

**Nanoencapsulación de ofloxacina y vancomicina con ácido poliláctico-co
glicólico (PLGA) y su evaluación antimicrobiana *in vitro* contra
Staphylococcus aureus resistente a meticilina y *Escherichia coli* O157:H7**

ANDERSON RODRÍGUEZ AGUILLÓN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

**Nanoencapsulación de ofloxacina y vancomicina con ácido poli láctico-co-
glicólico (PLGA) y su evaluación antimicrobiana *in vitro* contra
Staphylococcus aureus resistente a meticilina y *Escherichia coli* O157:H7**

ANDERSON RODRÍGUEZ AGUILLÓN

**Trabajo de grado presentado como requisito
para optar al título de químico**

Dirigido por:

RODRIGO TORRES SAEZ *Ph.D*

Escuela de Química

Codirigido por:

Dra. CLAUDIA ORTIZ LÓPEZ

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

DEDICATORIA

Al señor Jesucristo que siempre me brindó las oportunidades y los valores necesarios para culminar este proyecto.

Quiero dedicar este trabajo a mi madre, Magnolia Aguillón Orduz quien con su infinito amor y constante apoyo me permitió alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi madre, mis tías, primas, primos y amigos por todo el apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, por brindarme la oportunidad de estudiar y consolidar mi proyecto de formación. En especial a aquellos profesores que creyeron en mí como el Doctor Rodrigo Torres y la Doctora Claudia Cristina Ortiz, quienes durante el desarrollo de este proyecto sentí como mi familia.

A la Doctora Elena Stashenko quien gracias a su amabilidad, formación y consejos contribuyeron a la realización de este proyecto.

A todo mis compañero del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, GIBIM, por todo el gran aprecio, paciencia y colaboración durante mi permanencia en el grupo.

También quisiera agradecer a mis más cercanos compañeros Luis Carlos Vega, Diana Montagud, Yadira Sandoval y Erik Fernanda Rodríguez.

A Mónica Tatiana Herrera Gamboa por brindarme tantos momentos felices.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	16
MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES	18
1.1 NANOTECNOLOGÍA	18
1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (NPS)	19
1.3. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI- LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)	22
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS NPS	25
1.4.1 Tamaño y distribución de NPs	26
1.4.2 Morfología	26
1.4.3 Carga superficial	27
1.4.4 Eficiencia de encapsulación	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GENERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	29
3.2 MICROORGANISMOS	29
3.3 MÉTODOS	29
3.3.1 Preparación de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLG ...	29
3.3.2 Caracterización fisicoquímica de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA.	30
3.3.2.1 Tamaño y distribución de tamaño	30

3.3.2.3 Carga superficial	31
3.3.2.2 Morfología	31
3.3.2.4 Eficiencia de encapsulación.....	31
3.3.2.4.1 Cuantificación de vancomicina en NPs-PLGA	32
3.3.2.4.2 Cuantificación de ofloxacin en NPs-PLGA	33
3.3.1 Determinación del efecto antibacteriano de los antibióticos libres y encapsulados en NPs de PLGA.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 DETERMINACIÓN DE DIÁMETRO HIDRODINÁMICO PROMEDIO Y LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS.....	35
4.2 DETERMINACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL	38
4.3 DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ASPECTO	40
4.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN	42
4.5 PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS.....	44
4.5.1 Determinación del CMI y CMB de vancomicina libre y encapsulada en NPs de PLGA frente a SARM.....	45
4.5.1 Determinación del CMI y CMB de vancomicina libre y encapsulada en NPs de PLGA frente a SARM.....	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BILIOGRAFÍA	52
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas usadas en aplicaciones biomédicas	19
Figura 2. Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesferas	20
Figura 3. Representación esquemática del método de emulsión/evaporación de solvente	23
Figura 4. Representación esquemática del método de nanoprecipitación	25
Figura 5. Histogramas de la distribución de tamaño de ofloxacina (A) y vancomicina (B) encapsulada en NPs de PLGA	38
Figura 6. Morfología de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA, gelatina (A) como aditivos; (C) ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA, empleando PEI como aditivo (B) y en ausencia de un polímero, OFL-PLGA-C, (C)..	41
Figura 7. Cinética de crecimiento de SARM en presencia de vancomicina libre (A) y encapsulada en NPs de PLGA, VAN-PLGA-C (B). .	46
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de ofloxacina libre (A) y encapsulada en NPs de PLGA (B)..	48

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Productos aprobados por la FDA para el desarrollo de sistemas de envío de fármacos utilizando PLGA	22
Tabla 2. Parámetros de cuantificación de vancomicina empleando RP-HPLC	32
Tabla 3. Diámetro hidrodinámico y distribución de tamaños de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA en función del aditivo utilizado	36
Tabla 4. Medidas de potencial zeta de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA en función del aditivo utilizado	39
Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de ofloxacina y vancomicina en NPs de PLGA	42
Tabla 6. Características fisicoquímicas de vancomicina y ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA	44
Tabla 7. Actividad <i>in vitro</i> de vancomicina libre y encapsulada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)	46
Tabla 8. Actividad <i>in vitro</i> de ofloxacina libre y encapsulada frente a <i>E. coli</i> O157:H7	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO A Curvas de calibración	59
ANEXO A2. Curvas de calibración de ofloxacina mediante espectroscopia de fluorescencia	60
ANEXO B. Cálculo de porcentaje de inhibición bacteriana	61

