadístico se puede inferir, cuál de los anteriores factores es el más efectivo para que se dé el crecimiento bacteriano.

## 2.4.5. Matriz Marco-Lógico

**Tabla 4.** Matriz Marco-Lógico

<b>Objetivo General</b>			
<p>Evaluar el efecto antimicrobiano del antibiótico <math>\beta</math>-lactámico ampicilina asociado a la sal sódica del polímero poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300).</p>			
	<b>Actividades</b>	<b>Supuestos</b>	<b>Indicador</b>
<p><b>Objetivo específico 1:</b></p> <p>Obtener el material polimérico sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na mediante hidrólisis básica usando hidróxido de sodio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar las cantidades necesarias de polímero e hidróxido de sodio para la proporción polímero:hidróxido de sodio 1:1</li> <li>- Sintetizar la sal sódica del polímero a partir del poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4 por reacciones con hidróxido de sodio.</li> <li>- Purificar el material polimérico por medio de procesos de ultrafiltración y liofilización.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cantidades necesarias para llevar a cabo la reacción de hidrólisis básica del polímero.</li> <li>- El equipo de liofilización se encuentra en buen estado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtención del material polimérico en estado sólido.</li> </ul>
<p><b>Objetivo específico 2:</b></p> <p>Caracterizar por espectroscopia FTIR y calorimetría de barrido diferencial (DSC) el material polimérico obtenido.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tomar el espectro de IR y DSC del material polimérico producido.</li> <li>- Identificar en el espectro IR las características estructurales del material polimérico obtenido.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disponibilidad y buen estado del equipo de infrarrojo con transformada de Fourier.</li> <li>- Contar con el equipo de calorimetría</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtención del espectro de IR y termograma por DSC.</li> </ul>

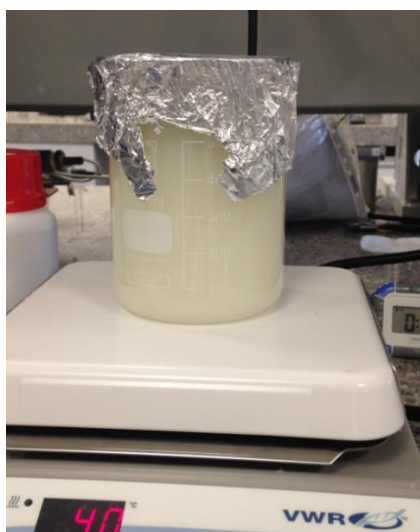


	-Analizar las propiedades térmicas del material polimérico sintetizado a partir del termograma tomado por DSC	diferencial de barrido (DSC) en funcionamiento y buen estado.	
<p><b>Objetivo específico 3:</b></p> <p>Determinar la concentración mínima inhibitoria generada por la asociación entre ampicilina y la sal sódica del polímero poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300) usando proporciones matriz polimérica:fármaco 1:1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Búsqueda bibliográfica de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico para establecer el rango de concentraciones a utilizar.</li> <li>-Obtener los caldos nutritivos para el crecimiento de las cepas bacterianas.</li> <li>-Sembrar las cepas bacterianas en contacto con el antibiótico, el polímero, asociación antibiótico-polímero en diferentes placas de microdilución.</li> <li>-Análisis estadístico de los resultados obtenidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Disponibilidad del caldo nutritivo para el crecimiento de las cepas bacterianas.</li> <li>-Crecimiento de las cepas bacterianas en los tratamientos de estudio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentraciones mínimas inhibitorias encontradas en las pruebas de microdilución de placas.</li> </ul>

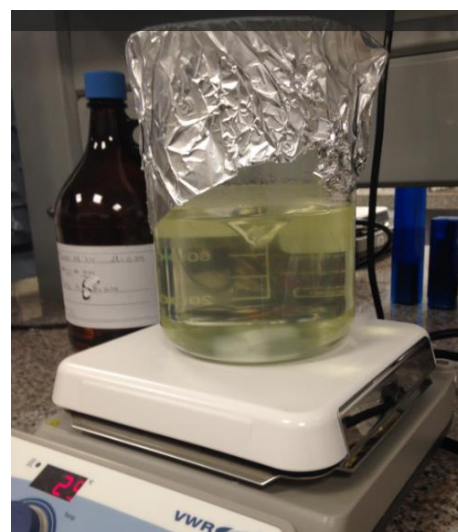
## 2.5. Resultados y discusión

### 2.5.1. Obtención de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na

Como se mencionó anteriormente, la preparación del material polimérico se realizó a partir del material precursor poli(anhídrido maleico-alt-isobutileno) PAM-4. Inicialmente el sistema se mostró como una dispersión heterogénea que posteriormente se transformó en una dispersión completamente homogénea como se muestra en la Figura 7.



