

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL  
POLÍMERO CATIÓNICO CLORHIDRATO DE EUDAGRIT RL-PO ASOCIADO A  
AMPICILINA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.**

**Ángel David García Quiñónez**

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

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL  
POLÍMERO CATIÓNICO CLORHIDRATO DE EUDAGRIT RL-PO ASOCIADO A  
AMPICILINA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.**

**Ángel David García Quiñónez**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**ASESOR: ANDRÉS FELIPE DÁVALOS, M.Sc  
CO-ASESOR: CONSTAIN SALAMANCA, Ph.D**

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

**Aprobado Por:**

---

**Nombre correspondiente**  
**Evaluador**

---

**Nombre correspondiente**  
**Evaluador**

---

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

---

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

**Santiago de Cali, 6 de Enero de 2016**

## **Agradecimientos**

En primer lugar a mis padres, maestros de la vida, que han sido testigos de cada paso que he dado a través de ella, haciendo posible y real cada uno de mis sueños y anhelos; junto a mi familia y especialmente mi madrina que, desde el día uno, ha prestado toda su disposición y cariño para que alcance todas mis metas. Aun así, este logro no habría sido posible cumplirlo sin la disposición que han puesto han puesto todos y cada uno de los profesores, en su labor de enseñanza, aquellos con los que he tenido la oportunidad de cursar materias y aquellos que me han prestado apoyo en los diferentes ámbitos académicos. Especialmente a mis tutores que depositaron su confianza en mí para llevar a cabo este proyecto, que cierra una etapa más en mi vida, dándole paso a grandes aspiraciones, sueños y logros por cumplir.

Ángel David García Quiñónez

## Tabla de contenido

Contenido de Tablas .....	6
Contenido de Imágenes .....	9
Resumen .....	10
Abstract .....	11
1. Introducción .....	12
2. Descripción del Proyecto .....	14
2.1. Pregunta de investigación y planteamiento del problema .....	14
2.2. Marco Teórico y Estado del Arte .....	16
2.2.1. Antecedentes .....	16
2.2.2. Resistencia bacteriana, una problemática emergente. ....	17
2.2.3. El <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	18
2.2.4. Terapia antibiótica con betalactámicos. ....	19
2.2.5. Mecanismos de Resistencia bacteriana a betalactámicos. ....	19
2.2.6. Implementación de matrices poliméricas asociadas a antibióticos. ....	21
2.3. Objetivos.....	24
2.3.1 Objetivo general .....	24
2.3.2 Objetivos específicos .....	24
2.4 Metodología Propuesta.....	24
2.4.1 Materiales .....	25
2.4.2. Métodos .....	25
2.5. Resultados.....	32
2.6. Discusión .....	39
2.7. Conclusiones .....	52
2.8. Recomendaciones .....	53
3. Referencias.....	54
Anexos.....	58
Anexo 1.....	58
Anexo 2.....	60

## Contenido de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos de estudio en las pruebas de sensibilidad por microdilución en caldo usando cepas de <i>S. aureus</i> atcc® 25923, atcc® 29213 y atcc® 43300. ....	26
<b>Tabla 2.</b> Diagrama de la placa con tratamiento en columna 1, las concentraciones utilizadas serían las más altas estipuladas en pruebas de susceptibilidad según los estándares del CLSI, las cuales son: 512 µg/mL y 32µg/mL. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25293 con el tratamiento: ampicilina. Resultado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	33
<b>Tabla 4</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina. Resultado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	33
<b>Tabla 5</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina. Resultado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	33
<b>Tabla 6</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: polímero. ....	33
<b>Tabla 7</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: polímero. ....	34
<b>Tabla 8</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: polímero. ....	34
<b>Tabla 9</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL. ....	34
<b>Tabla 10</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 22923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL. ....	34
<b>Tabla 11</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL. ....	35
<b>Tabla 12</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL. ....	35
<b>Tabla 13</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL. ....	35

<b>Tabla 14</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.....	35
<b>Tabla 15</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL.....	35
<b>Tabla 16</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.....	36
<b>Tabla 17</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.....	36
<b>Tabla 18</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	36
<b>Tabla 19</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:0,2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	36
<b>Tabla 20</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	37
<b>Tabla 21</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	37
<b>Tabla 22</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	37
<b>Tabla 23</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	37
<b>Tabla 24</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se	

determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	38
<b>Tabla 25</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	38
<b>Tabla 26</b> Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27. ....	38
<b>Tabla 27</b> Concentraciones correspondientes a cada columna de los ensayos con concentración inicial de 32µg/mL. ....	38
<b>Tabla 28</b> Compilación de resultados CIM según la cepa de <i>S. aureus</i> correspondiente y el tratamiento evaluado. ....	39
<b>Tabla 29</b> Características cepas de <i>S. aureus</i> estudiadas. (CLSI, 2009) .....	40
<b>Tabla 30</b> Valores CMI, para ampicilina, de referencia para las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas. ....	45



## Contenido de Imágenes

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la ampicilina .....	23
<b>Figura 2.</b> Estructura química del copolímero Eudragit® RL-PO.....	23
<b>Figura 3</b> Gráfico titulación potenciométrica (por triplicado) de Eudragit® RL-PO, para la determinación de grupos dimetilaminoetil (DMAE) ionizables.....	32
<b>Figura 4</b> Gráfico titulación potenciométrica (por triplicado) de Eudragit® RL-PO, para la determinación de ácido metacrílico en solución acuosa.....	32
<b>Figura 5</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	42
<b>Figura 6</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	43
<b>Figura 7</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	44
<b>Figura 8</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 32µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	46
<b>Figura 9</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 29213, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 32µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	48
<b>Figura 10</b> Análisis probabilístico de supervivencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 43300, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 32µg/mL Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento. La proporción “PA12” hace referencia a la proporción 1:2. ....	49

## Resumen

Debido a los resultados obtenidos anteriormente en el Grupo de Investigación en Fisicoquímica Farmacéutica -GIFF- con matrices poliméricas de tipo anfifílico como el PAM-18Na<sub>2</sub> (Barajas, 2013), donde se logró disminuir la concentración mínima inhibitoria del antibiótico ampicilina trihidrato hasta cuatro veces con la adición del polímero en cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* en relación con el antibiótico solo; en este proyecto se evaluó el efecto antimicrobiano producido por el polímero Eudragit® RL-PO asociado a ampicilina trihidrato en tres cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923, 29213 y 43300), para lo cual se utilizó la prueba de sensibilidad a antibióticos de microdilución en caldo, logrando determinar el efecto antibiótico de la ampicilina, el polímero y los complejos ampicilina-polímero en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 1:2) determinando el efecto que ejerce el material polimérico cuando se asocia al antibiótico betalactámico.

Los resultados obtenidos corresponden a la concentración mínima inhibitoria para cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente para cada cepa evaluada, demostrando con el tratamiento correspondiente a ampicilina que las cepas de *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* ATCC® 43300 presentan resistencia a antibióticos betalactámicos con una CMI de 8µg/mL y 16µg/mL correspondientemente; y la cepa sensible *S. aureus* ATCC® 25923 tuvo una CMI de 0,5µg/mL, lo cual corrobora la información obtenida del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y otros investigadores, que han trabajado anteriormente con estos microorganismos, respecto a la resistencia de estas tres cepas frente a antibióticos betalactámicos.

Finalmente en la evaluación de los tratamientos de asociación antibiótico: polímero se logró reducir la CMI un 50% en las cepas de *S. aureus* ATCC® 25923 y 43300; y cuatro veces en la cepa ATCC® 29213, lo que hace que estos complejos de asociación no haga susceptibles las cepas resistentes (ATCC® 29213 y 43300), según los criterios del CLSI.

## Abstract

Due to the results obtained previously in Physical Chemistry Research Group Pharmaceutical -GIFF- with amphiphilic polymer matrices such as PAM-18Na2 (Barajas, 2013), where it was possible to reduce the minimum inhibitory concentration of the antibiotic ampicillin trihydrate up to four times the addition of polymer resistant strains of *Staphylococcus aureus* in relation to the single antibiotic; in this project the antimicrobial effect of the polymer Eudragit® RL-PO associated with ampicillin trihydrate in three strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC ® 25923, 29213 and 43300), for which the sensitivity test was used to antibiotics was assessed microdilution broth, achieving determine the antibiotic effect of ampicillin, the polymer and the ampicillin-polymer complexes at different ratios (1: 1, 1: 2 and 1: 2) determining the effect exerted by the polymer material when it is associated with the beta-lactam antibiotic .

The results correspond to the minimum inhibitory concentration for each of the above mentioned treatments for each strain evaluated, demonstrating the corresponding treatment ampicillin strains of *S. aureus* and *S. aureus* ATCC® 29213 ATCC® 43300 are resistant to antibiotics lactams with a MIC of 8µg / mL and 16µg / mL correspondingly; and the sensitive strain *S. aureus* ATCC® 25923 0.5µg had a MIC / mL, which corroborates the information obtained from Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) and other researchers who have worked with these microorganisms, regarding the resistance of these three strains against beta-lactam antibiotics.

Finally in assessing antibiotic treatments association: polymer MIC was reduced by 50% in strains of *S. aureus* ATCC® 25923 and 43300; and four times in the ATCC® 29213 strain, which makes these complexes association do not susceptible resistant strains (ATCC ® 29213 and 43300), according to CLSI criteria.

## 1. Introducción

En el siglo XX, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, se llegó a pensar que la problemática de salud generada por enfermedades infecciosas a nivel mundial sería resuelta. Pasados 6 años de su aplicación en práctica clínica este antibiótico perdió vigencia en el tratamiento de infecciones por Estafilococo. Este microorganismo desarrolló una enzima, llamada betalactamasa, que degrada el núcleo betalactámico de la penicilina y sus derivados (Echeverría & Iglesias, 2003), lo que encendió de nuevo las alarmas por el riesgo a la salud que generan las enfermedades infecciosas, en este caso producidas por microorganismos resistentes, generando un problema de salud pública global.

El problema radica en que las enfermedades infecciosas producidas por microorganismos con resistencia a antibióticos, no pueden ser tratadas con la terapia farmacológica de primera elección, es decir con antibióticos de primera línea, de bajo costo y efectos adversos mínimos o de menor relevancia como es el caso de la mayoría de antibióticos betalactámicos, como la ampicilina (el cual fue el fármaco empleado en esta investigación, por ser uno de los fármacos que han entrado en desuso a causa de esta problemática). El desarrollo de la resistencia por parte de los microorganismos conlleva a que la terapia sea más agresiva no sólo con el patógeno si no con el paciente al usar fármacos de mayor riesgo, altas dosis y/o terapias prolongadas, generando un aumento de costos de los tratamientos y de las estancias hospitalarias, llegando a un costo anual, en los Estados Unidos, entre 100 millones y 30 billones de dólares (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001)

Uno de los patógenos más estudiados y que genera una gran cantidad de infecciones nosocomiales y ambulatorias es el *S. aureus*, una bacteria Gram positiva que puede causar infecciones de piel, anexos cutáneos y tejidos blandos, otitis, osteomielitis, artritis, neumonía y sepsis (Pérez, 1998), pero el tratamiento antibiótico ha sido limitado a causa de la resistencia que ha adquirido este microorganismo, llegando a cifras mayores al 90% de las cepas aisladas, tanto extra como intrahospitalarias. No obstante, estas cepas siguieron mutando y adquiriendo resistencia no sólo a antibióticos betalactámicos sino a múltiples antimicrobianos como: penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas ocasionando la limitación en las alternativas terapéuticas para su tratamiento. Esta resistencia, que puede aparecer en casi el 20% de las cepas aisladas, ha generado gran preocupación en la comunidad científica por la escasez de tratamientos y el aumento de enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos resistentes (Pérez, 1998)

Tomando conciencia de la problemática de salud pública generada por las enfermedades infecciosas producidas por microorganismos resistentes como

*Staphylococcus aureus*, el Grupo de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica –GIFF– de la Universidad Icesi, ha dedicado una de sus líneas de investigación al mejoramiento de las propiedades físicoquímicas, microbiológicas y biofarmacéuticas de antibióticos betalactámicos, asociándolos a diferentes matrices poliméricas capaces de generar una protección para el antibiótico sobre los mecanismos de resistencia bacteriana, logrando así recuperar fármacos, como es el caso de la ampicilina, que actualmente han entrado en desuso en la práctica clínica por su baja efectividad contra microorganismos resistentes, como se mencionó anteriormente.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal la evaluación del efecto antimicrobiano producido por el antibiótico betalactámico ampicilina asociado al polímero Eudragit® RL-PO sobre cepas resistentes y sensibles de *S.aureus* (ATCC® 25923, 29213 y 43300). Empleando la metodología de microdilución en caldo para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico, del polímero y de los complejos de asociación (antibiótico-polímero) logrando determinar si este ejerce un efecto bioprotector para el antibiótico en estudio, que logre mejorar su efectividad frente a las cepas resistentes de las bacterias ya mencionadas.

Es necesario mencionar que este trabajo se enmarca dentro del contexto de un macro-proyecto del GIFF de la Universidad Icesi, cuyo objetivo es la búsqueda de matrices poliméricas con potencial uso en el ámbito farmacéutico como vehículo de fármacos antimicrobianos. De esta manera, el presente estudio proporciona información sustanciosa sobre el Eudragit® RL-PO como posible vehículo farmacológico que actúe como reservorio y ejerza un efecto bioprotector sobre el antibiótico estudiado.

## 2. Descripción del Proyecto

### 2.1. Pregunta de investigación y planteamiento del problema

En la década de los 50's se inicia el auge en la investigación de moléculas antibióticas, iniciando con la penicilina descubierta por Fleming, y se llegó a pensar que todas las infecciones bacterianas serían tratables con éxito. (Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez, & Hernández, 2009) Pero esta idea fue rápidamente descartada debido a que los microorganismos fueron capaces de adaptarse y generar resistencia a estos compuestos químicos, poco tiempo después de la implementación de la terapia antimicrobiana, de esta manera se puede decir que la resistencia bacteriana es un fenómeno creciente definido como la refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico. Esto ha sido generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de antibióticos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en la terapia farmacológica (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001)

Actualmente uno de los grandes problemas de salud a nivel mundial obedece a las enfermedades de tipo infeccioso, las cuales son causadas por microorganismos capaces de generar una patología en el paciente, ya sea adquiridas previamente a su ingreso al hospital o adquiridas durante su estancia en la institución (intrahospitalaria o nosocomiales) y el problema se hace creciente cuando se trata de un microorganismo resistente, para los cuales los tratamientos farmacoterapéuticos efectivos cada vez escasean más y su tratamiento se dificulta.

“En Colombia, los primeros informes sobre resistencia se reportaron en 2001. El porcentaje de resistencia variaba según el microorganismo y el antibiótico. Por ejemplo, para ciprofloxacina en unidades de cuidados intensivos en Bogotá para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) era del 60,0- 63,0%; para *Staphylococcus coagulasa negativa* (*S. coagulasa negativa*) del 47,0-58,0% y para *Enterococcus* sp. del 25,0- 44,0%; de igual forma, en hospitales de tercer nivel se encontró resistencia del 52,0% para *S. aureus* y del 73,0% para *S. aureus* coagulasa negativa” (Moncayo, 2014).