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A/O/A	Emulsión agua/aceite/agua
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión de cerebro y corazón)
BSA	Bovine serum albumin (Albumina de suero bovino)
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DAD	Diode Array Detector (Detector de arreglo de diodos)
dH	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dynamic Light scattering (Dispersión de luz en modo dinámico)
DS	Desviación estándar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Eficiencia de Encapsulación
FDA	Food Drug Administration
GEL	Galantina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IP	Índice de Poli-dispersión
LB	Luria-Bertani
MC	Masa de corte
MH	Mueller-Hinton
NPs	Nanopartículas poliméricas
OFL	Ofloxacin
%P/V	Porcentaje peso-volumen
PEI	Polietilenimina
PLA	Ácido poli-láctico
PLGA	Acido poli-láctico-co-glicólico
PM	Peso molecular

PR-HPLC	Reversed phase HPLC (HPLC de fase reversa)
PVA	Acetato de polivinilo
PZ	Potencial zeta
RPM	Revoluciones por minuto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
SEM	Scanning Electron Microscope (Microscopio electrónico de barrido)
STEM	Scanning transmission electron microscope (Microscopía Electrónica De Barrido En Modo De Transmisión)
TEM	Transmission electron microscopy (Microscopio electrónico de barrido)
Tg	Temperatura de transición vítrea
VAN	Vancomicina
%V/V	Porcentaje volumen-volumen

RESUMEN

TITULO Nanoencapsulación de ofloxacina y vancomicina con ácido poliláctico-co glicólico (PLGA) y su evaluación antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina y *Escherichia coli* O157:H7*

Autor: RODRÍGUEZ AGUILLÓN, Anderson**

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas de ácido poli-láctico-co-glicólico (NPs PLGA), nanoprecipitación, Concentración mínima inhibitoria (CMI), vancomicina , ofloxacina

DESCRIPCIÓN

Se realizó la síntesis de vancomicina y ofloxacina encapsulados en nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico-co-glicólico (NPs PLGA) utilizando el método de nanoprecipitación. Con el objetivo de modificar la carga superficial de los antibióticos nanoencapsulados, se emplearon 3 tipos de polímeros catiónicos: gelatina, polietilimina y albúmina de suero bovino. Las características físicas y químicas de los antibióticos encapsulados en NPs PLGA fueron evaluadas mediante técnicas como: dispersión de luz en modo dinámico (DLS), microscopía de barrido electrónico (SEM), medidas de potencial zeta, espectroscopia de fluorescencia y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los diferentes antibióticos encapsulados en NPs PLGA se obtuvieron como líquidos blancos de aspecto lechoso, con tamaños entre los 100-300 nm e índices de polidispersión entre los 0,090-0,148. Se evaluó la actividad antimicrobiana de muestras de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en NPs de PLGA frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) y *E. coli* O157:H7 empleando el método de microdilución en caldo. Se observó que encapsular vancomicina en NPs PLGA con carga positiva, la actividad del antibiótico aumentó considerablemente. Sin embargo, al evaluar la actividad frente *E. coli* O157:H7 de ofloxacina libre y encapsuladas en NPs de PLGA con carga negativa, no se observaron diferencias significativas.

* Proyecto de grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Codirectora: Claudia Ortiz López.

ABSTRACT

TITLE: Encapsulation of vancomycin and ofloxacin in PLGA nanoparticles and its antimicrobial activity *in vitro* against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus**

AUTHOR: RODRÍGUEZ AGUILLÓN, Anderson**

Keywords: Poly lactide-co-glycolide nanoparticles (PLGA NPs), nanoprecipitation, Minimum Inhibitory concentration, Vancomycin, Ofloxacin.

DESCRIPTION

In this thesis, vancomycin and ofloxacin were loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles (PLGA NPs) by nanoprecipitation method. We used three different cationic polymers: polyethyleneimine, gelatin and BSA with the goal to modifying nanoparticle's surface charge. Antibiotics loaded PLGA NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), zeta potential and fluorescence measurements, and by high performance liquid chromatography (HPLC). Different antibiotics loaded PLGA nanoparticles were obtained as white milky liquids, with sizes (z-average) ranging from 100-300 nm and polydispersion index between 0.090 and 0.148, and zeta potential values between -22 and 27 mV. The antimicrobial activity of the samples of vancomycin and ofloxacin, free and loaded PLGA nanoparticles, was investigated against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *E. coli* O157:H7 strains by broth microdilution method. We observed that PLGA nanoparticles loaded vancomycin improved the antimicrobial activity against MRSA due to electrostatic interactions between bacteria cell wall negatively charged and surface of nanoparticles positively charged. However, when PLGA nanoparticles negatively charged and loaded with ofloxacin were evaluated in antimicrobial tests against *E. coli* O157:H7, no significant differences were observed.