Dispersión heterogénea del PAM-4Na



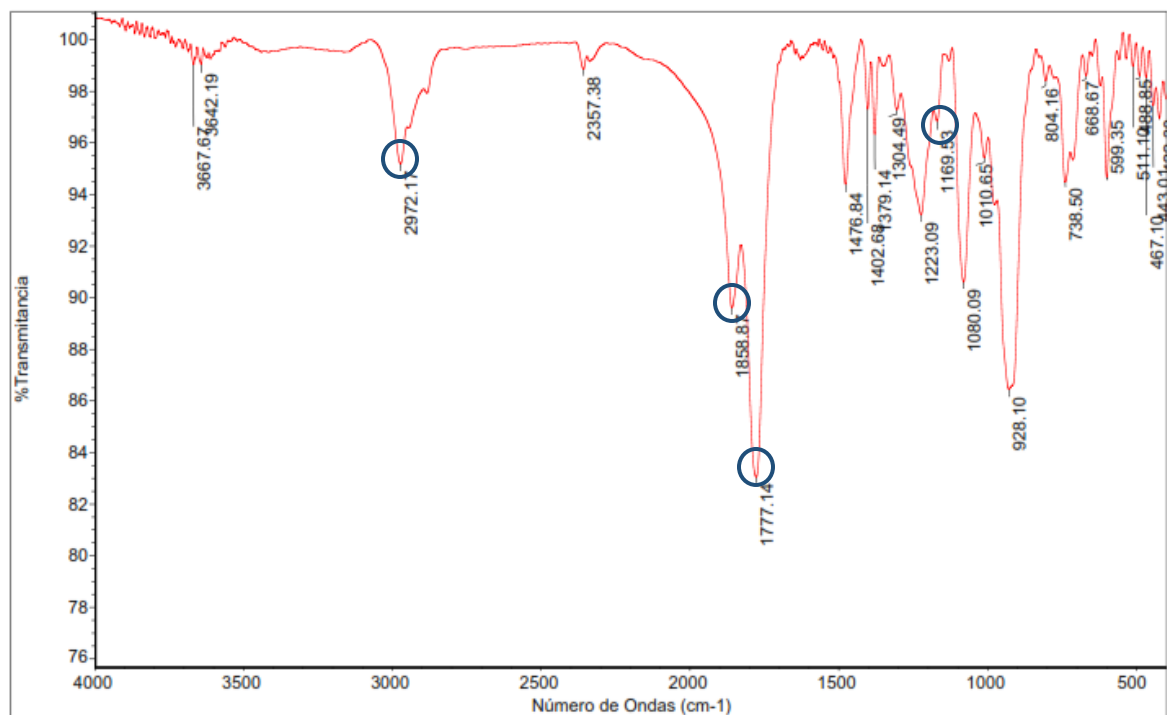
Dispersión homogénea del PAM-4Na

**Figura 7.** Proceso de hidrólisis en medio acuoso para la obtención del sistema ionomérico PAM-4Na

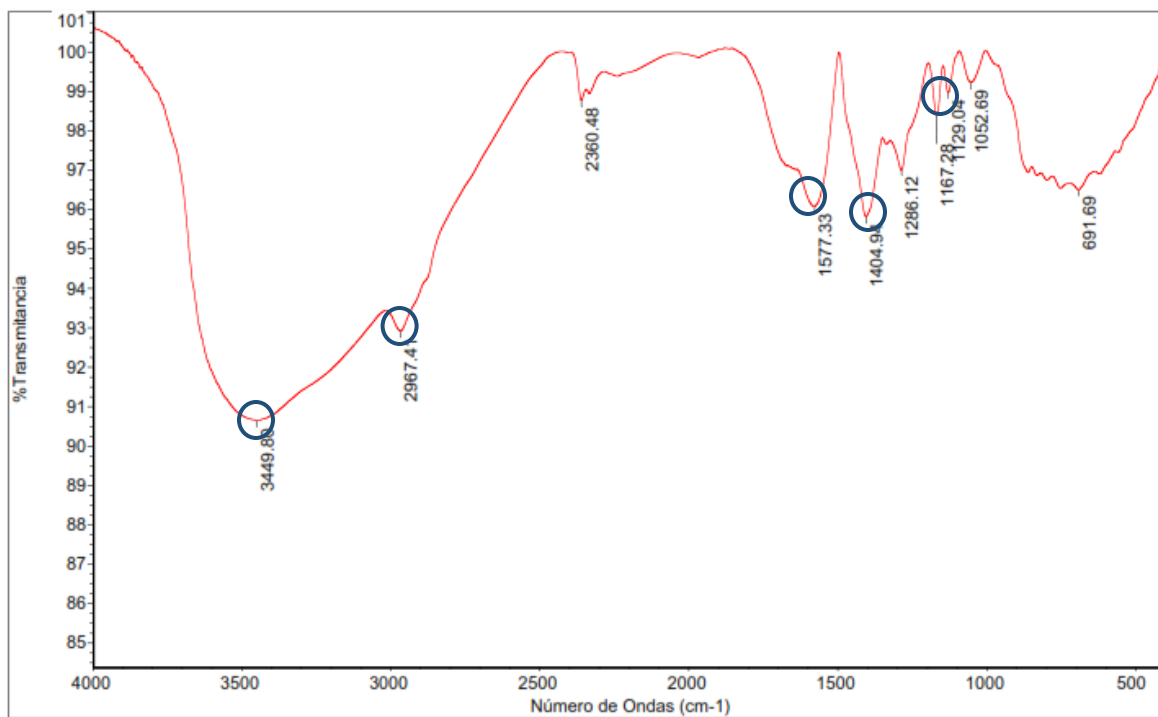
La obtención de este sistema homogéneo se debe al rompimiento del grupo anhídrido que genera grupos de ácidos carboxílicos, los cuales, se convierten posteriormente a sus formas de carboxilatos, produciendo un sistema ionomérico. De acuerdo a lo anterior, este sistema ionomérico es más soluble en medio acuoso, debido a las interacciones de tipo ión-dipolo entre el polímero y el agua. (Figura 4).

## 2.5.2. Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno)

Una vez hidrolizado y purificado el material polimérico por los procesos de ultrafiltración y liofilización, se caracterizó el material polimérico por medio de espectroscopia de FTIR. Para esto se obtuvieron los espectros tanto del material precursor (Figura 8) como del producto final (Figura 9).



**Figura 8.** Espectro IR del material polimérico PAM-4 (material precursor)

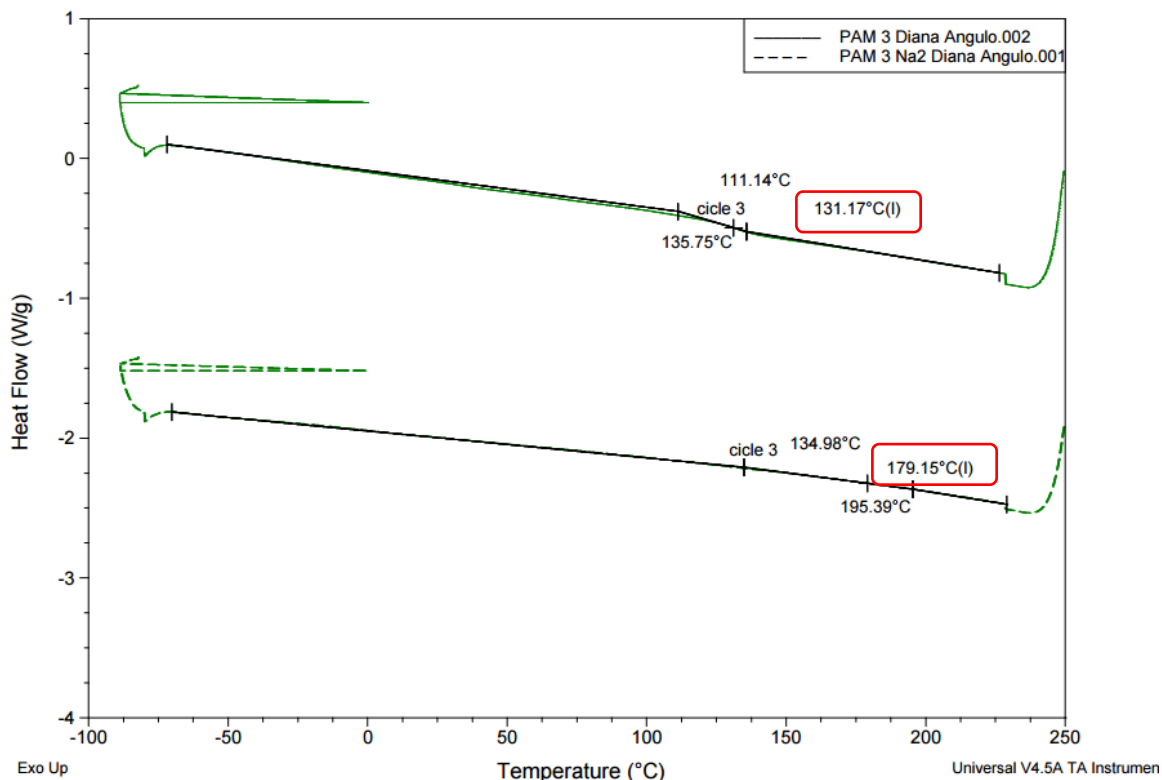


**Figura 9.** Espectro IR del material polimérico PAM-4Na (producto final)

A partir de los anteriores espectros IR se pueden observar señales características de los grupos funcionales del material precursor y el producto final, por ejemplo, las bandas en 2972 y 2967  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a los enlaces C-H de la cadena hidrocarbonada ( $-\text{CH}_3$ ), las cuales se pueden corroborar además, con la señal alrededor de 1169 y 1167  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al radical isobutil. Estas señales son muy similares en ambos espectros, dado que la cadena lateral polimérica correspondientes al grupo isobutileno, permanece inalterada en el proceso de hidrólisis. Igualmente, se puede observar una variación en las señales de los grupos carbonilos del anhídrido maleico de 1858 y 1777  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 8) a 1404 y 1577  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 9).

Por otro lado, la aparición de una banda a 3449  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 9) es un indicativo de la presencia de un grupo hidroxilo, proveniente de la formación de grupos ácidos carboxílicos; lo anterior, es una prueba de que el proceso de hidrólisis no es del 100%, por lo que se pueden presentar fracciones de la forma ácida e iónica del material polimérico. Cabe mencionar que la banda a 1476  $\text{cm}^{-1}$  que se presenta en el espectro del material precursor (Figura 8), es un indicativo de la hidrólisis del grupo carbonilo debido a la humedad del medio. Por último, las bandas de 2357 y 2360 de ambos espectros, corresponden al  $\text{CO}_2$  proveniente del equipo.

Por otro lado, se realizó una caracterización térmica usando la técnica de calorimetría de barrido diferencial, empleando un equipo DSC Q 2000 de la marca TA instruments. En la Figura 10 se presenta el termograma obtenido para los polímeros PAM-4 (material precursor) y PAM-4Na (producto final).



**Figura 10.** Termograma de los polímeros PAM-4 y PAM-4Na

El anterior experimento se llevó a cabo de  $-90^{\circ}\text{C}$  a  $250^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , realizándose 3 ciclos de calentamiento y enfriamiento. En la etapa de calentamiento del tercer ciclo para el PAM-4 (línea continua), se observa una transición térmica a  $131^{\circ}\text{C}$ , que corresponde a la transición vítrea del polímero, la cual se encuentra muy cercana a la reportada por el fabricante ( $141^{\circ}\text{C}$ ) (Sigma-Aldrich®, 2016). Esta transición térmica permite conocer la organización estructural del material, por lo tanto, dicha transición vítrea indica la naturaleza amorfa del mismo.

De igual manera, se puede observar una transición térmica a  $179^{\circ}\text{C}$  para el PAM-4Na (línea discontinua) correspondiente a la transición vítrea del polímero, como se mencionó anteriormente, esta transición se presenta en materiales amorfos, debido a que poseen una menor organización molecular respecto a los materiales cristalinos. En el termograma se puede observar un aumento en las transiciones térmicas de  $131^{\circ}\text{C}$  a  $179^{\circ}\text{C}$  para los polímeros PAM-4 y PAM-4Na respectivamente, lo anterior indica que el PAM-4Na presenta un mayor grado de amorficidad respecto al PAM-4.

### 2.5.3. Pruebas de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria de los tratamientos

Con el objetivo de conocer la actividad antibiótica de los tratamientos evaluados, se realizaron pruebas de microdilución en caldo. Ésta es la prueba de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos más práctica y ampliamente utilizada debido a que se obtiene un gran número de réplicas o repeticiones con un mínimo de materiales y reactivos (Clinical and Laboratory Standards Institute , 2012) En la Tabla 5 se encuentran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ampicilina según los parámetros establecidos por la CLSI para cepas de *S. aureus* ATCC®. Recuérdese que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es aquella menor concentración del tratamiento antibiótico de estudio que inhibe completamente el crecimiento de un organismo después de un período definido de incubación (Howden & Johnson, 2009). Por otro lado, en la Tabla 6 se presentan las concentraciones que determinan la susceptibilidad (S) o resistencia (R) de las cepas de *S. aureus* ATCC®, a la ampicilina.