No obstante, la industria farmacéutica ha dejado a un lado la innovación en el campo de los antibióticos que son utilizados para el tratamiento de dichas enfermedades, y ha optado por la investigación en otro tipo de fármacos por la remuneración económica que es mucho más representativa. En 1998 había en el mercado mundial 20 nuevos antibióticos. En 2011 había únicamente 4 nuevos antibióticos, es decir una disminución de un 80% en la disponibilidad de nuevos antibióticos. Abbot, Merck y Roche hacen parte de las industrias que han dejado

su interés por este tipo de fármacos y quedan únicamente 5 laboratorios activos en investigación y desarrollo de nuevos antibióticos: Astra-Seneca, GlaxoSmith Kline, Novartis, Sanofi-Aventis y Schering-Plow (Moncayo, 2014)

En la actualidad se cuenta con cepas de organismos patógenos multiresistentes, la comunidad científica en general se ha preocupado por generar estrategias efectivas para el control de la resistencia bacteriana desde diferentes flancos. La investigación farmacológica se ha encaminado hacia la obtención de nuevos agentes antimicrobianos, entre los cuales se encuentran fluoroquinolonas, los ketólidos everninomicinas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los recursos necesarios para la investigación y desarrollo de antibióticos oscilan entre US\$100 millones - US\$350 millones (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001) y su remuneración para los laboratorios no es tan alta, por lo cual se ha optado por buscar otras metodologías basadas en el mejoramiento de grupos de antibacterianos existentes, entre los cuales actualmente se encuentra el uso de fármacos betalactámicos asociados a inhibidores de los betalactamasas (Barcelona, Marín, & Stamboulian, 2008)

Por otra parte, estudiando las diferentes vías de resistencia ha surgido la idea de implementar la utilización de vehículos matriciales para este tipo de fármacos, que permita inhibir los mecanismos de defensa desarrollados por los microorganismos, logrando obtener vehículos reservorios que cumplan con el objetivo de disminuir la concentración mínima inhibitoria. Por ejemplo, en bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos, por producción de enzimas betalactamasas, con este método se lograría promover nuevamente el uso de antibióticos que han entrado en desuso debido a su poca efectividad, como es el caso de la mayoría de betalactámicos. Este modelo de vehiculización se encuentra en estudio y ha tenido un alto impacto en esta área de investigación, algunos de los ejemplos obedecen a asociaciones fármaco-polímero como: nanopartículas, liposomas, polímeros entrecruzados, andamios y nanocontenedores con los cuales se han obtenido resultados interesantes en cuanto al aumento de la efectividad del fármaco en experimentos a nivel *in vitro* o en modelos animales, haciendo que este proyecto tenga un alto impacto no sólo para el grupo de investigación de fisicoquímica farmacéutica de la universidad Icesi sino a nivel global.

Finalmente, el propósito principal de este proyecto de investigación es generar información para complementar el estudio relacionado con la Evaluación del efecto antimicrobiano producido por el polímero Eudragit® RL-PO asociado a ampicilina en cepas sensibles y resistentes de *S. aureus*, si genera una acción bioprotectora al fármaco ampicilina frente a microorganismos que presenten resistencia a este antibiótico betalactámico. De igual forma, se espera contribuir en estudios de preformulación de nuevas formas farmacéuticas que sean de utilidad en la disminución de los inconvenientes asociados a la resistencia bacteriana, un problema de salud pública creciente y de interés mundial logrando obtener

resultados que ayuden a establecer la proporción adecuada de matriz:fármaco que puedan potenciar el efecto antibiótico, disminuyendo la concentración mínima inhibitoria del fármaco en cepas de microorganismos resistentes al mismo.

## **2.2. Marco Teórico y Estado del Arte**

### **2.2.1. Antecedentes**

Las bacterias son una parte integral del planeta, se encuentran en todas partes, en el medio ambiente, en la piel, membranas mucosas y en el tracto intestinal de los seres humanos y animales (American Academy of Microbiology, 1999). Algunas de ellas pueden ser inofensivas o proporcionar algún beneficio para sus huéspedes y proporcionar nutrientes o protección contra patógenos, mediante la limitación de la capacidad de las bacterias patógenas para colonizar al huésped (American Academy of Microbiology, 1999). Otras por el contrario generan infecciones y daños a la salud, por tal motivo, uno de los adelantos médicos más importantes del siglo XX fue el descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming, acontecimiento que generó gran expectativa, ya que se supuso que este sería el tratamiento de cualquier tipo de infección bacteriana (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001). Durante esta misma época se dio el auge de la investigación y desarrollo en moléculas con actividad antibiótica, por la elucidación de las interacciones fármaco-diana y drogas con modificaciones moleculares, pero con una misma base estructural llamada núcleo (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010), tanto así que para 1998 había en el mercado mundial 20 nuevos antibióticos. (Moncayo, 2014)

Este tipo de antibióticos, derivados de la penicilina descubierta por Fleming, poseen un mismo núcleo, un anillo betalactámico, de ahí que su denominación común sea antibióticos betalactámicos, los cuales actúan interfiriendo en la síntesis del peptidoglucano (PG) de la pared celular bacteriana. Su diana farmacológica son las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), las cuales poseen dos dominios con actividades diferentes en la síntesis de la pared celular: un dominio glicosiltransferasa, encargado del alargamiento de las cadenas de glicano y un dominio con actividad transpeptidasa, encargada de la interconexión de cadenas de glicano por entrecruzamiento peptídico mediado por la enzima D-alanil D-alanil carboxipeptidasa, la cual es inhibida irreversiblemente por este tipo de antibióticos al acilar la serina en el sitio activo transpeptidasa de las PBPs. La pérdida de esta actividad catalítica deteriora la capacidad de la bacteria para controlar la integridad de su pared celular, lo que genera finalmente la lisis celular. (Llarrull, Fisher, & Mobashery, 2009) (Rang & Dale, 2008) (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001)

Sin embargo, estos antibióticos han sido ampliamente utilizados desde su descubrimiento hasta el día de hoy, siendo los más prescritos, tanto en atención



primaria como en hospitalización (Suárez & Gudiol, 2009), pero su efectividad ha disminuido en el tratamiento de las enfermedades infecciosas debido a que las bacterias han generado resistencia a este tipo de moléculas. La resistencia se define como la capacidad innata o adquirida de un microorganismo, para permanecer refractario en presencia de un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable, de tal forma que los tratamientos farmacoterapéuticos convencionales no son efectivos y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. (OMS, 2013)

### **2.2.2. Resistencia bacteriana, una problemática emergente.**

Este fenómeno se desarrolla como una consecuencia natural de la capacidad de la población bacteriana a adaptarse, potenciado por el aumento del uso de agentes antimicrobianos, causando la presión selectiva en estos microorganismos generando mecanismo de resistencia cada vez más complejos y difíciles de controlar. (American Academy of Microbiology, 1999). Por lo que la comunidad científica y la industria farmacéutica se ha visto en la labor de proporcionar soluciones a esta problemática, ya sea encontrando nuevas moléculas activas con actividad antimicrobiana o realizar investigación sobre nuevos modelos de formulación de los antibióticos para inhibir el mecanismo de resistencia que tengan las bacterias contra el antibióticos, lo cual obedece al aporte investigativo que puede generar este proyecto.

Actualmente esto ha generado un problema creciente de salud pública debido a que las infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI) están siendo causadas por microorganismos multirresistentes, que afectan a más del 20% de los pacientes, con una tasa de mortalidad de más del 30% y aumentado los costes de tratamiento de manera importante para las Instituciones hospitalarias. El problema aumenta debido a que las infecciones se están presentando también a nivel ambulatorio, es decir los pacientes contraen la bacteria en sus casas, sitio de trabajo y del medio ambiente, lo que genera una mayor preocupación por parte de las entidades que investigan los casos como lo son GREBO, GRUVECO y CIDEIM (Molina, y otros, 2011)

El panorama no es muy alentador ya que los microorganismos cada vez adquieren mecanismos de resistencia más eficaces y la cantidad de antibióticos útiles es decreciente, por lo cual este problema ha tomado carácter global y la Organización Mundial de la salud Postuló “Ante el aumento inexorable de las infecciones por microorganismos resistentes, la escasez de nuevos antibióticos en desarrollo y el poco interés de la industria para invertir en I+D en este campo, se requieren soluciones innovadoras para detener el incremento de las infecciones por microorganismos resistentes. La crisis de salud global a causa de los microorganismos resistentes nos concierne a todos, ya que en un futuro podrían no encontrarse en el mercado, antibióticos efectivos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas”. Entre 2000 y 2012 el desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos por la agencia oficial de Estados Unidos (Food and Drug

Administration [FDA]) y la Unión Europea (European Medicines Agency [EMA]) se limitó a 4 moléculas nuevas por la FDA y 3 por la EMA. Una cantidad deficiente para lograr un control eficaz de los organismos multiresistentes. (Boucher, y otros, 2009) (Moncayo, 2014)

No obstante, es necesario aclarar que los microorganismos se encuentran en constante crecimiento y mutación, por lo cual, al estar en exposición a antibióticos cada vez de mayor espectro y con diferentes dianas farmacológicas, que se están utilizando para tratar las cepas resistentes, genera una presión Selectiva entre ellos y como consecuencia, terminan adquiriendo o generando resistencia también a estas nuevas moléculas antimicrobianas (Echevarria & Iglesias, 2003). Esto genera una mayor preocupación de las partes implicadas ya que este fenómeno constituye uno de los principales problemas de la atención hospitalaria dentro del sistema de atención en salud en Bogotá. La emergencia y diseminación de bacterias resistentes ha mostrado un impacto negativo en la morbi-mortalidad de los pacientes y en la utilización de recursos económicos (Colciencias, 2010), como se mencionó anteriormente.

En este proyecto se trabajará con el microorganismo *Staphylococcus aureus*, un coco Gram-positivo ampliamente estudiado, que generalmente se encuentra en forma de tétrada por su capacidad de dividirse en dos planos. Es un organismo aerobio, inmóvil que crece en agar sangre (SBA), caracterizado además por un color dorado de las colonias que se produce por pigmentos carotinoides y es responsable del nombre de la especie: "*aureus*". (Tang & Stratton, 2010).

### **2.2.3. El *Staphylococcus aureus*.**

Este microorganismo es un patógeno importante para el ser humano al ser capaz de causar gran variedad de infecciones tanto en individuos sanos como en inmunodeficientes. Generalmente se puede encontrar en la piel y las fosas nasales, facilitando la transmisión de infecciones en ambientes hospitalarios en los cuales no se sigan prácticas apropiadas higiene y control. (Cavaliere, Harbeck, McCarter, Sharp, & Rankin, 2005).

*Staphylococcus aureus* se ha encontrado como el principal agente causal de la mayoría de abscesos de partes blandas, produciendo lesiones inflamatorias con contenido purulento, el cual puede progresar a estructuras más profundas y diseminarse al llegar a torrente sanguíneo, produciendo la infección en cualquier lugar del organismo. Además, este microorganismo tiene la capacidad de producir toxinas que aumentan la severidad del proceso, aun cuando la cantidad de patógenos no sea alta (Echevarria & Iglesias, 2003).

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la resistencia a los antibióticos comúnmente usados está aumentando a nivel mundial. En el caso específico del *S. aureus* más del 90% presentan resistencia a la penicilina, el cual es el antibiótico de primera elección para tratar infecciones causadas por esta bacteria,

por lo cual, se prescribe vancomicina para tratar efectivamente las infecciones provocadas por *S. aureus* resistente. Sin embargo, se ha generado una preocupación por el reporte de casos de disminución de la susceptibilidad a vancomicina en varios países, con lo cual su tratamiento con este antibiótico también se vería ineficiente (Cavaliere, Harbeck, McCarter, Sharp, & Rankin, 2005).

#### **2.2.4. Terapia antibiótica con betalactámicos.**

La ampicilina es un antibiótico betalactámico semisintético de amplio espectro utilizada generalmente en otitis media, bronquitis, neumonía, gonorrea e infecciones urinarias. Igualmente ha sido utilizada para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas, como profiláctico tras una mordedura de animales y en general para tratamiento de infecciones por microorganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Su mecanismo de acción, al igual que los demás antibióticos betalactámicos, se fundamenta en la inhibición de la formación de la pared celular bacteriana, como ya se mencionó anteriormente (Rang & Dale, 2008).

Entre los antibióticos betalactámicos de primera elección para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos gram-positivos se encuentra la ampicilina, como se mencionó anteriormente, pero debido que este patógeno ha ido desarrollando resistencia a los antimicrobianos de un modo muy eficiente (Perazzi, y otros, 2010), este fármaco se ha tenido que utilizar en combinación con otros antibióticos o junto con inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y el sulbactam, que permiten la inactivación este tipo de enzimas producidas por estas bacterias Gram positivas (Barcelona, Marín, & Stambouljian, 2008). No obstante, este método novedoso que ha proporcionado una ventaja frente a formulaciones que contienen únicamente el antibiótico, no ha sido suficiente debido a que los organismos multiresistentes presentan diferentes mecanismos de resistencia, no únicamente la producción de enzimas betalactamasas (Rang & Dale, 2008).

#### **2.2.5. Mecanismos de Resistencia bacteriana a betalactámicos.**

Los diferentes mecanismos de resistencia que han sido estudiados en bacterias multiresistentes, pueden ser de dos tipos: natural (intrínseca) o adquirida, entre los cuales están:

- **Inactivación enzimática:** el mecanismo de inactivación es la hidrólisis del enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo, esta reacción se encuentra mediada por enzimas betalactamasas que según Ambler en 1980, pueden clasificarse en cuatro clases: A, B, C y D (Vignoli & Seija, 2006)

Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, se encuentran codificadas en plásmidos y su peso molecular oscila entre 25 y 30 kD.

Las de clase B requieren zinc para su actividad y por ello se consideran metalo-betalactamasas de codificación plasmídica y pueden ser inhibidas por EDTA, entre las que se encuentran las enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes.

Las que pertenecen a la clase C son codificadas en el cromosoma bacteriano y son inducibles por betalactámicos. En algunas especies, la región reguladora del gen ha desaparecido y la enzima se expresa constitutivamente.