* Project Grade

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Codirectora: Claudia Ortiz López.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas poliméricas (NPs) se definen como sólidos de partículas coloidales a base de polímeros (sintéticos, semisintéticos o naturales) u otros materiales de naturaleza biodegradable, que sirven de vehículo para fármacos y otras sustancias (Mora-Huertas, Fessi, y Elaissari, 2010). En la actualidad, existe una gran variedad de métodos para la síntesis de NPs, incluyendo técnicas como: emulsión/evaporación de solvente, doble emulsión, nanoprecipitación y *salting out*. (Reis y Neufeld, 2006).

Se han utilizado una amplia variedad de materiales para la síntesis de NPs, siendo éstos tanto sintéticos como naturales. Polímeros sintéticos como el ácido poli láctico-co-glicólico, PLGA, y el ácido poli láctico, PLA, han sido ampliamente utilizados en la liberación controlada de fármacos encapsulados, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Mundargi, Babu, Rangaswamy, Patel, y Aminabhavi, 2008). Además, estos polímeros han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la elaboración de sistemas poliméricos en la administración de sustancias activas por vía parenteral (Danhier *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha demostrado la eficiencia de los agentes antimicrobianos tradicionales en el tratamiento de enfermedades infecciosas. No obstante, el uso inadecuado de los antibióticos, dosis excesivas, interrupción prematura del tratamiento, el uso de combinaciones inapropiadas y la toxicidad celular de algunos antibióticos han generado complicaciones, ocasionando el fracaso terapéutico y desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Maguiña Vargas, Ugarte Gil, y Montiel, 2006).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se ha planteado el uso de nanopartículas poliméricas como una alternativa para facilitar la administración

de compuestos antimicrobianos. En general, el uso de nanopartículas poliméricas ha generado gran interés en el desarrollo de sistemas innovadores para la administración de fármacos, ofreciendo ventajas como reducir los efectos secundarios y mejorar la eficacia de los fármacos, debido a la posibilidad de orientar el principio activo hacia órganos o células específicas (Bender et al., 2012). Además, la nanoencapsulación permite reducir la toxicidad del fármaco y retrasar su degradación química y enzimática (Jornada *et al.*, 2012).

El presente trabajo describe la síntesis y caracterización de vancomicina (VAN) y ofloxacina (OFL) encapsulados en NPs de PLGA, empleando el método de nanoprecipitación. Además, se estudió el efecto de polímeros catiónicos como: gelatina (GEL), polietilenimina (PEI) y albúmina de suero bovino (BSA) sobre la modificación de la carga superficial de las NPs de PLGA. Posterior a la síntesis de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA, se evaluó la actividad antibacteriana sobre cepas patógenas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

1.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es la habilidad de trabajar a nivel atómico, molecular y supramolecular (en una escala de 1- 1000nm) con el fin de entender, crear y utilizar materiales, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones, como resultado de su pequeña estructura (Roco, 2003). A esta escala, la materia presenta propiedades físico-químicas que han permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones en diversos campos(Balogh, 2010).

Las primeras aplicaciones prácticas de la nanotecnología se pueden remontar a los avances en las comunicaciones, la ingeniería, la física, la química, la biología, la robótica y la medicina (Faraji y Wipf, 2009). Sin embargo, el desarrollo de un amplio espectro de tecnologías a nanoescala está empezando a cambiar el panorama científico en términos de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades. Estas innovaciones tecnológicas, definidas como nanomedicina por el Instituto Nacionales de Salud de EE.UU. (*National Institutes of Health*), tienen el potencial de convertir los descubrimientos moleculares derivados de la genómica y la proteómica en un beneficio generalizado para los pacientes (Singh y Lillard, 2009).

Se espera que los productos de la nanotecnología revolucionen la medicina moderna, como resultado de los avances científicos y las iniciativas mundiales por apoyar la nanotecnología y la investigación en nanomedicina(Farokhzad y Langer, 2009). Una de las áreas con mayor impacto es el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, debido a su versatilidad en la orientación de fármacos

hacia tejidos específicos, el acceso a dianas moleculares profundas, y el control de la liberación del fármaco(Gupta y Kompella, 2006).

Actualmente, se ha estudiado una gran variedad de nanomateriales como plataforma para el transporte de fármacos, utilizados en aplicaciones industriales y académicas(Acharya y Sahoo, 2011). La creación de materiales nanoestructurados como: nanopartículas poliméricas, micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono y nanocristales (ver figura 1), ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones en el campo biomédico(Faraji y Wipf, 2009).