**Tabla 5.** CMI de ampicilina para las cepas de estudio reportado por la CLSI

Cepa de <i>S. aureus</i> ATCC®	CMI de ampicilina (µg/mL)
25923	0.25 -1
29213	0.5 – 2
43300	> 4

**Tabla 6.** CMI para *S. aureus* ATCC® reportado por la CLSI

Agente antimicrobiano	CMI (µg/mL)		
	S	I	R
Ampicilina	≤ 0.25	-	≥ 0.5

S-sensible. I-intermedio. R-resistente

En la Tabla 7 se muestran los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los tratamientos correspondientes a ampicilina, PAM-4Na, y complejos de asociación (ampicilina-PAM-4Na) evaluados en las tres cepas de *S. aureus* ATCC®.

**Tabla 7.** Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina-PAM-4Na

A-ampicilina sola. P-polímero solo (PAM-4Na). P: A- complejo de asociación entre polímero y ampicilina

Cepa <i>S. aureus</i> ATCC®	Sistema libre		Complejos de asociaciones					
	A	P	P: A 12h (-13.4°C)	P: A 12h (30°C)	P: A 24h (-13.4°C)	P: A 24h (30°C)	P: A 48h (-13.4°C)	P: A 48h (30°C)
25923	0.125	> 32	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
29213	1	> 32	1	1	1	1	1	1
43300	16	> 32	16	16	16	16	16	16

Adicionalmente, se evaluaron otros dos materiales polímeros, correspondientes a la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno) PAM-18Na y el Clorhidrato de Eudragit E-100, con el fin de relacionar la estructura química del polímero, con el efecto bioprotector del mismo en los complejos de asociación con la ampicilina. El PAM-18Na es un polímero similar al PAM-4Na, sin embargo la longitud de la cadena alquílica de ambos son diferentes, presentando el PAM-18Na una cadena más larga respecto al PAM-4Na; se presume que la longitud de la cadena alquílica del polímero, es la causa de la bioprotección antes los diversos mecanismos de resistencia que presentan las cepas bacterianas, como lo han reportado Barajas-Jordán y Bautista-Eraza en sus respectivos trabajos de grado. Por otra parte, y para demostrar que la carga eléctrica del polímero no es un factor tan determinante como la cadena alquílica, se evaluó el polímero Eudragit E-100, que presenta una cadena alquílica corta al igual que el PAM-4Na, pero con una carga eléctrica opuesta a este.

Los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias para los tratamientos correspondientes a ampicilina, PAM-18Na, Eudragit E-100 y complejos de asociación (ampicilina-PAM-18Na y ampicilina-Eudragit E-100) evaluados en las tres cepas de *S. aureus* ATCC® se presentan en las Tablas 8 y 9. Es necesario mencionar que los siguientes ensayos fueron sometidos a  $-13.4^{\circ}\text{C}$  por 12 horas.

**Tabla 8.** Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina-PAM-18Na

A-ampicilina solo. P-polímero solo (PAM-18Na). P: A- complejo de asociación entre polímero y ampicilina

Cepa <i>S. aureus</i> ATCC®	Sistema libre		Complejo de asociación
	A	P	P: A 12h (-13.4°C)
25923	0.125	> 32	0.0625
29213	1	> 32	0.125
43300	16	> 32	8

**Tabla 9.** Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas del complejo de asociación ampicilina- Eudragit E-100

A-ampicilina solo. P-polímero solo (Eudragit-100). P: A- complejo de asociación entre polímero y ampicilina

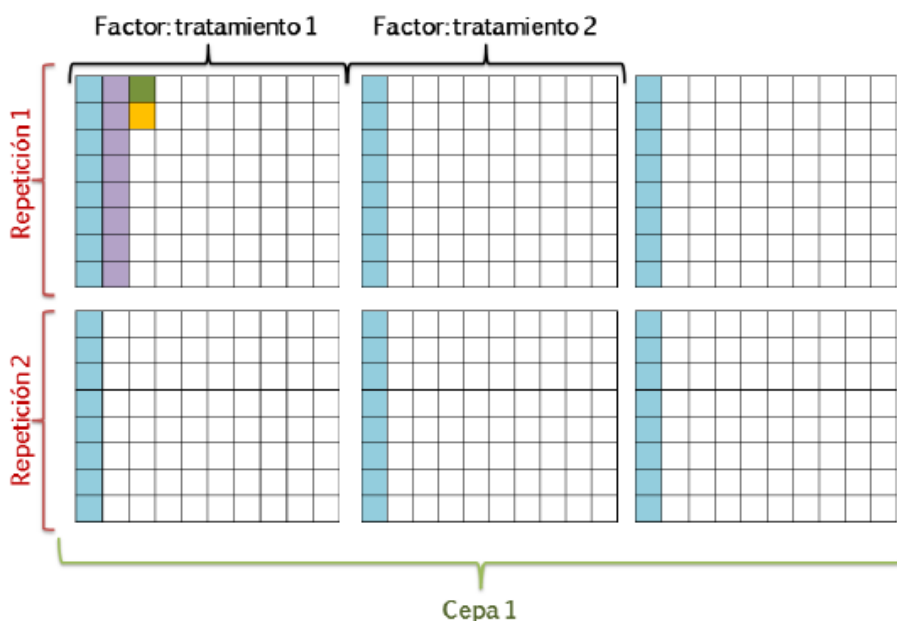
Cepa <i>S. aureus</i> ATCC®	Sistema libre		Complejo de asociación
	A	P	P: A 12h (-13.4°C)
25923	0.125	> 32	0.125
29213	1	> 32	0.5
43300	16	> 32	16

Los ensayos para determinar la susceptibilidad o resistencia de las cepas que se emplearon en este estudio, fueron evaluados y reportados por Barajas-Jordán en su proyecto de grado, reportando que las cepas mantienen las características descritas por el distribuidor Microbiologics Inc® (ATCC®) y las reportadas por el CLSI (Barajas-Jordán, 2013). Por otra parte, Barajas-Jordán reportó un estudio de estabilidad de las soluciones de ampicilina, demostrando que, en un tiempo mayor al requerido para la realización de las pruebas de microdilución en caldo, las soluciones de ampicilina mantienen su concentración inicial. Así pues, se asume que, desde la preparación de las soluciones hasta la incubación de las microplacas, las concentraciones de ampicilina son invariables.



En el anexo se describen los equipos, materiales y reactivos que deben ser esterilizados para asegurar que las soluciones no sean fuente de contaminación. En los ensayos realizados no se evidenció crecimiento anormal de las cepas de estudio y aunque en los controles negativos se encontraron algunas contaminaciones, se descarta que sea por los reactivos utilizados. Se debe tener especial cuidado con las buenas prácticas de laboratorio, especialmente con el manejo del material en la cabina de bioseguridad, debido a que cualquier manipulación indebida dentro de ella, puede generar contaminación en las muestras. Por esto es importante realizar un entrenamiento previo, para que el analista se afiance con la técnica y metodología.

La forma en cómo se evaluó el crecimiento bacteriano está estandarizada por el CLSI. Allí describen que la determinación del crecimiento bacteriano se realiza de forma visual, ya sea por la turbidez o la formación de un precipitado en el fondo del pozo (Clinical and Laboratory Standards Institute , 2012). Aunque en el trabajo de Bautista-Erao se realizó una curva de calibración para la determinación cuantitativa del crecimiento bacteriano (inspección espectrofotométrica), se encontró que algunos parámetros estadísticos, como linealidad y robustez, no eran significativos.