Las enzimas de clase D corresponden a enzimas plasmídicas con actividad incrementada sobre oxacilina (OXA-1), son inhibidas por iones cloruros y de forma variable por ácido clavulánico o sulbactam. (Barcelona, Marín, & Stamboulia, 2008) (Vignoli & Seija, 2006) (Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2001)

- **Modificaciones en el sitio blanco:** Como se mencionó anteriormente, la diana farmacológica de los antibióticos betalactámicos son las PBPs, las cuales se codifican a nivel cromosómico y no en plásmidos. Sin embargo, los reguladores de su expresión sí pueden ser de origen plasmídico, generando la expresión de un gen alternativo que codifique una PBP distinta a la expresada normalmente, como por ejemplo en *S. aureus* metilino resistente, la expresión del gen *mecA* regula la expresión de una PBP alternativa PBP2' que es menos afín con la mayoría de antibióticos betalactámicos (Vignoli & Seija, 2006)

Otra alternativa es la formación de genes mosaico, los cuales incorporan fragmentos de material genético de otro microorganismo que se encuentra en los plásmidos, con lo cual se generan genes con secuencias constituidas tanto por la información preexistente, como por la adquirida. Un ejemplo de microorganismo que emplea este tipo de mecanismo de resistencia es el *S. pneumoniae* resistente a penicilina y las PBP modificadas de *Neisseria gonorrhoeae*, en las que se han encontrado homólogos con las PBP de *N. lactámica*. (Vignoli & Seija, 2006)

- **Alteraciones de la permeabilidad:** se pueden mencionar tres tipos.

**1. Alteraciones de las membranas bacterianas:** se da principalmente en organismos gramnegativos, donde la membrana externa es rica en lípidos e impermeable a sustancias hidrofílicas, de esta forma las moléculas no pueden

difundir a través de la membrana, únicamente podrían ingresar a la bacteria a través de porinas, de esta manera las moléculas de gran tamaño, como penicilina y vancomicina, son incapaces de pasar a través estas proteínas transmembrana. No obstante, la expresión de dichas porinas también es disminuida lo que reduce el flujo de llegada del antibiótico capaz de pasar a través de estas proteínas al espacio periplásmico. (Vignoli & Seija, 2006)

**2. Alteraciones en la entrada de antibióticos por transporte activo**, este es un mecanismo específico para aminoglucósidos. (Vignoli & Seija, 2006)

**3. Aumento de la salida de antibióticos**; este mecanismo afecta a diferentes grupos de antibióticos entre ellos: betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. En microorganismos Gram positivos la sobreexpresión de Bombas *efflux* NorA (familia MFS), una proteína transmembrana con función ATPasa en *S. aureus* metilino-resistente, también puede conferirle resistencia a otros antibióticos que son sustrato de la NorA como el cloranfenicol, ciprofloxacina y fluoroquinolonas. Los genes que codifican estas bombas *efflux* se localizan en el cromosoma o los plásmidos bacterianos, por lo cual pueden ser innatos o adquiridos. (Vignoli & Seija, 2006) (Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez, & Hernández, 2009).

#### **2.2.6. Implementación de matrices poliméricas asociadas a antibióticos.**

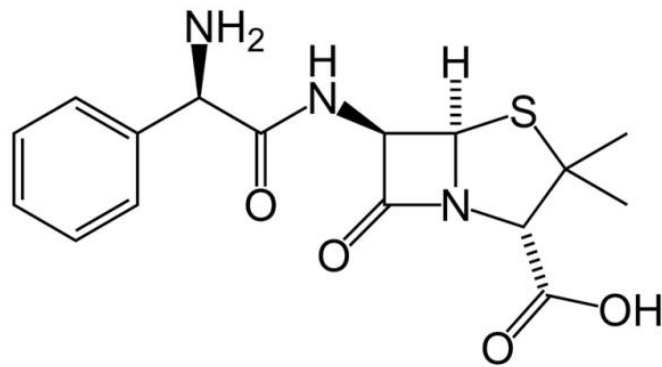
Con base en lo expuesto anteriormente respecto a los métodos de resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos, el GIFF ha propuesto un modelo basado en la utilización polímeros como vehículos farmacéuticos, los cuales pueden funcionar como un reservorio del fármaco, permitiendo inhibir estos mecanismos de resistencia. (Salamanca, 2007) En este orden de ideas, los sistemas poliméricos solubles en medios acuosos y con capacidad de contener o asociarse a diferentes agentes farmacológicos, como la ampicilina, confiriéndoles estabilidad de tipo químico y biológico, serían el modelo ideal para la realización de este proyecto, logrando resultados positivos. (Agredo & Florez, 2013)

Entre los sistemas macromoleculares que pueden poseer las características mencionadas anteriormente para la protección y mejoramiento de las características del fármaco asociado, se encuentran los sistemas poliméricos de tipo iónico, entre ellos la sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO, material polimérico que se empleará en los diferentes tratamientos a realizarse en la fase experimental de este proyecto. (Agredo & Florez, 2013)

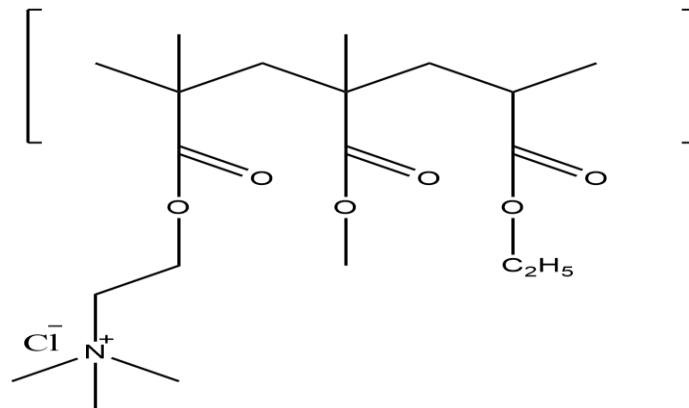
La sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO es un copolímero de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y un bajo contenido de éster de ácido metacrílico con grupos de sales de amonio. (Evonik Industries, 2015). Esta matriz polimérica presenta una baja solubilidad en medios acuosos, dependiente de pH, sin embargo estos

polímeros y sus similares Eudragit® RL-100, Eudragit® E100, han sido ampliamente utilizados por la industria farmacéutica en el diseño y formulación de formas farmacéuticas de liberación modificada, siendo vehículos de diferentes fármacos como lo son Aciclovir Amfotericina-B, daptomicina, acetazolamida, (Das, M.Pharma, Suresh, Desmukh, & M.Pharmc, 2010) (Oliveiraa H. d., Tavaresa, Nogueirasa, & Rieumonta, 2009) (Ferreira I. , y otros, 2015). Sin embargo, en este proyecto de investigación se utilizó la matriz polimérica Eudragit® RL-PO ya que en su estructura molecular contiene la sal de amonio, que puede generar interacciones de tipo electrostático entre este y la ampicilina, mientras que las otras matrices deben ser tratadas en medio ácido para conferirle esta característica, lo que puede generar hidrólisis en la molécula del polímero afectando su estructura.

Como antecedentes, en el GIFF se han realizado diferentes proyectos de investigación como el trabajo de grado realizado por Juan David Villada Morales “Obtención Y Caracterización Estructural Por Ftir De Los Materiales Ionoméricos Clorhidrato, Acetato Y Formiato De Eudragit® E-100 Con Diferentes Grados De Ionización”, donde se realizó la obtención y caracterización de polímeros modificados de Eudragit® E-100 mediante hidrólisis ácida (Villada, 2015). De igual forma, se cuenta con el proyecto de investigación realizado por Pamela Ágredo Sanín y Angélica María Flórez Rojas, donde se indagó sobre el diseño y formulación de potenciales formas farmacéuticas de antibióticos beta-lactámicos útiles frente a microorganismos resistentes, empleando el mismo principio de formación de complejos de asociación polimérica entre el antibiótico ampicilina trihidratada y el sistema polimérico Eudragit® E-100. (Agredo & Florez, 2013). Por último se han encontrado que estos polímeros de naturaleza catiónica como lo son las sales de Eudragit®, han demostrado cierta afinidad para formar complejos útiles en la formulación de formas farmacéuticas de liberación modificada, al crearse enlaces de puente iónico con principios activos que contienen protones ácidos en su estructura química. Este hecho aumenta las expectativas sobre obtener resultados positivos en la reducción de la CMI para las cepas resistentes de *S. aureous* en estudio, al trabajar con una molécula como la de la ampicilina que contiene dos hidrógenos ácidos en su estructura química, capas de formar enlaces con la matriz polimérica en estudio.(ver imagen 1, 2 y 3) (Quinteros, y otros, 2008)



**Figura 1.** Estructura química de la ampicilina



**Figura 2.** Estructura química del copolímero Eudragit® RL-PO

Finalmente, el propósito de este proyecto es evaluar el efecto *in vitro* que tienen los complejos de asociación del polímero con el antibiótico betalactámico ampicilina, sobre el crecimiento de tres cepas de *Staphylococcus aureus*. Para lo cual se emplearán las técnicas experimentales de pruebas de susceptibilidad según los estándares del CLSI.

## 2.3. Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano producido por el polímero Eudragit® RL-PO asociado a ampicilina en cepas sensibles y resistentes de *S. aureus*

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto *antimicrobiano in vitro* producido por el antibiótico (ampicilina) sobre las cepas de *S. aureus* evaluadas
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* producido por el polímero Eudragit RL-PO sobre las cepas de *S. aureus* evaluadas.
- Determinar el efecto antimicrobiano *In vitro* de la asociación antibiótico (ampicilina)- polímero Eudragit® RL-PO sobre las cepas de *S. aureus* evaluadas.
- Establecer el efecto ejercido por el polímero Eudragit® RL-PO en asociación con ampicilina en cepas sensibles y resistentes de *S.aureus*.

### Indicadores

1. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en cada uno de los experimentos realizados.
2. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos utilizando el lector de placas, para los diferentes tratamientos.

## 2.4 Metodología Propuesta

Este proyecto de investigación se desarrolló utilizando la infraestructura de laboratorios con la que cuenta la Universidad Icesi en el edificio L, específicamente los laboratorios donde se llevaron a cabo los procedimientos experimentales fueron: Laboratorio de Biotecnología (406L) y el Laboratorio del Grupo de Investigación en Fisicoquímica Farmacéutica (GIFF) ubicado en el quinto piso del mismo edificio.

La metodología que se implementó hace parte de una línea de investigación instaurada en el año 2013 por el GIFF, tiene como objetivo lograr la evaluación de la actividad antibiótica de la ampicilina asociada al material polimérico Eudragit® RL-PO en cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a antibióticos betalactámicos.



## 2.4.1 Materiales

Los materiales que se emplearon en el desarrollo de este proyecto son principalmente productos químicos y material biológico, además de los implementos o equipos tecnológicos para el trabajo con los mismos. Lo correspondiente a materiales químicos son: ampicilina trihidratada (Laboratorios Tecnoquímicas S.A.) y la sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO® de laboratorios Evonik. Por otra parte, el material biológico que será empleado corresponde a: cepas certificadas de *Staphylococcus aureus* con códigos ATCC®25923, ATCC®29213 y ATCC®43300. Los cuales fueron obtenidos en el año 2013 de la empresa comercializadora Microbiologics Inc®. Cabe resaltar que estos microorganismos han sufrido varios pases y han sido criopreservados a -80°C en el cuarto frío de la Universidad Icesi, procedimiento que llevaron a cabo los estudiantes que hicieron una parte de esta línea de investigación en ese tiempo. Para obtener información detallada sobre el procedimiento de criopreservación de las cepas, se dirige al lector a la tesis de pregrado de Stephany Barajas (Barajas, 2013). Además, incluidos dentro del material biológico utilizado se encuentran los medios de cultivo empleados para crecer las bacterias y realizar las prueba de microdilución en caldo, los cuales corresponden a agar nutritivo marca Merck® o Scharlau® que fue preparado según lo especificado por el proveedor en la etiqueta del producto; y caldo Mueller-Hinton (MH) marca Scharlau®.

## 2.4.2. Métodos

### 1. Preparación de reactivos y materiales:

Con el fin de evitar la contaminación o diseminación del microorganismo *S. aureus* en áreas o superficies utilizadas, así como el personal que hace uso de éstas, disminuyendo el posible impacto ambiental que se pudo generar por la realización de este proyecto, se llevó a cabo un manejo adecuado y seguro de las cepas bacterianas de estudio, procedimiento que se encuentra especificado de manera detallada en el procedimiento operativo estándar (POE) desarrollado por Alejandro Ortiz y Stephany Barajas, se dirige al lector al Anexo 2 de la tesis de pregrado de Stephany Barajas (Barajas, 2013).

Las cepas bacterianas de estudio corresponden a un patógeno que se encuentra clasificado como de grado 2 (OMS, 2005), debido a esto su manipulación se llevó a cabo bajo las recomendaciones de la OMS, en las cuales se estipula la aplicación de técnicas microbiológicas apropiadas, uso de ropa protectora, al igual que se recomienda su manipulación en cabinas de bioseguridad.

En cuanto a la metodología para la preparación de insumos y materiales que se emplearon para la realización de la prueba de microdilución en caldo, estos se

describen específicamente en el anexo 1, donde se encuentra de manera detallada el método de preparación de medios de cultivo, elaboración de las soluciones madre de antibiótico, polímero y de los complejos de asociación antibiótico-polímero. Además del estudio de estabilidad de la solución acuosa del polímero que fue preparada utilizando el ultrasonido (anexo 2).

Finalmente, se tuvo en cuenta la preparación previa de las herramientas que se utilizaron en el laboratorio, para la realización de las pruebas de susceptibilidad, como son: pinzas y material de vidrio; sometiénolas a un procedimiento de esterilización empleando el autoclave que posee la universidad Icesi, evitando así la contaminación de la prueba por el uso de material no estéril.

## 2. Pruebas de microdilución en caldo:

La técnica consiste en la siembra de placas de 96 pozos con diluciones dobles seriadas del tratamiento de estudio, ya sean: antibiótico, polímero o complejos de asociación, empleando una concentración fija de microorganismos, la cual fue de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL, la cual se consiguió realizando una dilución 1:20 a partir de la suspensión bacteriana ajustada al estándar de Mc Farland y Caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes (Cavaliere, 2005). Una vez realizada la siembra, las placas fueron incubadas a 35°C durante 18 a 20 horas, para posteriormente leer los resultados obtenidos.

La lectura de cada placa se realizó por inspección visual, determinando la formación de un precipitado color cremoso o turbidez en cada uno de los pozos, lo cual arrojaría como resultado positivo de crecimiento bacteriano. La prueba es negativa, determinando la inhibición de crecimiento, cuando el pozo se encuentra traslúcido y sin precipitado. Los tratamientos de estudio correspondientes a antibiótico, polímero o asociación fármaco:matriz se encuentran especificadas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos evaluados por la técnica de microdilución en caldo usando cepas de *S. aureus* ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300.

Ensayo	Tratamiento	Proporción	Concentraciones evaluadas (µg/mL)
1	Ampicilina trihidrato	-	32
2	Sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO.	-	512
3	Ampicilina trihidrato + sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO.	1:1	512 y 32
4	Ampicilina trihidrato + sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO.	2:1	512 y 32
5	Ampicilina trihidrato + sal de clorhidrato de Eudragit® RL-PO.	1:2	512 y 32

Los controles negativo y positivo, mencionados anteriormente, corresponden a las columnas 11 y 12 de todas las placas respectivamente y se componen de: El control negativo, contiene los componentes exceptuando el inóculo, es decir, únicamente tratamiento y caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes, lo cual garantizó que los reactivos no se encontraban contaminados en el momento de la siembra. El control positivo contiene el inóculo correspondiente, sembrado en caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes, lo cual dio garantía de que la bacteria se encontraba en la suspensión preparada y la siembra se realizó de manera correcta, al encontrar un crecimiento normal de la bacteria en el momento de la lectura de resultados.