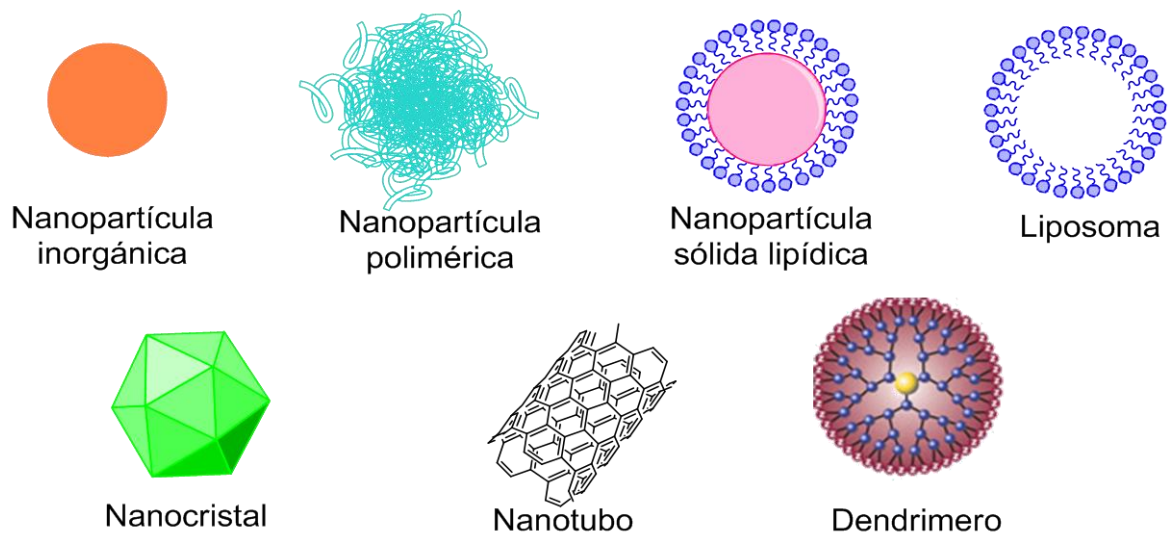


Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas usadas en aplicaciones biomédicas(Faraji y Wipf, 2009).

1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (NPS)

Las nanopartículas poliméricas (NPs) se definen como partículas sólidas coloidales, en las cuales, el fármaco (o principio activo a encapsular) se encuentra disperso dentro de una matriz polimérica amorfa (Hans y Lowman, 2002).

Las NPs pueden ser clasificadas como nanoesferas, en las que el fármaco se dispersa uniformemente por toda la matriz polimérica (típicamente como una solución sólida), o como nanocápsulas, en las que el fármaco está presente en el núcleo de la partícula (ya sea como un sólido en solución acuosa o en aceite) (ver figura 2). Además, de acuerdo con los métodos de preparación, las NPs también pueden llevar la sustancia activa en su superficie o embebida en la membrana polimérica (Kumari, Yadav, y Yadav, 2010; Mora-huertas, Fessi, y Elaissari, 2010).

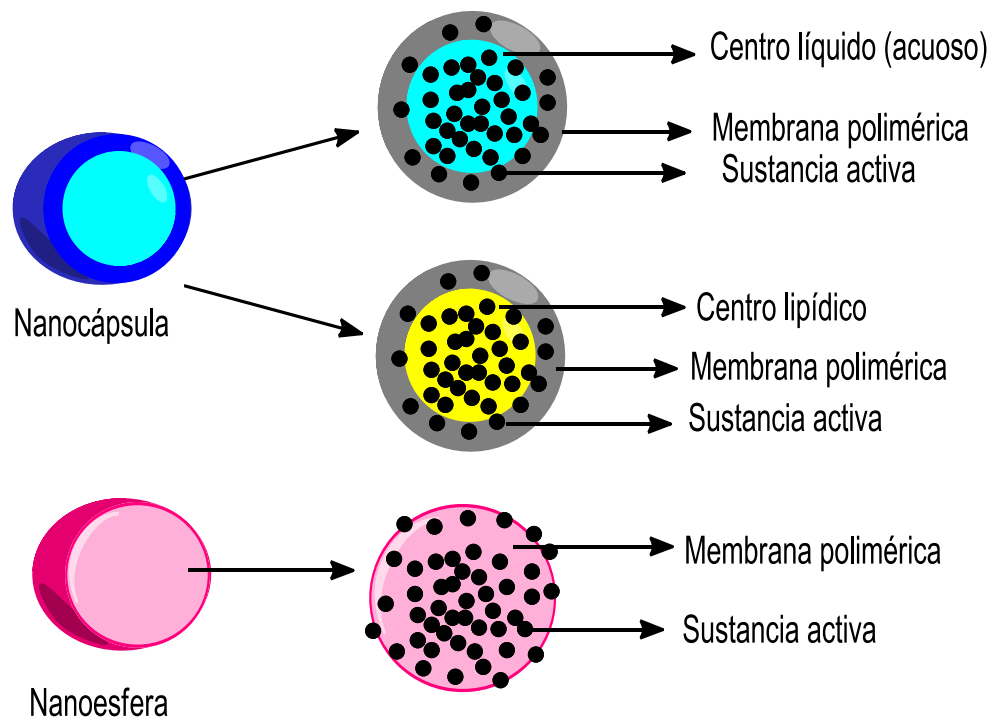


Figura 2. Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesferas (Kumari *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista tecnológico, las nanopartículas poliméricas presentan una serie de ventajas:

- Alta estabilidad
- Pueden transportar una amplia variedad de fármacos
- Capacidad de incorporación de sustancias tanto hidrófilas como hidrófobas

➤ Propiedades de liberación controlada

Estas cualidades permiten mejorar la biodisponibilidad del fármaco, modificación de los perfiles farmacocinéticos y especificidad de acción y penetración intracelular de fármacos macromoleculares (Soppimath, Aminabhavi, y Kulkarni, 2001).