**Figura 11.** Descripción grafica de la composición de un ensayo. Tomado de: **(Bautista-Erao, 2015)**

Teniendo en cuenta lo anterior, en la Figura 11 se muestra el esquema de los ensayos que se llevaron a cabo durante la experimentación. En dicha figura se observa una placa de 96 pozos que tiene 12 columnas (10 columnas de diluciones dobles seriadas y 2 columnas para controles negativos y positivos) y 8 filas para réplicas. En esta placa, los tratamientos corresponden a los materiales analizados

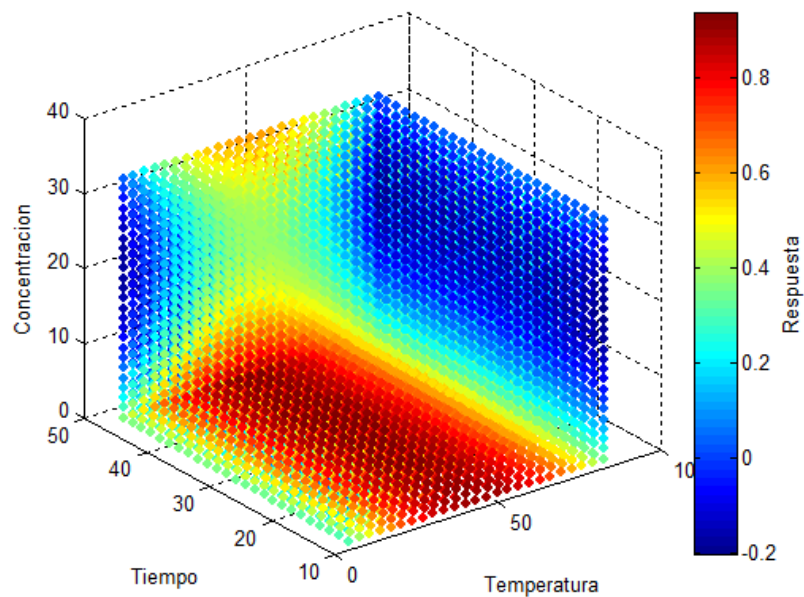
(polímero, ampicilina y complejos de asociación). Las líneas azul y violeta representan dos concentraciones diferentes de un mismo tratamiento, por ejemplo cuando se menciona ampicilina 32 µg/mL y ampicilina 16 µg/mL, “ampicilina” corresponde al tratamiento y tanto 32 µg/mL como 16 µg/mL corresponden a dos concentraciones diferentes del mismo tratamiento. Las repeticiones son las diferentes placas empleadas para evaluar un mismo tratamiento (2 para cada tratamiento). Los cuadros verde y amarillo representan dos réplicas de la misma concentración, por ejemplo, réplica 1 de ampicilina 8 µg/mL y réplica 2 de ampicilina 8 µg/mL, de acuerdo a lo anterior, se obtuvieron 16 réplicas por cada concentración evaluada. En conclusión, para una misma cepa, se analizaron dos placas (2 réplicas) para cada uno de los tratamientos evaluados (polímero, ampicilina, polímero-ampicilina). Hay que tener en cuenta que los tratamientos realizados se llevaron a cabo para una misma cepa, esto con el fin de evitar la variabilidad que se puede producir al evaluar diferentes tratamientos en diferentes días con una misma cepa (Bautista-Eraza, 2015). En el anexo 3.3. (Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias de los ensayos realizados en la experimentación) se encuentra detalladamente, todas las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas durante los ensayos evaluados.

Para los ensayos 1, 2 y 3 (Tabla 3), se determinó la actividad antibiótica de las matrices poliméricas PAM-4Na, PAM-18Na y Eudragit E-100 respectivamente. En las Tablas 7, 8 y 9 se puede observar que ninguna de las concentraciones de polímeros evaluadas (desde 0.0625 µg/mL hasta 32µg/mL) inhibe el crecimiento bacteriano. Así, la concentración mínima inhibitoria de los polímeros PAM-4Na, PAM-18Na y Eudragit E-100, para todas las cepas evaluadas, es > 32 µg/mL. Esto lleva a la conclusión de que la actividad antibiótica sólo se ve afectada por el fármaco antimicrobiano libre o asociado a la matriz polimérica.

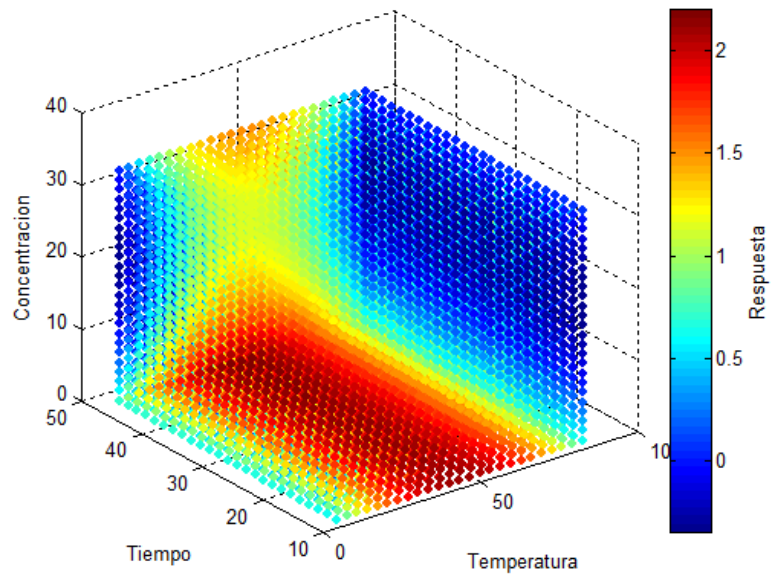
Posteriormente se evaluó la ampicilina (ensayo 4 -Tabla 3), en las tres cepas estudiadas. Para este tratamiento se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 0.125 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, 1 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 y 16 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300. De acuerdo a lo anterior y a lo reportado por el CLSI (Tabla 5 y 6), se puede afirmar que la cepa *S. aureus* ATCC® 25923 es sensible a la ampicilina, y las cepas *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* ATCC® 43300, son resistentes a la misma.

Para el ensayo 5, se evaluó el complejo de asociación ampicilina: PAM4-Na a -13.4°C y 12 horas, como se puede observar en la Tabla 7; para este tratamiento se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 0.125 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, 1 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 y 16 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300. Al hacer una comparación entre los resultados del tratamiento ampicilina (ensayo 4) con los obtenidos por el complejo de asociación (ensayo 5), en las cepas evaluadas, no se evidenció un cambio en las concentraciones mínimas inhibitorias. Los anteriores resultados coinciden con los encontrados para los ensayos 6, 7, 8, 9 y 10.

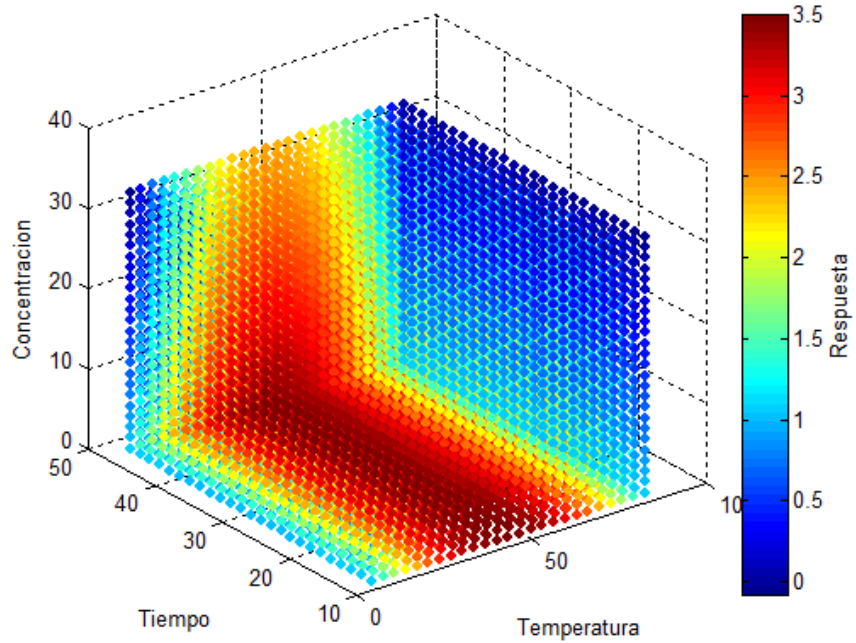
Teniendo en cuenta los anteriores resultados se puede deducir que los factores de temperatura y tiempo a los que fueron sometidos los complejos de asociación ampicilina: PAM-4Na no influyeron en la actividad antibiótica de la ampicilina. Lo anterior se puede corroborar con el análisis de respuesta de crecimiento bacteriano realizado por el modelo de regresión, dicho análisis tiene en cuenta los factores evaluados (concentración, tiempo y temperatura) y estima la respuesta como la probabilidad de que haya crecimiento bacteriano. A continuación se presentan las gráficas para las tres cepas estudiadas y los tratamientos a los que fueron sometidos; cabe mencionar que para facilitar el análisis probabilístico en el modelo de regresión, se empleó la escala de temperatura en grado Fahrenheit (°F) en vez de grado Celsius (°C).