Para la realización del procedimiento de la microdilución en caldo fue necesario tener en cuenta que, antes de iniciar la siembra de las placas, se tuvieran todos los implementos listos, las soluciones debidamente esterilizadas y diluidas a la concentración estipulada, ya que el procedimiento debe efectuarse completamente en no más 20 minutos, debido a que los inóculos frescos sólo duran este tiempo sin que se repliquen. Finalmente, es necesario aclarar que al referirnos a “columna” o “fila”, en la descripción del procedimiento, de la placa de 96 pozos, las columnas se enumeran de izquierda a derecha del 1 al 12 y las filas de arriba a abajo de A a H.

El procedimiento consistió específicamente en:

1. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de tratamiento antibiótico a la primera columna de la placa. Cabe mencionar que la preparación de la solución de antibiótico se debe realizar a la concentración específica, cuya dilución a la mitad dé como resultado la concentración que se desea como la inicial en la placa. Acto seguido, se deben agregar 50  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes –CAMHB– en las columnas de la 2 a la 12.
2. Realizar las diluciones dobles seriadas en las columnas 1 al 10, pasando 50  $\mu\text{L}$  de la 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.
3. Realizar la siembra de 50  $\mu\text{L}$  del inóculo desde la columna 1 hasta la 12, exceptuando la correspondiente al control negativo (columna 11). De esta manera se obtiene un volumen total por cada pozo de 100  $\mu\text{L}$ , sin incluir la columna 11 y 12, ya que únicamente tienen el tratamiento y el inóculo con el caldo, respectivamente, por ser los controles de la placa. Finalmente, se debe realizar una inspección visual para encontrar posibles fallas en la transferencia de los líquidos de una columna a otra o en la siembra, de ser así, se debe determinar si es posible realizar su corrección inmediata o realizar un nuevo procedimiento desde el paso 1.
4. La placa correctamente sembrada será incubada a 35°C durante 18 a 20 h. Para posteriormente leer los resultados obtenidos.

Es necesario especificar que cuando se realizó el procedimiento para los complejos de asociación, el volumen destinado a “tratamiento antibiótico”, 50 µL, obedece al tratamiento (antibiótico:matriz) correspondiente, garantizando que se conserve la cantidad total de la muestra en cada uno de los pozos de las diferentes columnas.

A continuación, se presenta un diagrama de la primera fila de la placa de 96 pozos. Una “X” indica que este componente hace parte del pozo. Cabe anotar que este diagrama permite mostrar de manera gráfica el contenido de cada una de las columnas, que se repetirá para todas las filas de la placa.

**Tabla 2.** Diagrama de la placa con tratamiento en columna 1, las concentraciones utilizadas serían las más altas estipuladas en pruebas de susceptibilidad según los estándares del CLSI, las cuales son: 512 µg/mL y 32µg/mL.

Componente	Diluciones dobles seriadas del “tratamiento”										C(-)	C(+)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Tratamiento</b> [µg/mL] V=50µL	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1		
<b>CAMHB</b> V=50µL		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Inóculo</b> V=50µL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X

### 3. Análisis estadístico

La lectura de las pruebas se hizo de forma cualitativa (inspección visual), se recopilaron los datos obtenidos, reportando como 1(uno), si había crecimiento bacteriano y 0 (cero) si había ausencia del mismo; se aplicó un método estadístico llamado logístico, el cual calcula la probabilidad de que ocurra un evento determinado en los datos obtenidos, en este caso se calculó la probabilidad de que ocurriera el evento 1, es decir que creciera la cepa bacteriana en cada uno de los tratamientos evaluados. Aplicando este modelo estadístico se logra evidenciar la diferencia de efectividades entre los tratamientos evaluados en una cepa determinada, graficando la probabilidad de que se dé el crecimiento bacteriano, en el eje de las ordenadas, a una dosis determinada, en el eje de las abscisas con cada uno de los tratamientos, logrando así determinar cuál es más efectivo a una misma concentración. Las gráficas deben analizarse evaluando la probabilidad de crecimiento que se presenta a una misma dosis (según la escala y las dosis evaluadas) para los tratamientos evaluados en cada cepa. Cabe mencionar que la CMI se determinó por inspección visual y no a través de este método probabilístico, el cual evidencia las diferencias de cada tratamiento en términos de probabilidades para una misma cepa evaluada.

#### 4. Matriz de marco lógico

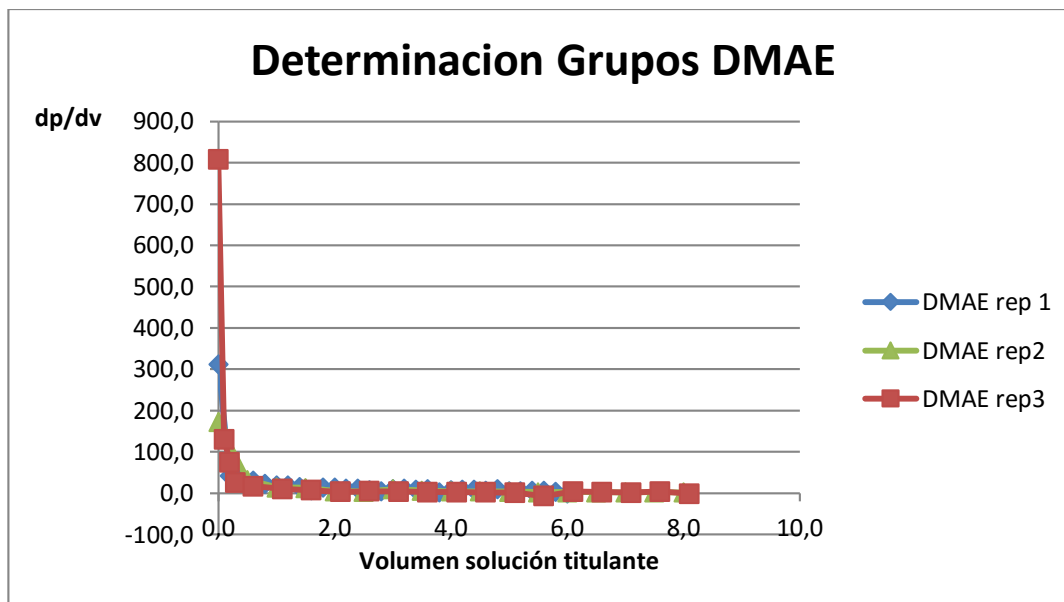
Objetivo General: Evaluar el efecto bioprotector producido por el polímero Eudagrit RL-PO asociado a ampicilina en cepas sensibles y resistentes de <i>S. aureus</i>			
	Actividades	Supuestos	Indicador
Determinar el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> producido por el antibiótico (ampicilina) sobre las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivo de cepas resistentes y sensibles de <i>S.aureus</i></li> <li>2. Realizar el protocolo de siembra, incubación y lectura de las placas, en presencia de antibiótico o polímero.</li> <li>3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria para cada cepa en presencia de antibiótico o polímero, por medio de la prueba de susceptibilidad a antibióticos, realizadas implementando la metodología de microdilución en caldo.</li> </ol>	Las cepas corresponden efectivamente a microorganismos sensibles y resistentes.	<p>Fotografías y reportes pertinentes, sobre las placas con el tratamiento correspondiente.</p> <p>Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la inspección visual de las placas.</p> <p>Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para el tratamiento realizado, con ampicilina</p>
Determinar el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> producido por el polímero Eudagrit RL-PO. sobre las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivo de cepas resistentes y sensibles de <i>S.aureus</i></li> <li>2. Realizar el protocolo de siembra, incubación y lectura de las placas, en presencia de antibiótico en</li> </ol>	El polímero Eudagrit® RL-PO. no tienen ningún efecto antimicrobiano, por lo cual las bacterias crecerán en cada uno de los pozos	<p>Fotografías y reportes pertinentes, sobre las placas con el tratamiento correspondiente.</p> <p>Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la</p>

	<p>asociación con el polímero.</p> <p>3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria para cada cepa, en presencia de antibiótico en asociación con polímero, por medio de la prueba de susceptibilidad a antibióticos, realizadas implementando la metodología de microdilución en caldo.</p>		<p>inspección visual de las placas.</p>
<p>Determinar el efecto antimicrobiano <i>In vitro</i> de la asociación antibiótico (ampicilina)-polímero Eudragit® RL-PO sobre las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas.</p>	<p>1. Cultivo de cepas resistentes y sensibles de <i>S.aureus</i></p> <p>2. Realizar el protocolo de siembra, incubación y lectura de las placas, en presencia de antibiótico en asociación con el polímero.</p> <p>3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria para cada cepa, en presencia de antibiótico en asociación con polímero, por medio de la prueba de susceptibilidad a antibióticos, realizadas implementando la</p>	<p>Concentración mínima inhibitoria para cepas resistentes será disminuida por la asociación polímero-antibiótico.</p>	<p>Fotografías y reportes pertinentes, sobre las placas con el tratamiento correspondiente.</p> <p>Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la inspección visual de las placas.</p> <p>Concentraciones mínimas inhibitorias para la asociación de polímero y antibiótico en las cepas sensibles y resistentes de <i>S. aureus</i></p>

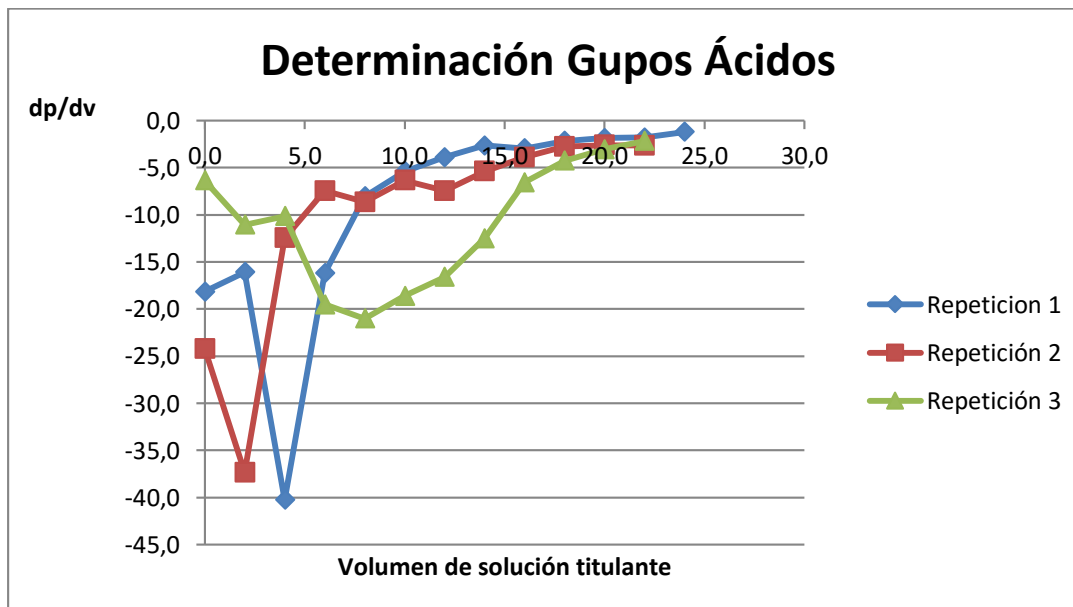
	metodología de microdilución en caldo.		
Establecer el efecto ejercido por el polímero Eudragit® RL-PO en asociación con ampicilina en cepas sensibles y resistentes de <i>S.aureus</i> .	<p>Realizar la revisión bibliográfica pertinente sobre el tema de estudio.</p> <p>Desarrollo de la metodología experimental y recopilación de datos.</p> <p>Realizar el análisis estadístico, con el fin de determinar la CMI de cada tratamiento realizado en la fase de experimentación.</p>	La matriz polimérica de Eudragit® RL-PO en solución acuosa con ampicilina, formará complejos reservorios del fármaco, capaz de proporcionar protección química y biológica al fármaco	<p>Fotografías y reportes pertinentes, sobre las placas con los diferentes tratamientos realizados.</p> <p>Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la inspección visual de las placas.</p> <p>CMI determinadas para los diferentes tratamientos de estudio que determinan el efecto ejercido por el polímero en asociación con ampicilina en cepas sensibles y resistentes de Eudragit® RL-PO.</p>

## 2.5. Resultados

Resultados de pruebas preliminares:



**Figura 3** Gráfico titulación potenciométrica (por triplicado) de Eudragit® RL-PO, para la determinación de grupos dimetilaminoetil (DMAE) ionizables.



**Figura 4** Gráfico titulación potenciométrica (por triplicado) de Eudragit® RL-PO, para la determinación de ácido metacrílico en solución acuosa.



**Resultados de las pruebas de microdilución en caldo para determinar CMI de los tratamientos evaluados:**

El tratamiento correspondiente a ampicilina se realizó a una concentración inicial de 32µg/mL para determinar la CMI de cada una de las cepas.

**Tabla 3.** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25293 con el tratamiento: ampicilina. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	5	8	8	8	8	7	7	6	0	0
Número de posos con crecimiento	3	0	0	0	0	1	1	2	8	8

**Tabla 4** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	8	8	8	5	2	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	0	0	3	6	8	8	8	8	8

**Tabla 5** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	2	8	8	8	8	8	8	8	8

El tratamiento correspondiente al polímero se realizó a una concentración inicial de 512µg/mL para determinar la CMI de cada una de las cepas.