Se han utilizado una amplia variedad de materiales sintéticos y naturales para la preparación de NPs. Entre los polímeros sintéticos destacan los poliésteres, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Feng, 2004). Los poliésteres más utilizados son el ácido poli láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico, denominado ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA, por sus siglas en inglés *acid poly lactic-co-glycolic*), aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parental (Vauthier y Bouchemal, 2009). Por otro lado, a través de la modificación del peso molecular, el grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los monómeros, es posible controlar características como: la velocidad de degradación de los mismos, el porcentaje de encapsulación y la liberación del fármaco o principio activo (Lassalle y Ferreira, 2007). Otros polímeros empleados para la obtención de NPs son la poli- ϵ -caprolactona (PCL) (Ray et al., 2003), el poli- β -hidroxibutirato y el ácido β -L-málico.

El PLGA es uno de los polímeros sintéticos más utilizados para la administración de fármacos (Makadia y Siegel, 2011). Dentro de sus principales características se encuentran: (i) su biodegradabilidad y biocompatibilidad, (ii) copolímero aprobado por la FDA y de la Agencia Europea de Medicina (EMA) para sistemas de administración de fármacos por vía parental (iii) capacidad para encapsular una gran variedad de fármacos o moléculas con actividad biológica; (iv) posibilidad de proteger al fármaco frente a la degradación (v) habilidad para generar sistemas de liberación sostenida; (vi) posibilidad de modificar las propiedades superficiales

para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos y (vii) direccionar el principio activo hacia órganos o células específicas (Danhier et al., 2012; Dinarvand, Sepehri, Manoochehri, Rouhani, y Atyabi, 2011).

Durante las últimas dos décadas, el PLGA se ha convertido en material para el desarrollo de nuevos sistemas para el reparto de fármacos y algunos de éstos ya se encuentran en el mercado (ver tabla 1) (Zhang, Chan, y Leong, 2013).

Tabla 1. Productos aprobados por la FDA para el desarrollo de sistemas de envío de fármacos utilizando PLGA.

Nombre del producto	Año de aprobación	Tecnología	Indicación
Zoladex	1989	PLGA/acetato de goserelina	Cáncer de próstata y de mama
Lupron Depot	1989	PLGA / acetato de leuprolida	Cáncer de próstata y la endometriosis
Sandostin LAR	1998	Glucosa-PLGA/ acetato de octeótrido	Acromegalia
Nutropindepot	1999	PLGA/hormona recombinante del crecimiento humano	Deficiencia de hormona del crecimiento
Trelstar	2000	PLGA/triptorelina pamoatea	Cáncer de próstata avanzado
Arestin	2001	PLGA/minocilina	Periodontitis en adultos
Eligard	2002	PLGA/acetato de leuprolida	Cáncer de próstata avanzado
Risperdal Consta	2003	PLGA/risperidona	Esquizofrenia y el trastorno bipolar I
Vivitrol	2006	PLGA/naltrexona	Dependencia al alcohol y opioides
Somatulina	2007	PLGA/lanreotido	Acromegalia
Ozurdex	2009	PLGA/dexametasona	Edema macular

1.3. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)

De acuerdo con las características fisicoquímicas del fármaco, existe una gran variedad de métodos para la síntesis de NPs de PLGA. La elección del método determinará características fisicoquímicas y estructurales como: su naturaleza

(nanocápsula o nanoesfera) tamaño, carga y porcentaje de encapsulación (Reis y Neufeld, 2006).

Una de las técnicas más utilizadas es el método de emulsión/evaporación de solvente, la cual consiste de dos fases inmiscibles entre sí: una fase orgánica (O) donde el PLGA y el fármac son disueltos en un solvente orgánico (por ejemplo, diclorometano o cloroformo), y una fase acuosa (A), conformada principalmente por un agente estabilizante (PVA o poloxámero-407). La emulsión (O/A) se forma al añadir la fase orgánica sobre la fase acuosa y homogenizar la mezcla inmiscible por medio de un equipo de homogenización o sonicación. Finalmente, el disolvente se evapora o se extrae, y las nanopartículas se purifican por centrifugación (ver figura 3). Esta técnica permite la encapsulación de moléculas hidrófobas (Holgado et al., 2008).