**Figura 12.** Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na



**Figura 13.** Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na



**Figura 14.** Análisis de respuesta de crecimiento para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300 con el complejo Ampicilina: PAM-4Na

Así pues, para el caso del complejo de asociación ampicilina: PAM-4Na y la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, se puede observar en la Figura 12 que el crecimiento bacteriano se presenta a bajas concentraciones, y que el tiempo y la temperatura no influyen para que se dé este crecimiento, es decir, que el área sombreada de color rojo en dicha gráfica, indica la región donde se da el mayor crecimiento bacteriano; por lo tanto, se puede observar que dicho crecimiento se presenta en las temperaturas evaluadas, entre 10°F (-13.4°C) y 80°F (30°C), y el tiempo evaluado, entre 12 y 48 horas. Por otra parte, y teniendo en cuenta que el *S. aureus* ATCC® 25923 es una cepa sensible, es coherente que se presente una inhibición bacteriana a concentraciones >0.125 µg/mL. En la Figura 13 se observa que el crecimiento bacteriano para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 usando el complejo de asociación ampicilina: PAM-4Na, al igual que la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, el tiempo y la temperatura no son factores que influyen en la respuesta, y dicho crecimiento se presenta en las mismas condiciones de temperatura y tiempo del *S. aureus* ATCC® 25923; sin embargo, se observa que la inhibición bacteriana (área azul) se presenta a concentraciones >1 µg/mL. Por último, para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300 y el complejo de asociación de ampicilina: PAM-4Na, se observa en la Figura 14 que el crecimiento bacteriano se presenta a altas concentraciones (16µg/mL), esto se debe, a que en esta cepa pueden actuar diversos mecanismos de resistencia, que la convierten en una cepa multirresistente; por otro lado, al igual que las cepas anteriores, los factores de tiempo y temperatura no afecta la respuesta de crecimiento bacteriano.

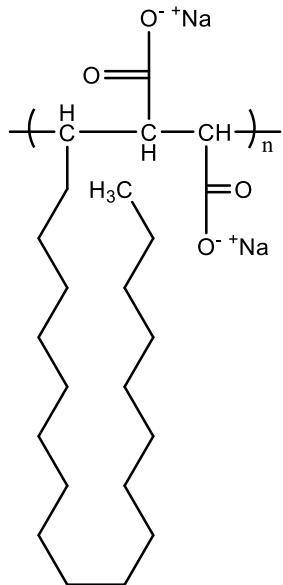
Para el ensayo 11, se evaluó el complejo de asociación ampicilina: PAM-18Na a -13.4°C y 12 horas, en la Tabla 8 se observa que para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, hubo un cambio en la concentración mínima inhibitoria de 0.125 µg/mL a 0.0625 µg/mL cuando se agregó el polímero; debido a que esta cepa es susceptible, el efecto del polímero no es importante dado que la ampicilina en cualquier estado es capaz de afectar el microorganismo e inhibir el crecimiento a determinada concentración. *Por otra parte, para la cepa S. aureus ATCC® 29213, hubo una disminución de 1 µg/mL a 0.125 µg/mL, lo anterior significa que se logró disminuir tres veces la concentración para inhibir el crecimiento del microorganismo, indicando que existe un efecto antimicrobiano marcado cuando el antibiótico se encuentra asociado a la matriz polimérica PAM-18Na, actuando ésta como un sistema de reservorio que protege el fármaco de la degradación enzimática que tiene lugar a través de las β-lactamasas exógenas producidas por la cepa de S. aureus ATCC® 29213.* Este resultado es satisfactorio, debido a que al observar la Tabla 6, se puede deducir que este tratamiento puede convertir la cepa *S. aureus* ATCC® 29213, sensible al tratamiento antibiótico. Finalmente, para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300 se obtuvo un cambio de 16 µg/mL a 8 µg/mL, esta disminución no es tan significativa debido a que esta cepa es multirresistente, por lo que pueden actuar simultáneamente varios mecanismos de resistencia: uno de ellos mediado por la producción de enzimas degradadoras y otro que provoca disminución de la sensibilidad en la molécula diana, a pesar de que el polímero puede proteger físicamente al antibiótico de la degradación enzimática bacteriana, dichas cepas ya cuentan con otro mecanismo de resistencia (Tabla 10).

Para el ensayo 12, se evaluó el complejo de asociación ampicilina: Eudragit E-100 a -13.4°C y 12 horas, como se puede observar en la Tabla 9; para este tratamiento se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 0.125 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 25923, 0.5 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 y 16 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC® 43300. Al hacer una comparación entre los resultados del tratamiento ampicilina (ensayo 4) con los obtenidos por el complejo de asociación (ensayo 12), en las cepas evaluadas, no se evidenció un cambio en las concentraciones mínimas inhibitorias, excepto para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213, que se logró disminuir la concentración a la mitad.

**Tabla 10.** Características de cepas de *S. aureus*

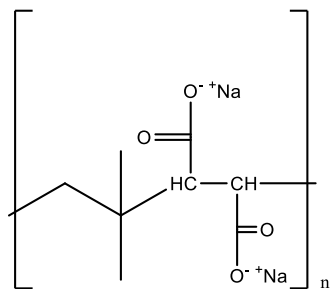
Microorganismo	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• β-lactamasa negativo</li> <li>• <i>mecA</i> negativo</li> <li>• CMI pequeña, demostrando susceptibilidad a antibiótico</li> </ul>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Débil producción de β-lactamasas</li> <li>• <i>mecA</i> negativo</li> </ul>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistente a oxacilina</li> <li>• <i>mecA</i> positivo</li> </ul>

Ahora bien, los anteriores resultados se pueden explicar de la siguiente manera: los materiales PAM-4Na y PAM-18Na son polímeros anfifílicos de naturaleza aniónica, que tienen la capacidad de generar pseudofases hidrófobas creadas por el ovillamiento del mismo y pueden retener terceros componentes de la misma naturaleza apolar, es decir, que estos polímeros pueden emplearse como reservorios de fármacos y a la vez como agentes bioprotectores ante diversos mecanismos de resistencia que presentan las cepas bacterianas (Salamanca, 2007). Sin embargo, y teniendo en cuenta los resultados anteriormente mencionados, se puede concluir que el polímero PAM-18Na si ejerce un efecto bioprotector, al potenciar la actividad antibiótica de la ampicilina, por el contrario, el polímero PAM-4Na no ejerce dicha bioprotección. Aunque ambos polímeros son análogos, la diferencia radica en que el PAM-18Na posee una cadena alquílica con más enlaces hidrocarbonados (C18) (Figura 15), respecto al PAM-4Na que posee menos enlaces hidrocarbonados (C2) (Figura 16). Con lo anterior se pueden concluir que el tamaño de la cadena alquílica de estos polímeros anfipáticos es necesario para la formación de dichas pseudofases poliméricas.



Sal sódica Poli(ácido maleico-alt-octadeceno)

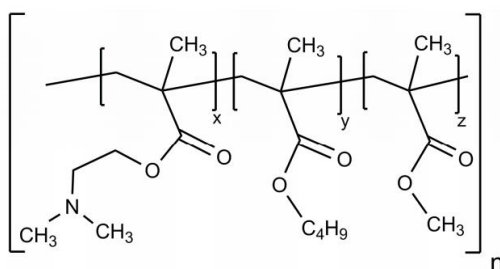
**Figura 15.** Estructura química del PAM-18Na



Sal sódica Poli(ácido maleico-alt-isobutileno)

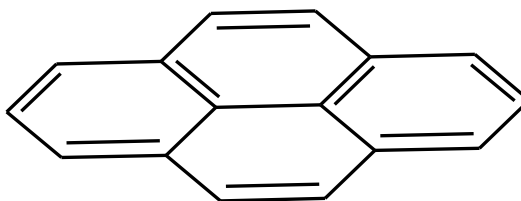
**Figura 16.** Esquema del monómero de la matriz polimérica de la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno)

Por otro lado, y para verificar que el tamaño de la cadena alquílica es un factor crítico en la formación de pseudofases poliméricas, se evaluó además, el polímero Clorhidrato de Eudragit E-100 (Figura 17), este polímero de naturaleza catiónica al igual que el PAM-4Na, no presenta una cadena alquílica lo suficientemente grande para formar pseudofases, y no ejerció un efecto bioprotector, por lo tanto, se puede descartar que la carga del polímero influya en el efecto antibiótico del complejo de asociación.