**Tabla 6** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: polímero.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

**Tabla 7** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: polímero.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

**Tabla 8** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: polímero.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Para los demás tratamientos, correspondientes a los complejos de asociación ampicilina:polímero, se realizaron dos pruebas, la primera con una concentración inicial de 512µg/mL (solución madre preparada a 1024 µg/mL) y la segunda prueba con concentración inicial de 32µg/mL (solución madre preparada a 64 µg/mL)

#### Ensayo I concentración inicial de 512µg/mL

**Tabla 9** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	1	12	10	13	13	15	13	16
Número de posos con crecimiento	16	16	15	4	6	3	3	1	3	0

**Tabla 10** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 22923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	0	1	11	16	16	16	16	16
Número de posos con crecimiento	16	16	16	15	5	0	0	0	0	0

**Tabla 11** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	2	9	16	15	16	16	16	15	16
Número de posos con crecimiento	16	14	7	0	1	0	0	0	1	0

**Tabla 12** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	5	5	13	8	12	10	7	7
Número de posos con crecimiento	16	16	11	11	3	8	4	6	9	9

**Tabla 13** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	0	0	9	13	2	2	0	0
Número de posos con crecimiento	16	16	16	16	7	3	14	14	16	16

**Tabla 14** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	13	16	16	16	12	11	8	4
Número de posos con crecimiento	16	16	3	0	0	0	4	5	8	12

**Tabla 15** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	12	15	16	14	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	16	16	4	1	0	2	16	16	16	16

**Tabla 16** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	5	6	15	13	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	16	11	10	1	3	16	16	16	16	16

**Tabla 17** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 512µg/mL.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	0	0	16	16	16	16	8	1	0	0
Número de posos con crecimiento	16	16	0	0	0	0	8	15	16	16

### Resultados ensayo II concentración inicial de 32µg/mL

**Tabla 18** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	16	16	15	16	16	15	8	0
Número de posos con crecimiento	0	0	0	0	1	0	0	1	8	16

**Tabla 19** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	16	16	16	16	16	15	5	0
Número de posos con crecimiento	0	0	0	0	0	0	0	1	11	16

**Tabla 20** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	16	16	16	15	14	13	6	0
Número de posos con crecimiento	0	0	0	0	0	1	2	3	10	16

**Tabla 21** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	15	16	14	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	0	1	0	2	16	16	16	16	16

**Tabla 22** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	15	14	15	5	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	0	1	2	1	11	16	16	16	16

**Tabla 23** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	16	16	16	4	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	0	0	0	0	12	16	16	16	16

**Tabla 24** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:1, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	15	15	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	1	1	16	16	16	16	16	16	16

**Tabla 25** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	13	6	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	3	10	16	16	16	16	16	16	16

**Tabla 26** Resultados de prueba de susceptibilidad a antibióticos en la cepa de *S. aureus* ATCC® 43300 con el tratamiento: ampicilina:polímero 1:2, con concentración inicial de 32µg/mL. Resaltado se encuentra la columna que se determinó como CMI, la concentración correspondiente se puede consultar en la tabla 27.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de posos sin crecimiento	16	16	4	0	0	0	0	0	0	0
Número de posos con crecimiento	0	0	12	16	16	16	16	16	16	16

**Tabla 27** Concentraciones correspondientes a cada columna de los ensayos con concentración inicial de 32µg/mL.

Columna	Concentración(µg/mL)
1	32
2	16
3	8
4	4
5	2
6	1
7	0,5

<b>8</b>	0,25
<b>9</b>	0,125
<b>10</b>	0,0625

**Tabla 28** Compilación de resultados CIM según la cepa de *S. aureus* correspondiente y el tratamiento evaluado.

Ensayo I – concentración inicial 512µg/mL CMI(µg/mL) por tratamiento					Ensayo II – concentración inicial 32µg/mL CMI(µg/mL) por tratamiento			
Cepa	P	P:A 1:1	P:A 2:1	P:A 2:1	A	P:A 1:1	P:A 2:1	P:A 2:1
<b>25923</b>	>512	–	–	–	0,5	0,25	0,25	0,25
<b>29213</b>	>512	–	–	–	8	2	2	2
<b>43300</b>	>512	–	–	–	16	8	16	16

P: tratamiento material polimérico. A: tratamiento de ampicilina libre. P:A hace referencia a los tratamiento de complejos de asociación, los números que lo acompañan hacen referencia a las proporciones a las cuales se prepararon los complejos de asociación.

## 2.6. Discusión

### Estudios preliminares:

Previo a la realización de las prueba de microdilución en caldo fue necesario realizar ensayos de solubilidad del polímero Eudrgit RL-PO en medio acuoso y garantizar que su estructura no se viera afectada (hidrolizada) al preparar la solución acuosa del material polimérico. Se evaluaron dos métodos: agitación magnética y ultrasonido. Con el primero no se logró obtener una solución del material polimérico en una concentración de 1mg/mL, tras 48 horas de agitación constante. Por otra parte, en la metodología donde se empleó el ultrasonido, pasadas 2 horas se logró solubilizar una concentración igual del polímero, alcanzando una temperatura de 60°C en la solución obtenida. Por ello fue necesario garantizar que en este medio y condiciones, donde se logró solubilizar el polímero, este no se encontraba degradado.

Con este fin se realizó una adaptación de la metodología reportada en la farmacopea estadounidense vigente <541> para este tipo de polímeros, realizando la determinación de grupos dimetilaminoetil (DMAE) ionizables, que para el polímero en cuestión debe ser mínima ya que todos sus grupos amino deben encontrarse ionizados; y la determinación de los grupos de ácido metacrílico que se producen por la hidrólisis de la molécula, con la cual se logró determinar si el polímero se degrado tras el proceso térmico al que fue sometido para obtener la solución. Encontrando que el porcentaje de ácido metacrílico en la solución acuosa fue de 0,23%, en promedio para tres réplicas (ver figura 4), con una

desviación estándar de 0,16. Los grupos de sales de amonio no se alteraron significativamente, debido a que no se logró determinar el volumen de equivalencia por ser demasiado pequeño (<1µL) (ver figura 3) indicando que la cantidad de grupos DMAE es mínima, resultado que se esperaba debido a que la estructura del polímero ya tiene estos grupos ionizados.

Para las cepas que se utilizaron en este estudio, previo a la realización de los ensayos de micro dilución, se realizó un paso de las colonias madre preexistentes y se criopreservó un nuevo set de tubos que contienen la suspensión congelada (-80°C) de las colonias bacterianas, cuya metodología se encuentra descrita en el anexo 4.4 de la tesis de pregrado de Stephany Barajas (Barajas, 2013). Lo concerniente a los ensayos para determinar la susceptibilidad o resistencia de las colonias bacterianas, fueron evaluados y reportados por Stephany Barajas en su trabajo de grado, donde reportó que las cepas mantenían las características descritas por el distribuidor Microbiologics® y las características reportadas por el CLSI, a través de la realización de pruebas cromogénicas y de difusión en disco, para consultar la metodología empleada y resultados obtenidos, se dirige al lector al trabajo de grado de dicha investigadora (Barajas-Jordán, 2013).

**Tabla 29** Características cepas de *S. aureus* estudiadas. (CLSI, 2009)

Microorganismo	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betalacatamasa negativo.</li> <li>• <i>mecA</i> negativo.</li> <li>• CMI pequeña, demostrando susceptibilidad a antibiótico.</li> </ul>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®29213</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Débil producción de betalacatamasa.</li> <li>• <i>mecA</i> negativo.</li> </ul>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®43300</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistente a oxacilina.</li> <li>• <i>mecA</i> positivo.</li> </ul>

Además, Barajas-Jordán reportó un estudio de estabilidad de las soluciones de ampicilina, demostrando que en un tiempo mayor al necesario para la realización de las pruebas de microdilución en caldo, dichas soluciones mantienen su concentración inicial (Barajas-Jordán, 2013). Lo que permite asumir que las soluciones madre preparadas que contienen el antibiótico, mantendrán las concentraciones hasta su utilización en el ensayo, siempre y cuando no se someta la molécula a un estrés térmico para la obtención de la solución o para la esterilización de la misma, debido a la inestabilidad térmica del fármaco.



## **Estudios de microdilución en caldo para la determinación de CMI de los tratamientos evaluados**

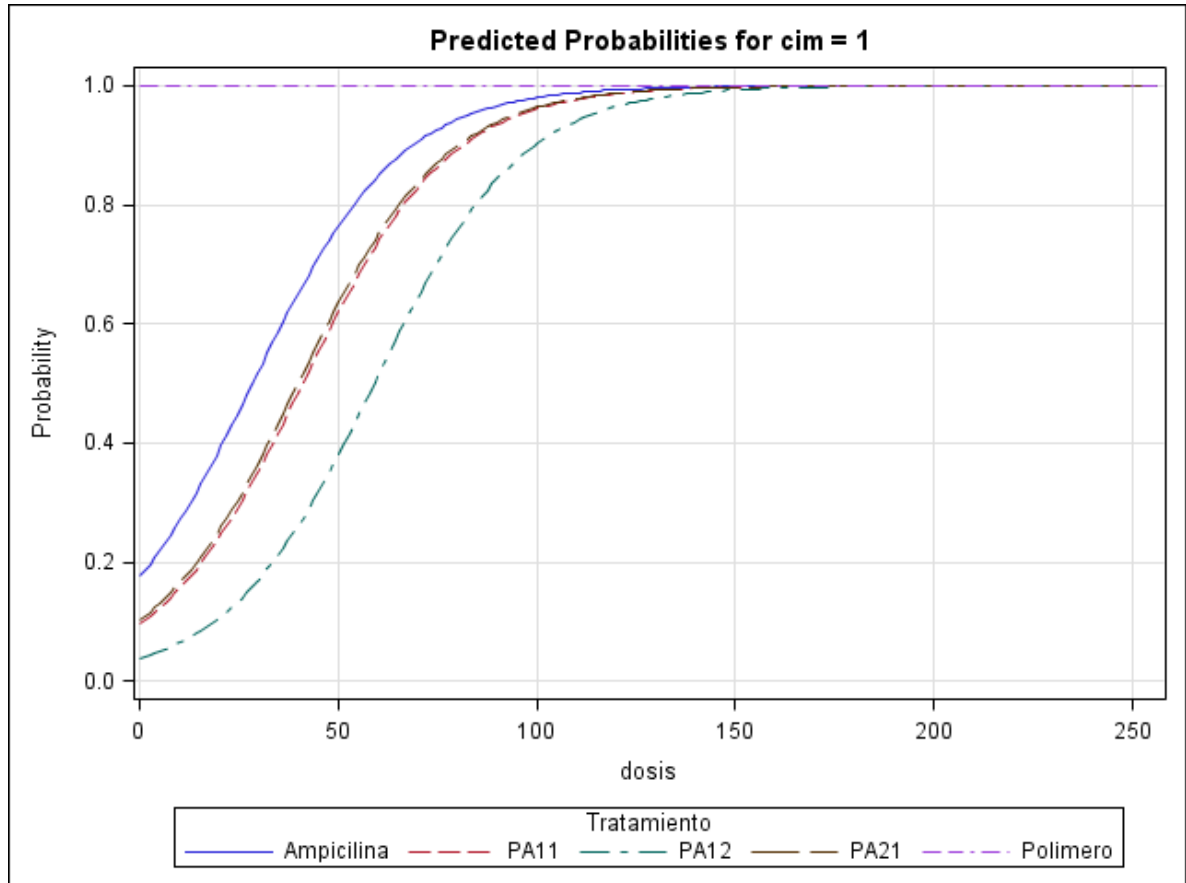
El objetivo principal de este proyecto de investigación consistió en evaluar el efecto antimicrobiano producido por el polímero Eudragit® RL-PO asociado a ampicilina en cepas sensibles y resistentes de *S. aureus* (ATCC®25923, ATCC®29213, ATCC®43300) utilizando la metodología de microdilución en caldo, permitiéndonos obtener 8 repeticiones por placa sembrada con una cantidad de materiales mínima, además de facilitar la determinación de la concentración mínima inhibitoria, si se compara con otros métodos empleados para evaluar susceptibilidad de cepas bacterianas como lo son la difusión por disco y la macrodilución (Cavaliere & et al, 2005). En concordancia con lo recomendado por David Bautista en su trabajo de grado se realizó el método 2, nombrado así por el investigador, correspondiente a un ensayo en el que se analizan diferentes tratamientos para una misma cepa, evitando la variabilidad que puede producirse al evaluar diferentes tratamientos en diferentes días con una misma cepa. (Bautista, 2015)

Inicialmente se realizaron los ensayos empleando una solución madre de 1024µg/mL, que correspondería a una concentración inicial en la placa de 512µg/mL, para los tratamientos correspondientes al polímero y los complejos de asociación. El ensayo realizado con la matriz polimérica permitió descartar que este pudiera ejercer un efecto antimicrobiano, pudiéndose observar en cada una de las gráficas estadísticas presentadas a continuación (figuras 5, 6 y 7), que a cualquier concentración del polímero se obtiene una probabilidad del 100% de encontrar crecimiento bacteriano. Esto se obtuvo tras observar que la bacteria crecía en todos los posos de la placa sembrados con el inóculo (ver tablas 6, 7 y 8), a las concentraciones que se utilizaron en estos ensayos, dentro de las cuales se encontraban las que serían evaluadas en los complejos de asociación.

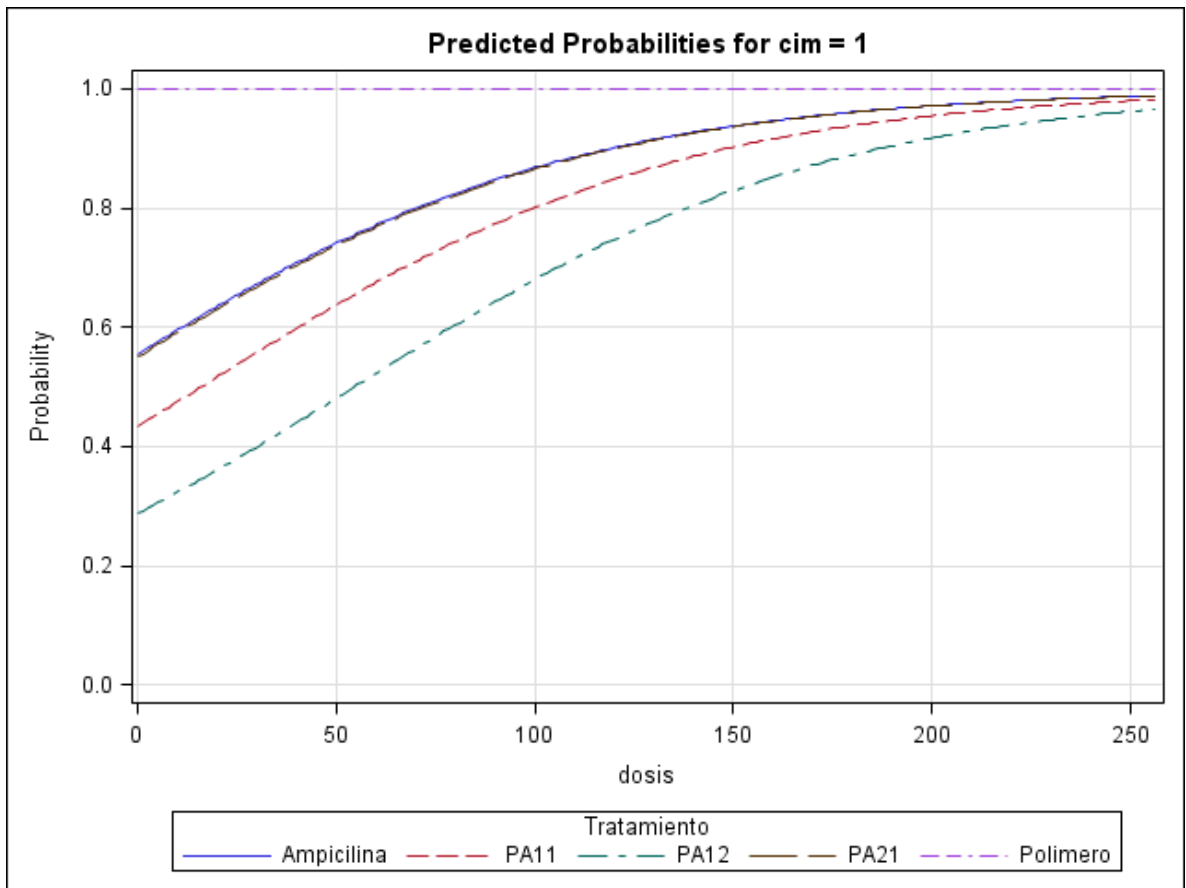
Por otra parte, los ensayos realizados a estas concentraciones con los complejos de asociación no permitieron determinar una CMI para ninguna de las cepas, ya que se presentó crecimiento en todas las concentraciones evaluadas. Además se encontró un comportamiento ilógico, mostrando que a mayores concentraciones aumentaba la probabilidad de que la cepa sobreviviera. Estos resultados se encuentran reportados en las tablas 9 a 17 y el gráfico obtenido con tratamiento estadístico de estos datos corroboran esta probabilidad poco lógica, cómo se puede ver en las figuras 5, 6 y 7, donde al aumentar la dosis de antibiótico también aumenta la probabilidad de crecimiento bacteriano de la cepa evaluada, esto sucedió en todas las cepas con todos los tratamientos.