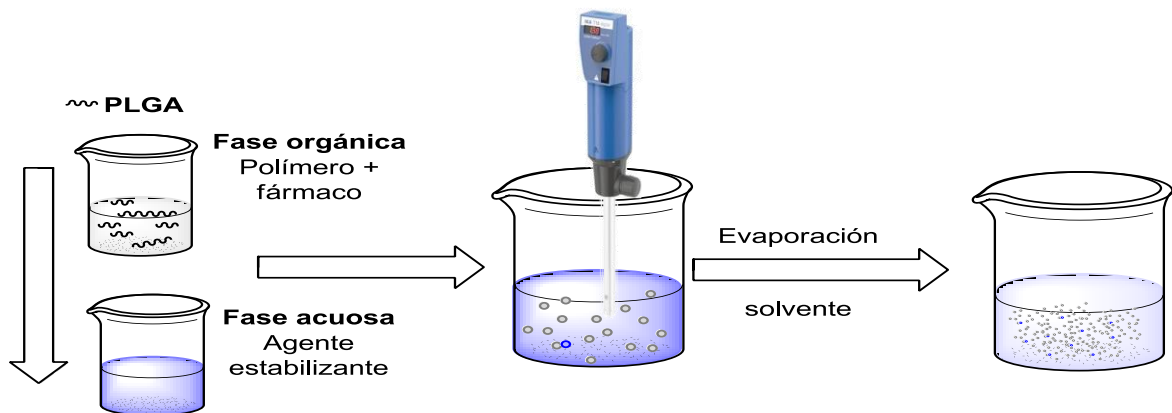


Figura 3. Representación esquemática del método de emulsión/evaporación de solvente

Una modificación de la técnica emulsión/evaporación de solvente es la técnica de doble emulsión (A/O/A), empleada para encapsular fármacos hidrófilos (por ej. péptidos, proteínas y ácidos nucleicos). En general, la técnica de doble emulsión consiste en la emulsificación de una emulsión previamente preparada. En primer lugar, la fase acuosa (A) en la cual el principio activo y el agente estabilizante están disueltos se añade a una fase orgánica donde se encuentra disuelto el polímero, para formar una emulsión (A/O) por medio de un homogenizador o un

sonicador. Finalmente, se añade otra fase acuosa (que puede contener un agente estabilizante) a la primera emulsión y se somete a las mismas condiciones (homogenización o sonicación) para formar una segunda emulsión (A/O/A) (Cohen-Sela, Chorny, Koroukhov, Danenberg, y Golomb, 2009; Jain, 2000; Morahuertas *et al.*, 2010).

Otra técnica para la síntesis de NPs de PLGA es el método de nanoprecipitación o desplazamiento de solvente. El método de nanoprecipitación fue introducido por Fessi y colaboradores (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, y Benita, 1989), con el propósito de desarrollar un protocolo simple y rápido para la síntesis de NPs.

En general, el método de nanoprecipitación permite la encapsulación de fármacos (hidrófobos e hidrófilos) y la formación de NPs pequeñas (entre 100 y 300 nm) con un bajo índice de polidispersión (Bilati, Allémann, y Doelker, 2005). Sin embargo, este tipo de propiedades van a depender de parámetros como: la naturaleza del solvente o mezcla de solventes, la concentración del polímero, el peso molecular del polímero y el pH de la fase acuosa (Schubert, Delaney, y Schubert, 2011).

Además, la técnica de nanoprecipitación involucra la presencia de dos fases miscibles denominadas solvente y no solvente, llamados en la mayoría de los casos fase orgánica y fase acuosa. En la fase orgánica el polímero, el fármaco, y de manera opcional un estabilizante lipofílico son disueltos en un solvente polar miscible en agua, como acetona o etanol (ver figura 5).

Durante la síntesis, la fase orgánica es añadida gota a gota a la fase acuosa, la cual contiene un surfactante (PVA o poloxámero-407), provocando la precipitación del polímero debido a la rápida difusión del solvente orgánico en el medio acuoso y, la formación de la emulsión de manera espontánea (Vauthier y Bouchemal,

2009). Finalmente, se realiza la eliminación del solvente y se purifican las NPs utilizando técnicas como centrifugación o ultrafiltración.

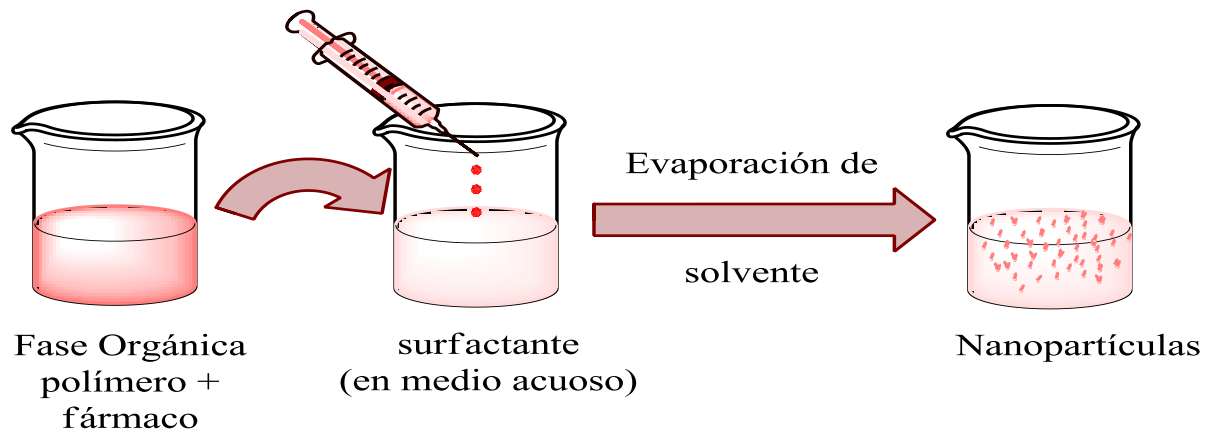


Figura 4. Representación esquemática del método de nanoprecipitación (Reis y Neufeld, 2006).