**Figura 17.** Estructura química del Eudragit E-100

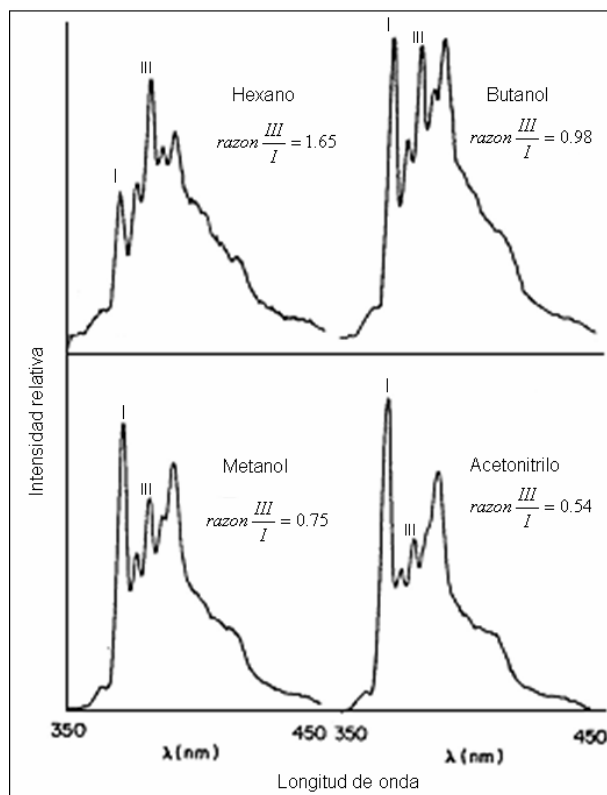
Los anteriores resultados se pueden corroborar con los estudios realizados a sistemas heterogéneos empleando sondas fluorescentes. El principio básico de este método es introducir al sistema una molécula de comportamiento fotofísico conocido, y que dependa fuertemente del medio en que se encuentra. De esta manera, las variaciones en la intensidad, el tiempo de vida y la posición de las bandas de emisión, permiten extraer información sobre las características del sistema (Thomas, 1983). En este estudio se empleó la sonda fluorescente pireno (Figura 18), el cual brinda información de la polaridad del ambiente y el grado de movimiento de las cadenas laterales en sistemas heterogéneos.



**Figura 18.** Estructura del pireno

Esta sonda corresponde a un policíclico insaturado, que ha sido ampliamente utilizado en estudios de sistemas heterogéneos, debido a que tanto su espectro de emisión como su tiempo de vida fluorescente, presentan una fuerte dependencia del medio donde se encuentra. En la Figura 19 se muestra un espectro de emisión fluorescente en estado estacionario para moléculas de pireno en diferentes medios, empleando un espectrofluorímetro. El espectro de emisión consta de cinco bandas vibrónicas características. La relación entre la tercera banda vibracional que aparece a 384 nm y la primera banda vibracional centrada en 373 nm se denomina razón  $I_3/I_1$ . El valor de esta razón es altamente dependiente de la polaridad del medio, 0.54 en medios polares y alrededor de 1.65 en medios apolares. De esta manera, dicha razón puede ser utilizada para analizar la formación de agregados poliméricos o bien, de entornos hidrofóbicos (Zana & Benrraou, 2000).





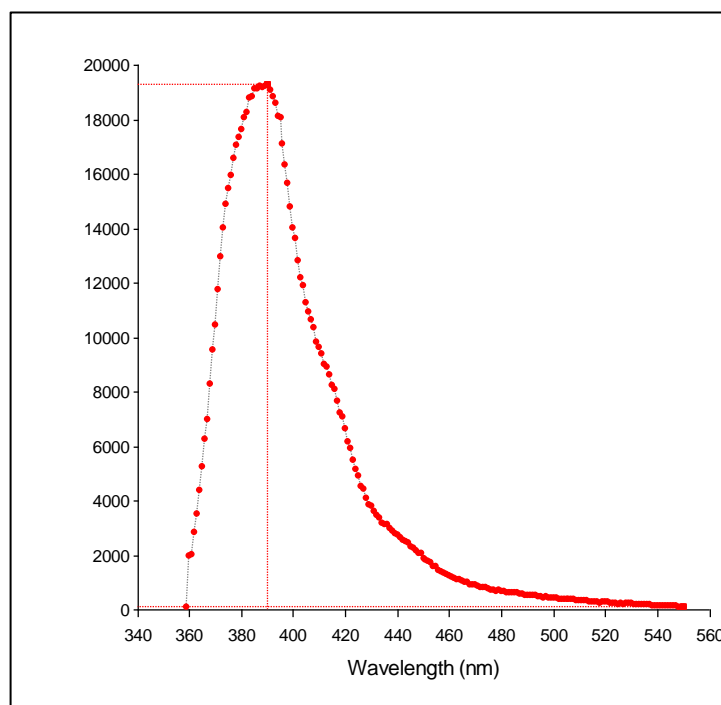
**Figura 19.** Espectros de emisión fluorescente del pireno en diferentes solventes

En la Tabla 11 se observa la razón  $I_3/I_1$  del pireno en diferentes medios, utilizando un equipo de lector de placas con fluorescencias marca BioTek™ Synergy™. Como se puede ver, los valores de la razón  $I_3/I_1$  del pireno que se presentan en la Tabla 11 y los mostrados en la Figura 19 difieren un poco, esto se debe a que los espectros de la Figura 19 fueron hallados por medio de un espectrofluorímetro, el cual analiza las longitudes de onda en un rango de 0.1nm, y por lo tanto se obtienen espectros bien definidos (Figura 19). Por el contrario, el equipo empleado en este estudio, el lector de placas, analiza con un rango de longitudes de onda de 0.5 nm, por lo que se obtienen espectros de emisión de muy baja resolución (Figura 20 y Figura 21).

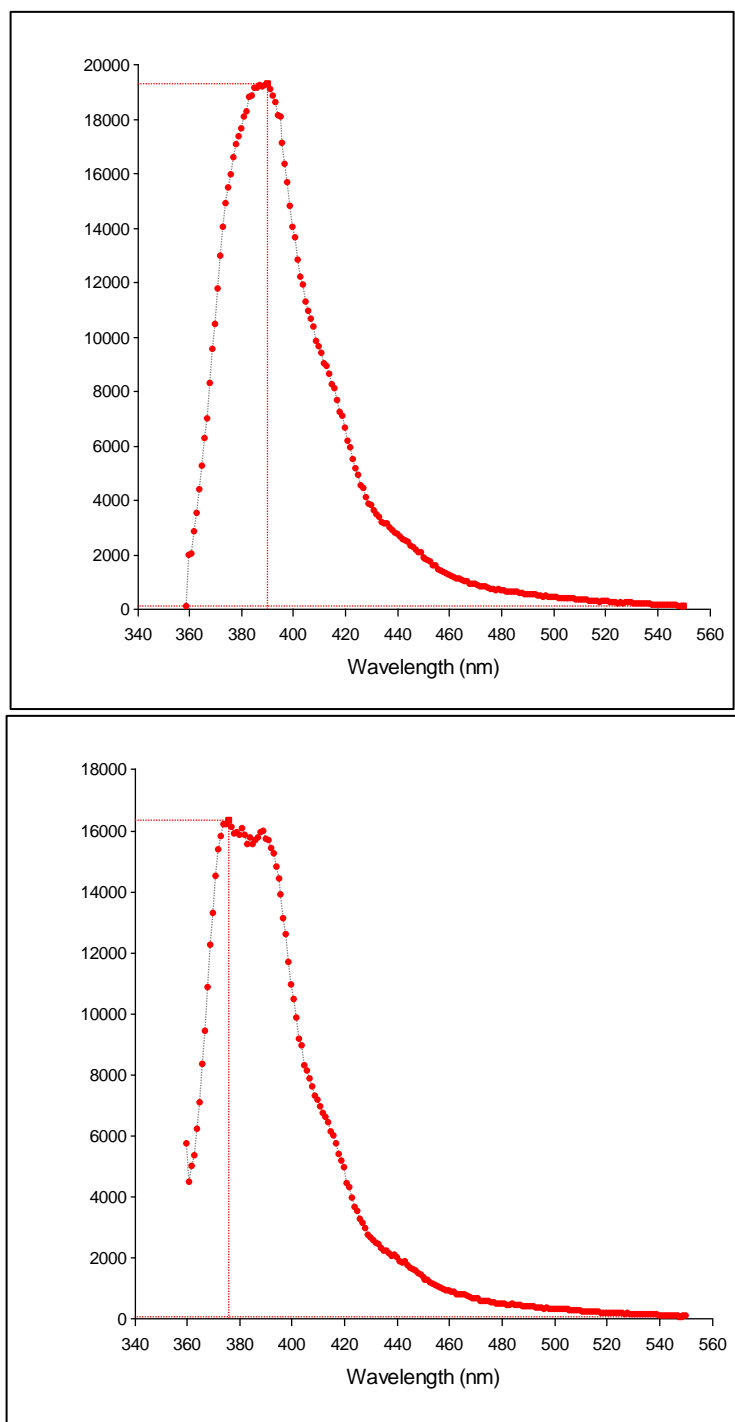
**Tabla 11.** Razón  $I_3/I_1$  del pireno en diferentes solventes

Medio	Razón $I_3/I_1$
Agua	0.98
Acetonitrilo	1.05
Metanol	1.14
Isopropanol	1.21
Butanol	1.30
n-Heptano	1.64

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se utilizó el pireno como sonda fluorescente para determinar la razón  $I_3/I_1$ , en dos sistemas heterogéneos correspondientes al PAM-18Na: ampicilina y al PAM-4Na: ampicilina en medio acuoso; ambos sistemas se realizaron a un rango de pH 6.2 – 6.5, con una concentración de ampicilina de 0.6 mg/mL, y con una proporción 1:1 polímero: antibiótico.