A pesar de que no fueron útiles estos ensayos para determinar la susceptibilidad de las cepas a los tratamientos evaluados, permitieron plantear hipótesis sobre el comportamiento del polímero, que al diluirse concentraciones cercanas a 1024µg/mL o superiores, tiende a acomplejarse junto con la ampicilina de una

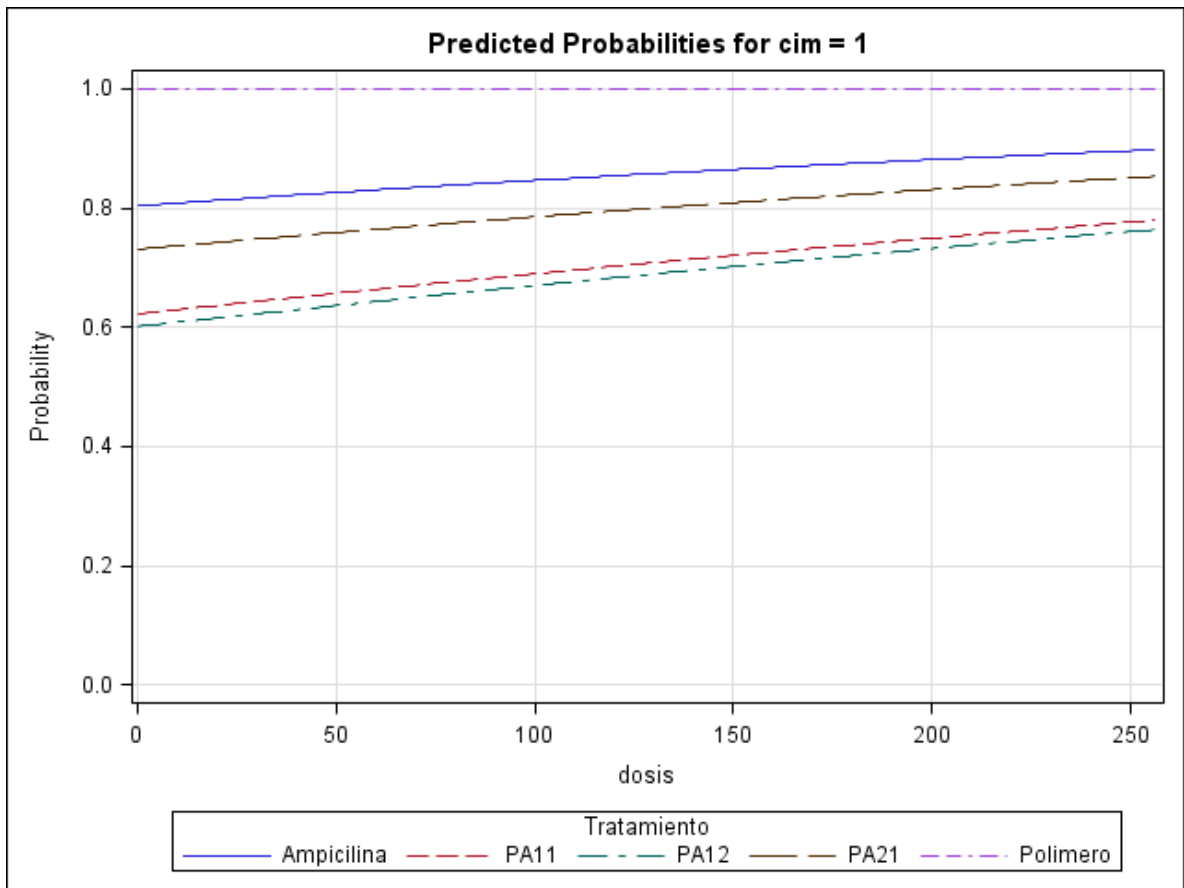
manera tal que no permite que esta se encuentre disponible para ejercer su efecto antimicrobiano frente a las bacterias, lo cual no se encuentra reportado en artículos científicos pero puede ser corroborado empleando la caracterización de la solución polimérica obtenida, calculando su potencial Z que permite predecir el comportamiento del polímero en solución acuosa. Esta hipótesis llevó a evaluar los tratamientos de complejos de asociación a unas concentraciones menores dentro de las cuales se encontraran las CMI reportadas para cada una de las cepas bacterianas evaluadas.



**Figura 5** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 25923, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512µg/mL. Las dosis se encuentran en µg/mL. Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los números que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.



**Figura 6** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 29213, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512 µg/mL. Las dosis se encuentran en µg/mL. Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los números que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.



**Figura 7** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 43300, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 512 µg/mL. Las dosis se encuentran en µg/mL. Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los números que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.

Al mismo tiempo se realizaron los ensayos con el tratamiento: ampicilina que permitió tener una base de la CMI de las bacterias con las cuales se estaba trabajando, para ello se utilizó una concentración inicial de 32 µg/mL lo que generó un conjunto de concentraciones dentro de las cuales se encontraban las CMI reportadas por los diferentes investigadores y por el CLSI (ver tabla 30). De esta manera se determinó que la CMI, en este estudio, para la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 es de 0,5 µg/mL, para la cepa ATCC® 29213 es de 8 µg/mL y para la cepa ATCC® 43300 es de 16 µg/mL para el tratamiento inicialmente mencionado. Cabe mencionar que para su determinación se tuvo en cuenta que en la fase experimental hubo dificultades con la micropipeta multicanal, ya que no se contaba con un recipiente adecuado donde tomar los volúmenes que se depositarían en los posos de la microplaca y por ello se aceptó, de manera deliberada, el crecimiento bacteriano en máximo 2 posos (en los ensayos de 8 réplicas) y

máximo 3 (para los ensayos de 16 réplicas) para determinar la CMI de una cepa con un tratamiento determinado.

**Tabla 30** Valores CMI, para ampicilina, de referencia para las cepas de *S. aureus* evaluadas.

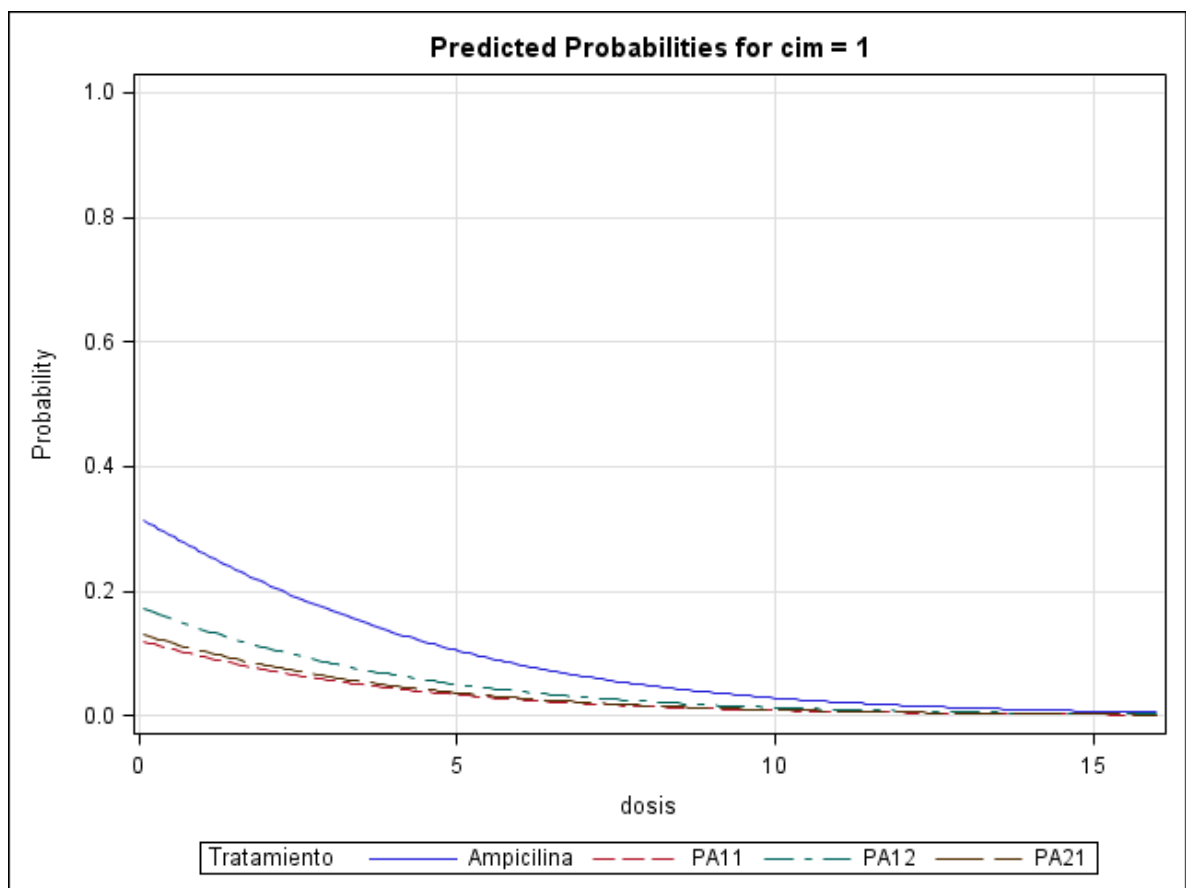
Cepa	CMI de ampicilina (µg/mL)	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	0,25	(Barajas, 2013)
	0,125	(Bautista, 2015)
	0,25-1	(CLSI, 2012)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	8	(Barajas, 2013)
	1-2	(Bautista, 2015)
	0,5-2	(CLSI, 2012)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300	32	(Barajas, 2013)
	16-32	(Bautista, 2015)
	>4	(CLSI, 2012)

Con estos resultados y los obtenidos por Barajas para determinar producción de betalactamasas, se concluyó que las cepas de *S. aureus* ATCC® 29213 y ATCC® 43300 son resistentes a antibiótico betalactámico ampicilina y la cepa ATCC® 25923 es sensible al mismo (Barajas, 2013). En concordancia con las características reportadas por el CLSI para estos microorganismos (tabla 30).

Ahora bien, con los ensayos realizados a 32 µg/mL (preparados con una solución madre a 64 µg/mL) si se logró determinar una CMI para cada cepa con cada uno de los tratamientos evaluados, lo cual corrobora lo planteado acerca del comportamiento del polímero en solución acusa a concentraciones elevadas. Se pasará a detallar las observaciones y resultados obtenidos con cada cepa en los diferentes tratamientos.

Para el *S. aureus* ATCC® 25923 que, como se mencionó anteriormente corresponde a una cepa sensible a antibióticos betalactámicos, se evaluaron los complejos de asociación antibiótico:polímero 1:1, 1:2 y 1:2, obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias de 0,25 µg/mL para los tres tratamientos, lo cual denota una reducción a la mitad de la CMI reportada con ampicilina libre, es decir, la asociación de la ampicilina al polímero potencia la actividad antimicrobiana de la primera. Sin embargo, a pesar de que la CMI fue igual, el tratamiento estadístico de los datos muestra una diferencia entre los tratamientos (ver figura 8), siendo mejores los que se encontraban en proporción P:A 1:1 y 2:1, debido a que sus graficas se encuentran prácticamente solapadas y a una menor concentración obtienen una menor probabilidad de encontrar crecimiento bacteriano al encontrarse por debajo de la línea que representa el comportamiento del tratamiento 1:2® siendo este un poco diferente a los anteriores, aunque a partir

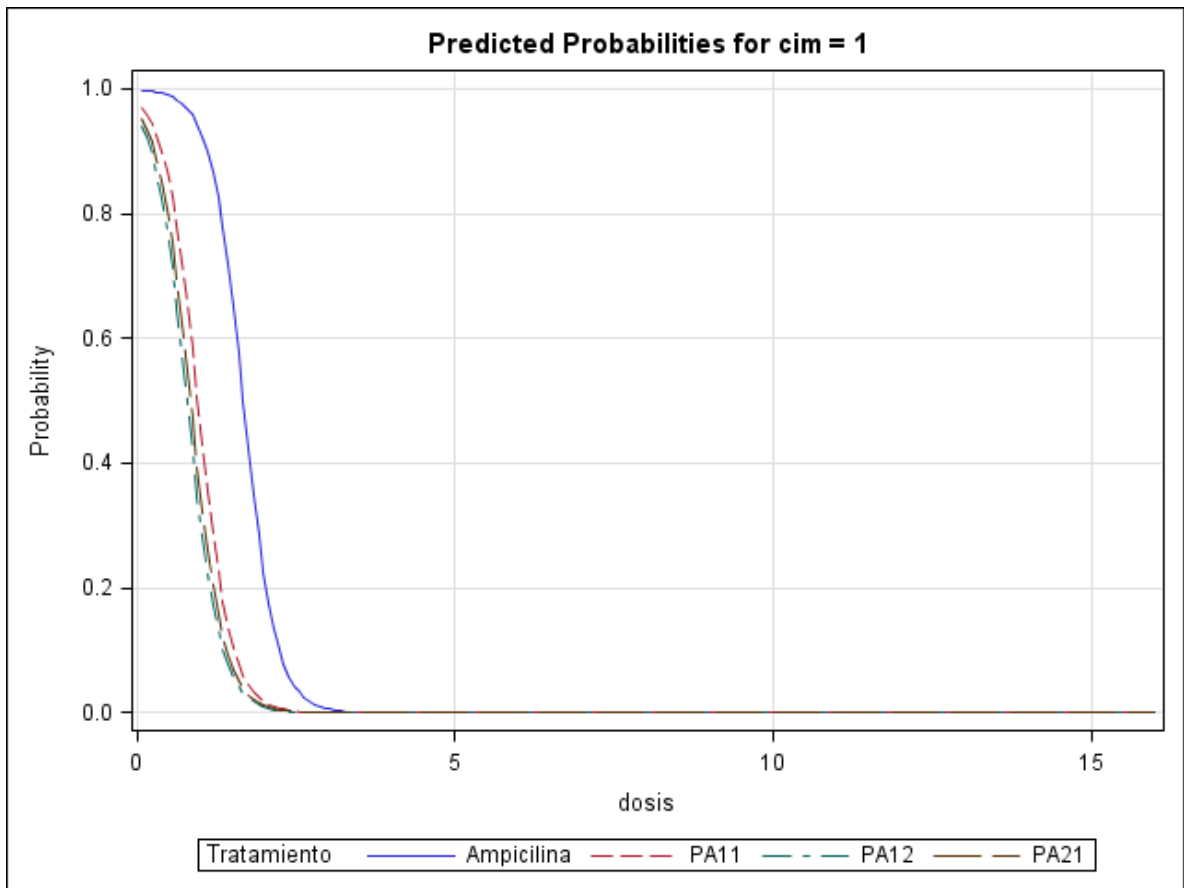
de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dosis los tres tratamientos se hacen iguales, sin dejar de ser mejores que el de la ampicilina libre. Aun así, el hallar que el tratamiento con exceso de polímero, presente un perfil de crecimiento similar a los demás, resulta un poco contradictorio con lo planteado inicialmente sobre el impedimento que puede generar el polímero sobre el antibiótico, para que este ejerza su efecto bactericida, lo cual evidencia la necesidad de un estudio fisicoquímico de la asociación y comportamiento del polímero en solución acuosa a diferentes concentraciones, como por ejemplo un estudio de potencial Z que permita predecir cómo se dan estos rearrreglos de la matriz polimérica a medida que aumenta su concentración en la solución, y poder así validar o refutar la hipótesis de que el polímero puede disminuir el efecto antibacteriano a concentraciones altas del mismo, como se evidenció en los primeros ensayos.