Existen otras técnicas para la elaboración de NPs como *spray-drying* (Gavini et al., 2004; Wang, Kho, Cheow, y Hadinoto, 2012), *salting out* (Ibrahim, Bindschaedler, Doelker, Buri, y Gurny, 1992) o a través de fluidos supercríticos (Cocero, Martín, Mattea, y Varona, 2009). En los métodos descritos anteriormente, el fármaco puede incorporarse de dos formas: (i) durante la formación de las NPs o (ii) por adsorción en las NPs después de su formación.

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS NPS

Una vez obtenidas las NPs, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas se convierte en un paso fundamental para el desarrollo de futuras aplicaciones (Dinarvand *et al.*, 2011). La caracterización fisicoquímica consiste en evaluar propiedades como: tamaño promedio, distribución de tamaño (índice de polidispersión) y carga superficial de las NPs; además, medidas del fármaco encapsulado tales como: porcentaje de encapsulación, cinética de liberación,

estudios *in vitro* e *in vivo* que revelen la biodistribución del fármaco, biodisponibilidad y eficacia de la droga encapsulada (Bala, Hariharan, y Kumar, 2004).

1.4.1 Tamaño y distribución de NPs. Una de las técnicas que proporciona una medida del tamaño hidrodinámico de las NPs, es la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés, dynamic light scattering) (Walker, 2011). En DLS, la emulsión es iluminada por un láser monocromático y la intensidad de dispersión se registra con un detector de fotones en un ángulo de dispersión fijo o variable. La intensidad de luz dispersada es dependiente del tiempo, en una escala de tiempo de microsegundos debido al movimiento browniano de las nanopartículas. Esto provoca un efecto Doppler cuando la luz incide en la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda incidente. Este cambio es relacionado al tamaño de la NPs (Walker, 2011).

1.4.2 Morfología. El estudio morfológico de las NPs se realiza a través de técnicas de microscopía electrónica como SEM (por sus siglas en inglés, scanning electron microscopy); este tipo de técnicas permiten observar de manera directa las NPs y, corroborar la información de tamaño promedio de las NPs obtenido por otras técnicas como DLS (Sahoo y Labhasetwar, 2006; Walker, 2011). La técnica de SEM consiste en que un haz de electrones altamente energéticos incide sobre la muestra, la irradiación de la muestra afecta el haz de electrones, y estas interacciones se detectan y transforman en una imagen (Bala et al., 2004).

1.4.3 Carga superficial. Otra característica importante de las NPs es la carga superficial, determinada mediante la cuantificación del potencial zeta (ξ) de la emulsión. La determinación de carga superficial se realiza estudiando la movilidad de las partículas cargadas a través de un potencial eléctrico. Los valores del potencial zeta de las NPs pueden ser positivos o negativos dependiendo de la naturaleza del polímero o el material usado para modificar la superficie (Soppimath et al., 2001). Los valores del potencial zeta representan un índice de la estabilidad de las NPS, y cuanto mayor sea el valor absoluto de potencial zeta mayor es carga en la superficie de las NPs, aumentado de esta manera la estabilidad de las NPs debido a las repulsiones electroestáticas (Mohanraj y Chen, 2006).

1.4.4 Eficiencia de encapsulación. La eficiencia de encapsulación (EE) es la relación entre la cantidad del fármaco encapsulado y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación (Formiga *et al.*, n.d.). La EE revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la centrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos, dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría UV-VIS, HPLC, fluorescencia, etc.) (Govender, Stolnik, Garnett, Illum, y Davis, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar sistemas de nanoencapsulación para vancomicina y ofloxacina, utilizando ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) con posible actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* O157:H7.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar la metodología para la nanoencapsulación de los medicamentos utilizando PLGA.

Evaluar las propiedades fisicoquímicas (porcentaje de encapsulación, tamaño y carga) de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA, a través de técnicas espectrofotométricas, ópticas y medidas de potencial zeta.

Determinar *in vitro* la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA frente a SARM y *E. coli* O157:H7.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

El ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA 50:50, PM 38000-54000 Da), poloxámero 407, clorhidrato de vancomicina de *Streptomyces orientalis*, ofloxacina, polietilenimina (%50 v/v en solución acuosa, PM 2000), fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St Louis, Missouri). Los medios de cultivos fueron obtenidos de Oxoid. D-(+)-glucosa fue obtenida de Merck Novabiochem. La acetona fue adquirida de Panreac. Todos los reactivos usados eran de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Agua MilliQ con resistividad de 18.3 MΩ fue usada para la preparación de todas las soluciones.