**Figura 20.** Espectros de emisión fluorescente del pireno en el sistema PAM-18Na: ampicilina en medio acuoso



**Figura 21.** Espectros de emisión fluorescente del pireno en el sistema PAM-4Na: ampicilina en medio acuoso

Del espectro de emisión del sistema PAM-18Na: ampicilina (Figura 20) se obtuvo una razón  $I_3/I_1$  de 1.3430, por otra parte, para el sistema PAM-4Na: ampicilina (Figura 21) se determinó una razón  $I_3/I_1$  de 0.9968. De acuerdo a estos resultados y

a lo presentado en la Tabla 11, se puede sugerir que el pireno está sensando un ambiente muy polar en el sistema PAM-4Na: ampicilina, lo anterior puede deberse a que el polímero PAM-4Na, al no ser capaz de formar un agregado o una pseudofase hidrófoba, creada por el ovillamiento de la cadena alquílica, el ambiente del sistema es completamente polar. Por otra parte, la razón  $I_3/I_1$  del sistema PAM-18Na, indica que el pireno está sensando un ambiente apolar en dicho sistema, lo anterior puede deberse a que las cadenas alquílicas del polímero PAM-18Na, son capaces de doblarse y posteriormente dar origen a un ovillamiento del mismo, tal como se ha descrito en estudios realizados por J.K. Thomas (Chu & Thomas, 1987). Estos resultados son coherentes con los presentados anteriormente, en los cuales, se afirma que la cadena alquílica del polímero es un factor importante para la formación del pseudofases hidrófobas, y por consiguiente, para proporcionar un efecto de barrera física frente a diversos sistemas enzimáticos.

## 2.6. Conclusiones

- Se determinó que el polímero sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na no ejerce un efecto bioprotector en el complejo de asociación ampicilina: polímero, frente a los mecanismos de resistencia en las cepas bacterianas estudiadas.
- Se obtuvo el material polimérico PAM-4Na en estado sólido mediante hidrólisis básica usando hidróxido de sodio.
- Se caracterizó el material polimérico PAM-4Na por FTIR y DSC, obteniendo bandas características del polímero y transiciones vítreas, indicando la naturaleza amorfa del mismo.
- Se confirmó que el polímero sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na no ejerce efecto antibiótico frente a las cepas de estudio (*S. aureus* ATCC® 25923, *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* ATCC® 43300).
- Se confirmó lo descrito en el trabajo de grado de Barjas – Jordan, respecto a la susceptibilidad de las cepas de estudio (*S. aureus* ATCC® 25923, *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* ATCC® 43300), mediante las pruebas de microdilución en caldo.
- Se determinó los factores de temperatura, tiempo y concentración del complejo de asociación ampicilina: polímero no son influyentes en la respuesta del crecimiento bacteriano.
- Se determinó que la cadena alquílica del polímero empleado en el complejo de asociación, es un factor crítico en la bioprotección del fármaco frente a los mecanismos de resistencia presentes en las cepas evaluadas.

- Se determinó que el complejo de asociación ampicilina: PAM-18Na para la cepa *S. aureus* ATCC® 29213, disminuyó tres veces la CMI respecto a la obtenida con la ampicilina libre, por lo tanto, se puede inferir que el polímero PAM-18Na junto al antibiótico, ejerce un efecto bioprotector sobre la ampicilina.

## 2.7. Recomendaciones

- Es necesario estandarizar un método de cuantificación bacteriana que permita obtener resultados estadísticamente significativos, y por lo tanto, brinden una información más acertada del efecto producido por la asociación ampicilina: polímero.
- Se recomienda una caracterización fisicoquímica del complejo de asociación ampicilina: polímero, o el empleo de técnicas de encapsulación, que permitan conocer el mecanismo de formación del mismo.
- Se recomienda evaluar la metodología propuesta en otros antibióticos que se encuentran en desuso actualmente, o en los cuales, los microorganismos han desarrollado resistencia en los últimos años.
- Se debe investigar otros polímeros de características anfífilas, que tengan la capacidad de formar pseudofases, micelas o liposomas poliméricos, y asociarlos con antibióticos, teniendo en cuenta diferentes técnicas de encapsulación.
- Se podrían evaluar otras cepas que no reporten variabilidad en la CMI, para el ensayo de susceptibilidad bacteriana, con el fin de obtener resultados más confiables.
- Se debe continuar con la optimización de la metodología propuesta, con el fin de controlar las variabilidades que se presentan en la preparación de los tratamientos a evaluar.

## 2.8. Referencias bibliográficas

American Academy of Microbiology. (1999). *Antimicrobial Resistance. An Ecological Perspective*. San Juan: American Society for Microbiology.

American Academy of Microbiology. (2008). *Antibiotic Resistance: An ecological perspective on an old problem*. Ancecy: American Society for Microbiology.

Arenas, T., Mora, C., Salamanca, C., & Jaramillo, M. C. (2012). Actividad del (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona en presencia del

poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona) sobre un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* productor de  $\beta$ -lactamasas. *Iatreia*, Vol. 25 (1): 12-19.

- Arroyave, S., Atehortúa, D., & Jaimes, F. (2014). Actualización en Bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Medicina UPB*, 48-55.
- Barajas-Jordán, S. (2013). *Evaluación del efecto antimicrobiano producido por el polímero anfifílico PAM 18 Na asociado a ampicilina en cepas de Staphylococcus aureus*. Santiago de Cali: Universidad Icesi (Tesis de pregrado).
- Bautista-Erazo, D. (2015). *Determinación de la eficacia antibiótica de los complejos de asociación ampicilina-polímero PAM-18Na2 en cepas de Staphylococcus aureus*. Santiago de Cali: Universidad Icesi (Tesis de pregrado).
- Briceño, D., Correa, A., Valencia, C., & Torres, J. (2010). Actualización de la resistencia a antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en hospitales de nivel III de Colombia: años 2006, 2007 y 2008. *Revista del Instituto Nacional de Salud-Biomédica*, 371-381.
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61 (1): 28-40.
- Chamber, H. (1997). Methicilin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 781-791.
- Chu, D.-Y., & Thomas, J. (1987). Photophysical and Photochemical Studies on a Polymeric Intramolecular Micellar System, PA-18K2. *ACS Publications*, 2133-2138.
- Clinical and Laboratory Standards Institute . (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial M07-A9*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Drawz, S., & Bonomo, R. (2010). Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 160-201.
- Gabbott, P. (2008). *Principles and Applications of Thermal Analysis*. Oxford: John Wiley & Sons.
- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 145-152.
- Hanssen, A., & Ericson, J. (2006). SCCmec in *Staphylococci*: genes on the move . *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8-20.

- Hernández-Gómez, C., Blanco, V., Mota, G., & Correa, A. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos. *Revista del Instituto Nacional de Salud-Biomédica*, 91-100.
- Howden, B., & Johnson, P. (2009). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology*, 99-139.
- Huh, A. J., & Know, Y. J. (2011). Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 128-145.
- Kanafani, Z., & Fowler, V. (2006). *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges form an Old Pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 182-193.
- Lowy, F. (2003). Antimicrobial Resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Clin Invest*, 1265-1273.
- Naimi, T., Ledell, K., Sabeti, K., & Borchardt, S. (2003). Comparasion of community- and health careassociated methicillin-resistant *Shaphylococcus aureus* infection. *JAMA*, 2976-2984.
- OMS. (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra, Suiza.
- OMS. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio . Ginebra, Suiza.
- Perazzi, B., Camacho, M., Bombicino, K., Flores, Z., Vay, C., & Famiglietti, A. (2010). *Staphylococcus aureus*: nuevos y antiguos antimicrobianos. *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 42: 199-202.
- Red Nacional de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud. (2009). *Estado del arte de la resistencia bacteriana y la vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas al cuidado de la salud en Colombia* . Bogotá: Ministerio de la Protección Social. República de Colombia .
- Salamanca, C. (2007). *Estudio de propiedades fisicoquímicas de polielectrolitos aniónicos en solución como potenciales reservorios de sustratos farmacológicos*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. En U. d. República, *Temas de Bacteriología y Virología médica* (págs. 631-647). Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR.
- Sherman, H. (1997). Infrared Spectroscopy. En Prentice Hall, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Arlington: Prentice Hall.