**Figura 8** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 25923, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de  $32\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las dosis se encuentran en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los números que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.

Continuando ahora con los resultados obtenidos para la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213, que evidenció resistencia a antibióticos betalactámicos en los estudios preeliminares citados anteriormente, se logró obtener una CMI de 2 µg/mL al utilizar los complejos de asociación en la prueba de susceptibilidad a antibióticos, lo cual corresponde a una disminución de 4 veces la concentración obtenida con el antibiótico libre. Sin embargo, esto aún no es significativo ya que la cepa sigue presentando resistencia a estos antimicrobianos, puesto que la concentración mínima inhibitoria no se logró disminuir hasta una que corresponda a un microorganismo sensible como lo es la cepa ATCC® 25923 la cual se encuentra entre 0,25 y 1 µg/mL, según lo reportado por el CLSI. Haciendo el análisis correspondiente a la gráfica del comportamiento estadístico de los datos, figura 9, se puede observar que evidentemente la probabilidad de hallar crecimiento a menor concentración de antibiótico se encuentra reducida en los tratamientos, respecto a la ampicilina libre, y estos tienen un comportamiento muy similar y en este caso no hay una diferencia significativa entre los tres evaluados, ya que sus gráficas se encuentran casi superpuestas.

Hasta ahora estos resultados llevan a pensar que la variabilidad entre las cepas, es decir el ser sensibles o resistentes, ocasiona también una variabilidad en cuanto a cual componente del complejo de asociación es necesario que se encuentre en mayor proporción dentro tratamiento para obtener un mejor resultado. Sin embargo, todos los tratamientos analizados presentan un perfil muy similar dentro de las gráficas probabilísticas de crecimiento bacteriano, lo que lleva a plantear que es necesario evaluar otras proporciones donde las diferencias entre las concentraciones del antibiótico y la matriz polimérica sean mayores y permita definir si el tener un componente en mayor proporción, lleva a una mejor respuesta de bioprotección y/o efectividad del tratamiento antibiótico frente a las cepas resistentes.



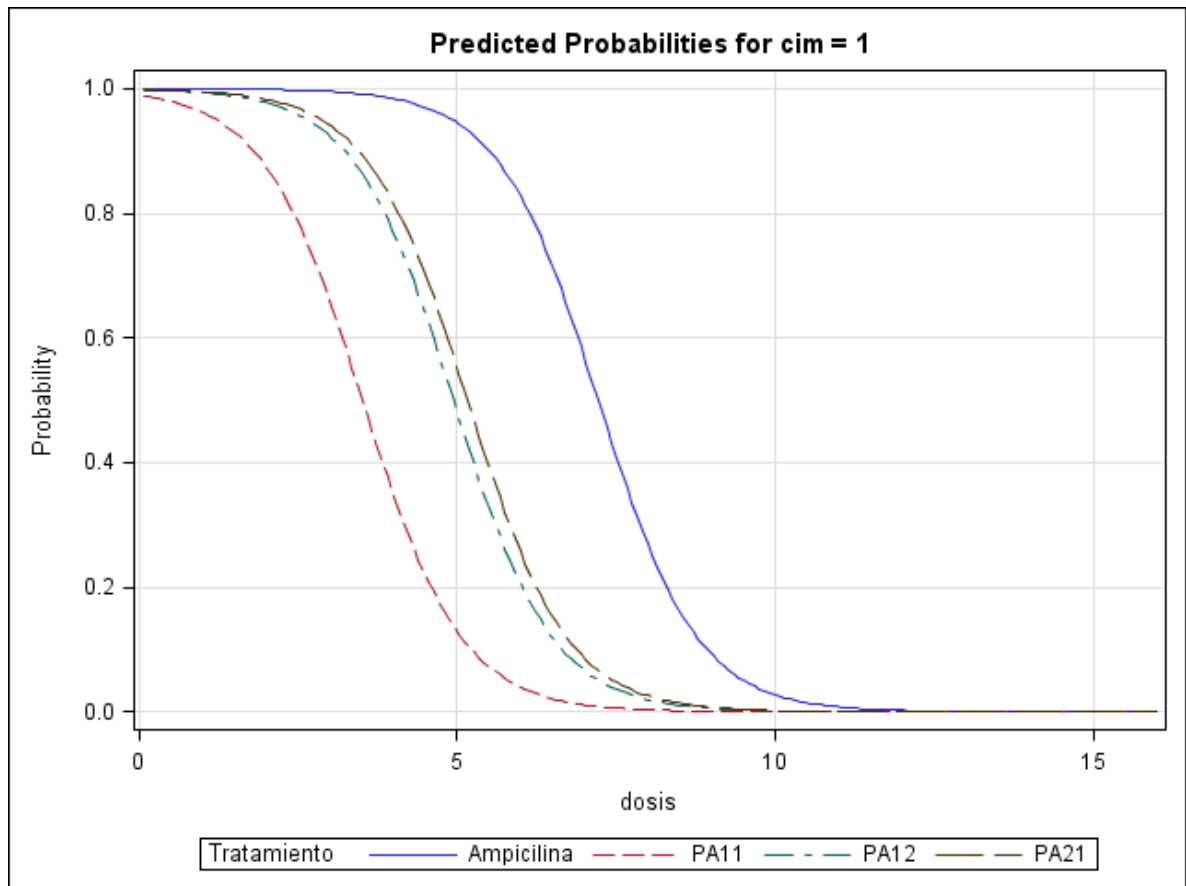
**Figura 9** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 29213, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 32μg/mL. . Las dosis se encuentran en μg/mL. Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los numero que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.

Por último, el analisis correspondiente a los datos obtenidos en la cepa de *S. aureus* ATCC®43300 que presentó la mayor resistencia, por obtener una mayor CMI para el tratamiento de ampicilina libre y la produccion de enzimas betalactamasas demostrado en estudios preeliminarios realizados por Barajas Jordann en su trabajo de investigacion previo (Barajas, 2013).

Se obtuvieron las CMI de los tratamientos evaluados que fueron: 16μg/mL para las proporciones 1:2 y 1:2 antibiótico:polímero y de 8μg/mL para el que los componentes se encontraban en igual proporción. Estos resultados y el análisis estadístico de la probabilidad de crecimiento realizado para estos tratamientos, figura 10, denotan una mayor diferencia entre los tratamientos evaluados, evidenciando una mayor efectividad del efecto en la proporción 1:1 que logró disminuir un 50% la CMI de la cepa que presenta la mayor resistencia. Al analizar la gráfica se puede ver claramente las diferencias entre los tratamientos, si



tomamos una dosis de 5µg/mL tendríamos una probabilidad del 12% de que la bacteria crezca en el tratamiento 1:1, mientras que a esta misma dosis en los otros dos complejos de asociación, la probabilidad de hallar crecimiento bacteriano es del 50% aproximadamente y para la ampicilina libre aumentaría hasta un 92% aproximadamente. Lo cual corrobora lo planteado anteriormente sobre la necesidad de evaluar un pool de proporciones mayor, que permita demostrar la pertinencia o no de tener un componente en mayor proporción para potenciar el efecto antimicrobiano o bioprotector del tratamiento.



**Figura 10** Análisis probabilístico de supervivencia de *S. aureus* ATCC® 43300, con los tratamientos evaluados a una concentración inicial de 32µg/mL. Las dosis se encuentran en µg/mL. Las siglas “PA” hacen referencia a los complejos de asociación y los números que le siguen son las proporciones a las cuales se preparó el tratamiento.

En síntesis, la implementación de un vehículo polimérico para realizar un efecto bioprotector del antibiótico betalactámico ampicilina, logró tener un efecto en las cepas resistentes y sensibles de *Staphylococcus aureus*, reduciendo la CMI de cada cepa. Sin embargo, no se logró obtener una concentración mínima inhibitoria dentro del rango de 0,25µg/mL a 1µg/mL, que evidencie la susceptibilidad al

antibiótico de las cepas resistentes evaluadas. Se debe de continuar la investigación ya que los resultados obtenidos son prometedores y no se han tenido en cuenta aspectos importantes dentro de la realización de estas pruebas y la preparación de los tratamientos, como lo son: la evaluación sobre otros microorganismos resistentes, la implementación de una técnica estandarizada que permita garantizar la formación del complejo antibiótico-polímero y conocer cómo se está dando la misma, para evaluar el uso de diferentes polímeros o antibióticos para potenciar el efecto bioprotector y que el fármaco logre realizar su efecto antibiótico. Por este motivo, a continuación se citarán diferentes artículos donde han reportado la implementación de matrices poliméricas como vehículo farmacológico de manera efectiva, para enriquecer el conocimiento sobre esta línea investigativa y plantear posibles soluciones a los aspectos planteados anteriormente en este párrafo.

Santos Ferreira y colaboradores trabajaron en el mejoramiento de la actividad antimicrobiana de la vancomicina y daptomicina, los cuales son antibióticos utilizados para tratar infecciones causadas por *S. aureus* meticilinoresistente. Se planteó el uso de polímeros de metacrilato de metilo en conjunto con Eudragit® RL-100, ya que estos materiales han sido ampliamente estudiados debido a su biocompatibilidad, y publicaciones recientes han mostrado un creciente interés por sus aplicaciones como vehículo farmacológico. Los resultados obtenidos demostraron una mayor efectividad del efecto antimicrobiano al encapsular los antibióticos en estas matrices poliméricas por un método de doble emulsificación y secado, ya que estos preparados facilitaron la entrega del antibiótico en su lugar de acción. Aunque el propósito de este estudio no fue el mejorar la CMI de las bacterias resistentes, se puede evidenciar la importancia y pertinencia de la implementación de sistemas poliméricos para mejorar la efectividad de un antibiótico al ser administrado en una forma farmacéutica de liberación modificada. (Ferreira I. S., y otros, 2015) Por otra parte se debe poner especial atención al método de encapsulación que se propone, para investigaciones futuras, debido a que este es un factor determinante, por lo evidenciado dentro del presente proyecto de investigación, para garantizar la efectividad del antimicrobiano utilizado, pudiendo ser entregado antes de llegar a su sitio de acción o limitando la entrega del mismo.

En este sentido, se hizo una revisión de diferentes métodos de obtención de complejos de asociación entre sistemas poliméricos y fármacos antibióticos, antifúngicos, entre otros. Específicamente se encontró que una de las técnicas más empleadas en la obtención de nanopartículas a partir de polímeros Eudragit® es la doble emulsificación y secado (Ferreira I. S., y otros, 2015) (Oliveira H. d., Tavares, Nogueira, & Rieumont, 2009) . Profundizando más en este tema, Nagavarma B V N y colaboradores presentan un *review* de las principales técnicas empleadas para la preparación de estos sistemas poliméricos, entre las cuales se encuentran Evaporación de solvente, Nanoprecipitación, Emulsificación/difusión de solvente, Salting out, Diálisis y Tecnología de fluidos supercríticos (SCF) (N,

K.S.YADAV, A, L.S, & H.G, 2012). Con la información presentada en el artículo, se puede evaluar la adaptación de las técnicas de evaporación de solvente o emulsificación para la preparación de estas matrices poliméricas con ampicilina, ya que son técnicas que pueden ser adaptadas a las condiciones del laboratorio del GIFF de la universidad Icesi. Además se propone evaluar las nano o macropartículas obtenidas, realizando su caracterización para ampliar el conocimiento sobre cómo estas podrían interactuar con la pared celular de las bacterias que se vayan a utilizar en investigaciones futuras y se pueda obtener una potenciación del efecto antimicrobiano efectiva, previo a su ensayo experimental, pudiendo suponer o predecir cómo actuaría el polímero en conjunto con el antibiótico al entrar en contacto con el microorganismo de estudio.

Dichas predicciones de interacciones entre matrices poliméricas y células bacterianas han sido objeto de estudio, llegando a concluir que estas se encuentran determinadas principalmente por el balance hidrófobo/hidrófilo, por el tipo de partícula y la forma que se obtenga en la preparación del complejo de asociación. Además se tienen fuertes indicios de que los polímeros con carga (polielectrolitos) como el empleado en este proyecto de investigación (Eudragit® RL-PO), tienen la capacidad de ser adsorbidos más fácilmente por las membranas que tengan una carga opuesta. Como es el caso de la posible interacción que se puede dar entre el polímero de estudio, que posee una carga positiva, y la pared celular del *S. aureus*, que posee una carga negativa a causa de la presencia de fosfolípidos y otros componentes aniónicos en la misma. Por tal motivo, se hace pertinente continuar el estudio de la aplicación de este polímero como vehículo de fármacos antibióticos, pues presenta características favorables que pueden permitir la potenciación del efecto bactericida frente a cepas resistentes de la bacteria en cuestión. (Schulz, Olubummo, & Binder, 2012)

En conclusión, en concordancia con los resultados obtenidos y las bases teóricas encontradas en la literatura, la matriz polimérica de Eudragit® RL-PO evidencia un resultado favorable frente a la bioprotección del antibiótico betalactámico ampicilina. Aunque con esta investigación no se obtuvieron resultados que hagan susceptibles las cepas resistentes de *S. aureus*, al evidenciar una disminución en la CMI, se indagó sobre cómo se podría mejorar la efectividad de esta asociación, encontrando que factores pudieron afectar el efecto bioprotector. Es probable que los complejos de asociación tengan interacciones inestables debido a la forma en la que se prepararon estos tratamientos, además no se puede asegurar que en cada solución que contenía los complejos de asociación, el antibiótico haya interactuado de manera favorable y efectiva con el polímero para que este ejerciera su efecto bactericida en las cepas evaluadas. Por tal motivo, se recomienda la implementación de diferentes técnicas de encapsulación para obtener el complejo de asociación garantizando una mayor estabilidad del complejo. No obstante se propone la caracterización del material obtenido tras la encapsulación (si se implementa una técnica) lo cual permitiría plantear un mecanismo de acción o interacción del complejo de asociación con los

microorganismos de estudio, ampliando así el conocimiento sobre esta área, la cual se encuentra aún en desarrollo y ha mostrado resultados que han hecho que diferentes investigadores se interesen en él, y se obtengan cada vez más publicaciones sobre la implementación de sistemas poliméricos para mejorar el efecto antimicrobiano de los antibióticos.