- Shore, A., Rossney, A., & Keane, C. (2003). Seven novel variants of the *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their mec regions. *Pathology*, 336-343.
- Sigma-Aldrich®. (2016). *Poly(isobutylene-alt-maleic anhydride)*. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/531278?lang=en&region=CO>
- Silver, L. (2011). Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 71-109.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Ciudad de Mexico: CENGAGE learning.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (1992). *Principios de análisis instrumental*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana de España S.A.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2):116-129.
- Suriñach, S., Baro, M., Bordas, S., Clavaguera, N., & Clavaguera-Mora, M. (1992). La Calorimetría diferencial de Barrido y su Aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31(1), 11-17.
- Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2002). Resistencia bacteriana. *Universitas Médica*, Vol. 43: 91-96.
- Thomas, J. (1983). Chemistry of Excitation at Interfaces. *American Chemical Society*.
- Vaez, H., Tabaraei, A., Moradi, A., & Ghaemi, E. (2011). Evaluation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Golestan province-north. *African Journal of Microbiology Research*, 432-436.
- Velásquez-Meza, M. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. *Salud Pública México*, 381-387.
- Zana, R., & Benrraou, M. (2000). *Journal of Colloid and Interface Science*, 286-289.



### 3. ANEXOS

#### 3.1. Metodología para la preparación de reactivos y materiales

##### 3.1.1. Preparación de agar nutritivo marca Merck® (solubilidad 20 g/L)

1. Pesar 4,0 g de agar marca Merck® ( 5,6 g si es agar Scharlau®) en polvo
2. Disolverlo en 200 ml de agua desionizada en un frasco Shott con capacidad para 500 ml
3. Calentar y agitar constantemente esta solución hasta que este translúcida
4. Esterilizar en autoclave por 15 minutos (45°C- 50°C)
5. Verter el agar líquido en cajas Petri estériles y dejar enfriar
6. Conservar estas placas en una nevera a 4°C

##### 3.1.2. Preparación de solución salina estéril al 0,85% para inóculo

1. Pesar 850 mg de NaCl y disolver con 100 ml de agua desionizada tipo 2
2. Esterilizar la mezcla por 15 minutos (121°C)
3. Almacenar a temperatura ambiente o en nevera a 4°C

##### 3.1.3. Preparación del inóculo desde la cepa criopreservada

1. Antes de iniciar el ensayo, se debe descongelar la suspensión madre de las cepas bacterianas inmediatamente antes de su uso
2. Con un asa estéril tomar los microorganismos del caldo descongelado (alícuotas) y sembrarlos en una agar nutritivo a 37°C por un día
3. Luego de obtener las colonias, se toman las colonias suficientes y se suspenden en un tubo de ensayo con solución salina al 0,85% (aprox. 1 ml)
4. Agitar la solución anterior en vórtex y leer la absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro UV/VIS y asegurar la absorbancia entre 0,086 y 0,095  
OJO: Tener cuidado con la producción de burbujas que puedan aumentar la absorbancia. Se recomienda que la absorbancia se ajuste primero a 0,1 y dejar pasar 1 minuto hasta que llegue a un valor estable en el rango establecido. La lectura se realiza luego de agitar en el vórtex.  
En caso de ajustar el valor de absorbancia, agregar más colonias (cuando el valor es menor) o diluir con solución salina al 0,85% (cuando el valor es mayor). Se recomienda es obtener un valor mayor a 0,1 y posteriormente diluir.
5. Luego de ajustar el inóculo, preparar 9,9 ml de CAMHB. Dicho caldo contiene 11 ml, por lo que se deben sacar 1100 µl para obtener 9900 µl de caldo

6. Agregar 100  $\mu\text{l}$  del inóculo preparado en los 9900  $\mu\text{l}$  de caldo CAMHB para lograr un inóculo de 10 ml ( $5 \times 10^5$  UFC/mL)

#### **3.1.4. Preparación de solución de ampicilina trihidrato de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$**

1. Pesar 102,4 mg (0,1024 g) de ampicilina trihidrato en un erlenmeyer de 150 mL (si la potencia del antibiótico no es 100%, realizar los cálculos correspondientes).
2. Disolver la ampicilina trihidrato con 100 mL de agua desionizada tipo 2 y mezclar hasta obtener una solución translúcida (solución madre de ampicilina trihidrato de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
3. Para la solución de ampicilina trihidrato de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : Pesar 64 mg (0,064 g) de ampicilina trihidrato en un erlenmeyer de 150 mL y disolverlo en 100 mL de agua desionizada tipo 2, (solución madre de ampicilina trihidrato de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), luego tomar 1 mL de la solución madre y llevarlos a 10 mL de agua destilada). (Solubilidad ampicilina So: 1g /90 mL de agua a 25°C)

#### **3.1.5. Preparación de la solución polimérica de la sal sódica del poli (ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4 de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$**

1. Pesar 10,24 mg de la sal sódica PAM-4 en un erlenmeyer de 150 mL
2. Disolver el polímero con 100 mL de agua estéril y mezclar hasta obtener una solución translúcida (solución madre del polímero de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
3. Para la solución de polímero 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : Pesar 64 mg (0,064 g) de la sal sódica PAM-4 en un erlenmeyer de 150 mL y disolverlo en 100 mL de agua estéril, (solución madre de ampicilina trihidrato de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), luego tomar 1 mL de la solución madre y llevarlos a 10 mL de estéril)

#### **3.1.6. Preparación de los complejos de asociación a temperatura ambiente**

1. Preparar la solución del polímero como se describe anteriormente
2. Pesar 6,4 mg (0,0064 g) de ampicilina trihidrato y agregarlo a la solución anterior (dicha solución debe estar a temperatura ambiente para evitar la degradación de la ampicilina)
3. Agitar en el vortex para facilitar la disolución de la ampicilina
4. Dejar a temperatura ambiente (25°C) por 12 horas (24 y 48 horas)

### 3.1.7. Preparación de los complejos de asociación a 0°C

1. Repetir el procedimiento anterior
2. Dejar la solución en la nevera a 6°C por 12 horas (24 y 48 horas)

### 3.2. Prueba de microdilución en caldo

1. Agregar 50 µL de caldo CAMHB en las columnas 2 -12 , exceptuando la columna 11 que se agregan 100 µL de caldo CAMHB (control negativo)
2. Agregar 100 µL de la solución del tratamiento (antibiótico, polímero, antibiótico: polímero) en la 1 columna (cabe mencionar que la preparación del tratamiento se debe realizar a la concentración específica, cuya dilución a la mitad de como resultado la concentración que se desea como la inicial en la placa.
3. Realizar las diluciones dobles seriadas en las columnas 1 – 10, pasando 50 µL de columna 1 a la columna 2 y así seguidamente hasta completar las 10 columnas, agitando siempre los pozos, antes de realizar la transferencia con la micropipeta.
4. Realizar la siembra de 50 µL del inóculo desde la columna 1 – 12, excepto la columna 11 (control negativo). Se obtiene un volumen total por cada pozo de 100 µL
5. Revisar si no hubo transferencia de los líquidos de una columna a otra o en la siembra.
6. Incubar la placa a 35°C durante 18 a 20 horas
7. Realizar la inspección visual de la placa, si se observa un precipitado de color cremoso o turbidez en los pozos hubo crecimiento bacteriano (prueba positiva). Si se observa un el pozo translúcido y sin precipitado significa que no hubo crecimiento bacteriano (prueba negativa)

### 3.3. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias de los ensayos realizados en la experimentación

Tabla 12. Ensayo 1

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 25923</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	16
<b>PAM-4Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	9	16	0	16
<b>P: A 12h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	14	16	0	16
<b>P: A 24h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	15	16	0	16
<b>P: A 24h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	16
<b>P: A 48h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	15	16	0	16
<b>P: A 48h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	15	16	0	16

**Tabla 13. Ensayo 2**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 29213</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	2	15	16	16	16	0	16
<b>PAM-4Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	1	9	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	1	10	14	16	16	0	16
<b>P: A 24h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	3	10	13	16	16	0	16
<b>P: A 24h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	4	9	14	16	16	0	16
<b>P: A 48h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	3	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 48h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	3	16	16	16	16	0	16

**Tabla 14. Ensayo 3**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 43300</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	8	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>PAM-4Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	2	15	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	5	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 24h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	3	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 24h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	2	15	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 48h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	3	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 48h (30°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	8	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16

**Tabla 15. Ensayo 4**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 25923</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	16
<b>PAM -18Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	16

**Tabla 16. Ensayo 5**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 25923</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	16
<b>Eudragit E-100</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	8	16	0	16

**Tabla 17. Ensayo 6**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 29213</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	2	15	16	16	16	0	16
<b>PAM-18Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	16

**Tabla 18. Ensayo 7**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 29213</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	2	15	16	16	16	0	16
<b>Eudragit E-100</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	0	16



**Tabla 19. Ensayo 8**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 43300</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	8	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>PAM-18Na</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	0	2	16	16	16	16	16	16	16	0	16

**Tabla 20. Ensayo 9**

<b>Cepa <i>S. aureus</i> ATCC® 43300</b>											
<b>Ampicilina</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	8	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>Eudragit E-100</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16
<b>P: A 12h (-13.4°C)</b>											
<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>C (-)</b>	<b>C(+)</b>
0	3	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16