## 2.7. Conclusiones

- Se reconfirmó mediante la prueba de susceptibilidad a antibióticos con ampicilina libre, que la cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 es sensible y las cepas ATCC® 29213 y ATCC® 43300 de la misma bacteria presentan resistencia al antibiótico evaluado.
- Se confirmó que el polímero Eudragit® RL-PO no ejerce efecto antibiótico directo frente a las cepas estudiadas de *S. aureus* (ATCC® 25923, ATCC® 29213 y ATCC® 43300).
- Se determinó que los tratamientos más efectivos para inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC® 25923 corresponden a P:A 1:1 y 2:1, con diferencias poco significativas entre ellos. Sin embargo, todos disminuyeron un 50% la CMI respecto a la ampicilina libre.
- Se determinó que los tratamientos de complejos de asociación con la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 disminuyeron 4 veces la CMI, respecto a la obtenida con ampicilina libre. Observando en las gráficas estadísticas de supervivencia que no existen diferencias significativas entre ellos, ya que los tres tratamientos presentan un perfil muy similar.
- Se determinó que el tratamiento más efectivo para inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC® 43300 fue P:A 1:1, logrando disminuir la CMI a la mitad, respecto a la obtenida con ampicilina libre. Los otros dos tratamientos evaluados no presentaron diferencias en la CMI, notando que no habría diferencia entre usar el antibiótico libre o los complejos de asociación en esta cepa.
- Se analizaron los factores que pudieron afectar el efecto bioprotector del polímero en asociación con el antibiótico, determinando que los complejos de asociación pudieron haber sido inestables por el método de preparación de los tratamientos, que no garantiza que las interacciones y el acomplejamiento sea efectivo.

## 2.8. Recomendaciones

- Se requiere implementar y estandarizar una técnica para la formación de los complejos de asociación que permita garantizar, que efectivamente se estén formando, como la técnica de emulsificación y secado, la cual ha sido de amplia aplicación en la formación de complejos con polímeros de la familia Eudragit®.
- Se requiere realizar un estudio, por potencial Z de la solución polimérica, que permita predecir de qué forma se pudo dar la complicación entre el polímero y el antibiótico, tras la implementación de la técnica de encapsulación, que permita predecir o suponer, de que forma el polímero le confiere la bioprotección al antibiótico y si esta es efectiva frente a las cepas resistentes de las bacterias a evaluar.
- Se deben hacer estudios que permitan optimizar la metodología planteada, optimizando insumos, tiempo y se controlen posibles variabilidades en la preparación de los tratamientos que se evaluarán.
- Se recomienda evaluar la metodología implementada para el estudio de otros antibióticos que han entrado en desuso o a los cuales los microorganismos están desarrollando resistencia en los últimos años, al igual que con otros polímeros de la familia Eudragit®, que como se evidencio en la discusión, presentan características favorables para este tipo de estudios.
- Se hace necesario evaluar un *pool* más amplio de proporciones entre antibiótico y polímero para determinar si es realmente efectivo utilizar uno de los dos componentes en mayor proporción dentro de los complejos de asociación y si esto es variable según las características de la cepa bacteriana, como fue el caso en esta investigación.

### 3. Referencias

- Agredo, P., & Florez, A. (2013). Diseño y Formulación de Potenciales Formas Farmacéuticas de Antibióticos Beta-Lactámicos Útiles Frente a Microorganismos Resistentes, Caracterización Físicoquímica de la Formación de Complejos de Asociación Polimérica entre el Antibiótico Ampicilina Trihi. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- American Academy of Microbiology. (1999). *Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective*. Puerto Rico: American Academy of Microbiology.
- Barajas, S. (2013). Evaluación del Efecto Antimicrobiano Producido por el Polímero Anfifílico Pam-18 Na asociado a Ampicilina en cepas de *Staphylococcus aureus*. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- Barcelona, L., Marín, M., & Stamboulian, D. (2008). Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas. *Medicina*, 65-74.
- Bautista, D. E. (2015). *Determinación de la Eficacia Antibiótica de los Complejos de Asociación Ampicilina-Polímero Pam-18na2 en Cepas de Staphylococcus Aureus*. Cali.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 70-76.
- Boucher, H., Talbot, G., Bradley, J., Edwards, J., Gilbert, D., Rice, L., . . . Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *clinical infectious diseases*, 1-12.
- Cavaliere, S. J., & et al. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Sharp, S., & Rankin, I. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. American Society for Microbiology.
- CLSI. (2009). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*.
- CLSI. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd-Informational Supplement*.

- Colciencias. (2010). *Impacto clínico y económico de la resistencia bacteriana en hospitales del Distrito*. Bogotá: Boletín informativo GREBO.
- Das, S., M.Pharma, Suresh, P., Desmukh, R., & M.Pharmac. (2010). Design of Eudragit® RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 318-323.
- Echevarria, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Medica Herediana*.
- Echeverria, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Hered*, 195-203.
- Evonik. (noviembre de 2007). Evonik Industries. *Specifications and test methods for EUDRAGIT® RL 100 and EUDRAGIT® RL PO EUDRAGIT® RS 100 and EUDRAGIT® RS PO*.
- Evonik Industries. (2015). *Evonik Industries*. Obtenido de <http://Eudragit@.evonik.com/product/Eudragit@/en/products-services/Eudragit@-products/protective-formulations/e-100/Pages/default.aspx>
- Evonik Industries. (2015). *Evonik Industries*. Obtenido de <http://Eudragit@.evonik.com/product/Eudragit@/en/products-services/Eudragit@-products/sustained-release-formulations/rl-100/pages/default.aspx>
- Ferreira, I. S., Bettencourt, A., Bétrisey, B., Gonçalves, L. M., Trampuz, A., & Almeida, A. J. (2015). Improvement of the antibacterial activity of daptomycin-loaded polymeric microparticles by Eudragit® RL 100: An assessment by isothermal microcalorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 172-182.
- Ferreira, I., Bettencourt, A., Bétrisey, B., Gonçalves, L., Trampuz, A., & Almeida, A. (2015). Improvement of the antibacterial activity of daptomycin-loaded polymeric microparticles by Eudragit® RL 100: An assessment by isothermal microcalorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 171-182.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How Antibiotics Kill Bacteria: from Target to Networks. *National Institutes of Health*, 423-435.
- Llarrull, L. I., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2009). Molecular Basis and Phenotype of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Insights into New  $\beta$ -

- Lactams That Meet the Challenge. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 4051-4063.
- Molina, F., Díaz, C., L., B., De la Rosa, G., Dennis, R., Dueñas, C., . . . Jaimes, F. (2011). Microbiological profile of infections in the Intensive Care Units of Colombia (EPISEPSIS Colombia). *Medicina Intensiva*, 75-83.
- Moncayo, Á. (2014). La resistencia a los antibióticos y la falta de interés de la industria. *Infectio*, 35-36.
- N, N. B., K.S.YADAV, H., A, A., L.S, V., & H.G, S. (2012). DIFFERENT TECHNIQUES FOR PREPARATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES- A REVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 16-23.
- Oliveiraa, H. d., Tavaresa, G., Nogueirasa, C., & Rieumont, J. (2009). Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit® copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 55-61.
- Oliveiraa, H. d., Tavaresa, G., Nogueirasa, C., & Rieumonta, J. (2009). Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit® copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 51-61.
- OMS. (mayo de 2013). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Perazzi, B., M.Camacho, Bombocino, K., Florez, Z., Vay, C., & Famiglietti, A. (2010). Staphylococcus aureus: nuevos y antiguos antimicrobianos. *Revista Argentina de Microbiología*, 199-202.
- Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 57-67.
- Quinteros, D., Ramirez, V., Jimenez, A., Olivera, M., Manzo, R., & Allemandi, D. (2008). Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit® E100) and anionic drugs. *Pharmaceutical Sciences*, 72-79.
- Rang, H. P., & Dale, M. M. (2008). *Farmacología*. Barcelona, España.: Elsevier España.
- Salamanca, C. (2007). Estudio de propiedades fisicoquímicas de polieletrólitos aniónicos en solución como potenciales reservorios de sustratos farmacológicos. *Universidad de Chile, programa de Doctorado en Química*. Santiago-Chile, Chile.



- Schulz, M., Olubummo, A., & Binder, W. H. (2012). Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *SOFT MATTER*, 4849-4964.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecciosas y Microbiología Clínica*, 116-129.
- Sussmann, O. A., Mattos, L., & Restrepo, A. (2001). Resistencia Bacteriana. *Universitas Médica Pontificia Universidad Javeriana Bogotá*, 91-103. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana Bogotá: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
- Tang, Y.-W., & Stratton, C. W. (2010). Staphylococcus aureus: AN Old Pathogen with New Weapons. *Clinics in Laboratory Medicine*, 179-208.
- United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 36-NF31). (2014). <541>Titulacion potenciométrica. En *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 36-NF 31)*.
- Vignoli, R., & Seija, V. (2006). *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR.
- Villada, J. (2015). Obtención y caracterización estructural por ftir de los materiales ionoméricos clorhidrato, acetato y formiato de Eudragit® E-100 con diferentes grados de ionización. Cali, Valle del Cauca, Colombia.

## Anexos

### Anexo 1

#### **Preparación de Agar nutritivo**

Se pesan 4,0 g de agar Merck® o 5,6g si el agar es Scharlau®; en una balanza analítica. Esta cantidad es disuelta en 200 mL de agua desionizada en un frasco Schott de 500 mL. Con agitación constante y temperatura (empleado una plancha con agitación) hasta obtener una solución traslúcida. Posteriormente, esta debe ser sometida a un proceso de esterilización por autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Se deja reposar la solución hasta que alcance una temperatura entre los 45-50°C, para ser vertido, aun líquido, en cajas Petri estériles. Estas placas se deben conservar a 4°C.

#### **Preparación de solución de ampicilina trihidrato 64 µg/mL**

Se pesan 6,4mg de ampicilina trihidrato en estado sólido con la ayuda de una balanza analítica (dentro de la cantidad a pesar, ya se encuentra el cálculo de la potencia del 99,7%) El sólido se disuelve con 10mL de agua desionizada tipo 2. Para facilitar el proceso de disolución del antibiótico se puede emplear un vortex. Finalmente, se tapa y rotula el recipiente donde se encuentra la solución madre de ampicilina trihidrato 64µg/mL. Es considerable mencionar que, al momento de usar la solución, se debe diluir 10 veces para obtener una solución de 512µg/mL (esta solución debe ser almacenada a 4°C y se debe utilizar al día siguiente de su preparación) Previo a ser utilizada en los ensayos de microdilución, la solución debe ser filtrada con la ayuda de una jeringa de 10mL y un filtro con tamaño de poro de 0,22 micrómetros, como proceso de esterilización de la solución.

#### **Preparación de la solución polimérica de Eudragit® RL-PO 64 µg/mL**

Se pesan en una balanza analítica 6,5 mg de Eudragit® RL-PO en estado sólido. Este polvo se pesa directamente Erlenmeyer 250mL y se dispersa en 100mL de agua estéril con la ayuda probeta. A continuación, esta mezcla se lleva al ultrasonido durante 2 horas hasta obtener una solución translúcida, sin material particulado. Finalmente, la solución madre de polímero de 64µg/mL es rotulada y almacenada en nevera a 4°C. Para la preparación de soluciones con a diferentes concentraciones, empleadas en los tratamientos evaluados, se debe realizar el cálculo para saber qué cantidad de polímero en estado sólido debe ser pesada inicialmente.

#### **Preparación de complejos de asociación.**

Inicialmente se debe preparar la solución del polímero como se describió en el apartado anterior. Para el tratamiento 1:1 se emplea una solución a una concentración de 64µg/mL; para el tratamiento 1:2 la concentración de polímero

debe ser de 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; y para el tratamiento 1:2 la concentración de la solución polimérica debe ser de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Una vez obtenida la solución deseada según el tratamiento a preparar, se deben pesar 6,4mg de ampicilina trihidrato en estado sólido con la ayuda de una balanza analítica, y a continuación agregarlos a la solución ya preparada, que contiene el polímero (nota: previamente se debe verificar que esta se encuentre a temperatura ambiente para que no se dé la degradación el antibiótico). Seguidamente, se tapa y se rotula la solución, para facilitar la disolución del antibiótico, se hace uso del vortex hasta que este se encuentre totalmente disuelto en el medio. Los tratamientos deben ser almacenados en nevera a 4°C y se deben utilizar al día siguiente de la adición del antibiótico a la solución.

## Anexo 2

### Determinación de grupos Dimetilaminoetil (DMAE) ionizables.

Se determinó la cantidad de grupos amino presentes en el polímero adaptando la metodología reportada en la farmacopea estadounidense vigente <541> (United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 36-NF31), 2014) y reportada por el fabricante (Evonik, 2007) para el producto Eudragit® E-100:

Se tomaron 50 mg de Eudragit® RL-PO y se disolvieron en 29 mL de ácido acético glacial y 1 mL de agua, para titular se utilizó una solución 0,1 N de ácido perclórico en ácido acético glacial.

Para la determinación del porcentaje de grupos dimetilaminoetil por gramo de polímero, se emplearían las siguientes ecuaciones (Evonik, 2007), pero es necesario recordar que la cantidad, en mL, empleada para titular la solución de polímero, no se pudo determinar debido a que fue demasiado pequeña menor a 1 µL de solución titulante, por lo cual no fue posible determinar la cantidad de estos grupos presentes en la solución ya que no se presentaban o su cantidad fue demasiado pequeña.

$$\text{Valor básico} \left( \frac{\text{mgKOH}}{\text{g de DS}} \right) = \frac{\text{ml de sln } 0,1\text{N HClO}_4 \times 207,72}{\text{peso de la muestra} \times \%DS}$$

$$\%DMAE = \text{valor básico} \times 2,701$$

### DETERMINACIÓN DE GRUPOS ÁCIDO METACRÍLICO

Esta metodología fue adaptada de la metodología de titulación potenciométrica referenciada en la farmacopea estadounidense vigente <541> (United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 36-NF31), 2014) para este tipo de polímero.

Se tomaron 50 mg de Eudragit® RL-PO y se disolvieron en 50 mL de una mezcla alcohol isopropílico/agua(3:2) y se realizó la titulación utilizando una solución de NaOH 0,5 N.

Para la determinación del porcentaje de ácido metacrílico presente en la solución acuosa, se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Ácido Metacrílico} = \frac{\text{mL sln } 0,5\text{N NaOH} \times 430,45}{\text{peso de la muestra} \times \%DS}$$

El porcentaje de materia seca (%DS) según los parámetros de calidad del producto es del 98% (Evonik, 2007) .