3.2 MICROORGANISMOS

La bacteria *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina fue obtenida de la Escuela de Bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparación de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA. Se realizó la nanoencapsulación de vancomicina y ofloxacina utilizando el método de nanoprecipitación (Barichello, Morishita, Takayama, y Nagai, 1999). Se utilizaron polímeros catiónicos tales como: polietilenimina (PEI), gelatina (GEL) y albúmina de suero bovino (BSA), en concentraciones de 0,2 % v/v, 0, 1% p/v y 0,05% p/v, respectivamente.

Para la obtención de los antibióticos encapsulados se preparó una fase orgánica compuesta por 50,0 mg de PLGA y 2,5 mg del antibiótico (ofloxacina o vancomicina) disueltos en 5 mL de acetona. Con el fin de favorecer la encapsulación de la vancomicina (antibiótico hidrofílico) se disolvió en 150,0 μ L de HCl 0,1M a pH 4,0 antes de disolver la vancomicina en el solvente orgánico.

A continuación, se añadieron los 5 mL de la fase orgánica empleando una jeringa sin émbolo, ubicando directamente la aguja sobre el medio acuoso, el cual contiene poloxámero 407 (0,5 %p/v) y uno de los polímeros catiónicos (PEI, GEL o BSA), manteniendo agitación magnética, hasta formar una solución turbia de aspecto lechoso. A continuación, se evaporó la acetona empleando un destilador a presión reducida, y se concentró la muestra hasta un volumen de 10 mL.

Finalmente, se purificaron los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA empleando un filtro de exclusión de tamaño AMICON (MWDC=10 KDa) mediante centrifugación a 5000 rpm y 4°C.

3.3.2 Caracterización fisicoquímica de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA. Se realizó la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs PLGA: tamaño y distribución de tamaño, carga superficial, morfología y eficiencia de encapsulación.

3.3.2.1 Tamaño y distribución de tamaño. La determinación del tamaño promedio y la distribución de tamaños hidrodinámicos de las NPs se realizaron a 25°C usando la técnica de dispersión de luz dinámica DLS, con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS de la Universidad Industrial de Santander.

En cada experimento se tomó un volumen de muestra de 20 μ L y se diluyó con agua desionizada (previamente filtrada usando filtros Millipore® de 0,45 μ m) hasta un volumen de 2mL.

3.3.2.2 Carga superficial. Se cuantificó la carga superficial vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA a través de medidas de potencial zeta. Las medidas del potencial zeta se llevaron a cabo en el equipo Zetasizer Nano-ZS, en muestras diluidas (1:2000 muestra-agua) y ajustadas a un pH de 7,4. Cada una de las medidas se tomó por triplicado.

3.3.2.2 Morfología. Se realizó el estudio de las características morfológicas de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA utilizando un microscopio de barrido electrónico (FE-SEM, QUANTA FEC 650) que posee un detector de electrones secundario, mediante el modo STEM, el cual está ubicado en el Parque Tecnológico Guatiguará, de la Universidad Industrial de Santander. Para la preparación de la muestra, se tomaron 10 µL de la NPs PLGA purificadas y depositaron sobre un *grid* de oro (EMS, 100–400 mesh). Se evaporó el solvente acuoso de las NPs a temperatura ambiente y se analizaron las muestras empleando un voltaje de aceleración de 30 kV.

3.3.2.4 Eficiencia de encapsulación. El contenido de cada uno de los antibióticos encapsulados en las NPs de PLGA fue determinado empleando las técnicas de espectrofotometría de fluorescencia y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa RP-HPLC, respectivamente.

En general, para cada uno de los antibióticos nanoencapsulados, se calculó la eficiencia de encapsulación empleando el método directo (para vancomicina) e indirecto (para ofloxacina), de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{A_t - A_s}{A_t} * 100 \text{ (indirecto)}(1)$$

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{A_s}{A_t} * 100 \text{ (directo)}(2)$$

Donde A_t es la cantidad total del antibiótico empleado y A_s la cantidad de antibiótico sin encapsular.

3.3.2.4.1 Cuantificación de vancomicina en NPs-PLGA. Se eligió el método de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) para cuantificar de forma directa el contenido de vancomicina en las nanopartículas de PLGA, descrito por Faustino y colaboradores (Faustino y Kham, 2008). La cuantificación de vancomicina se realizó en el cromatógrafo líquido de alta resolución, Agilent, modelo 1100, equipado con una bomba cuaternaria G1311A, detector de arreglo de diodos (DAD), modelo G1315A y un inyector automático, G1321, de la Universidad Industrial de Santander. En la tabla 2, se muestran las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis.

Tabla 2. Parámetros de cuantificación de vancomicina empleando RP-HPLC.

Parámetro	Condición
Detector	UV-230 nm
Columna	C ₁₈ 250 x 4.6 mm, 5m (Zorbax GF-250)
Precolumna	C ₁₈ 3 x 4.6 mm, 5m (Zorbax DIOL 2-Pack)
Elución	Isocrática
Fase móvil	9% ACN/ 25 mM KH ₂ PO ₄
pH	3,2
Flujo	1,0 mL/min
Volumen de inyección	50,0 µL
Temperatura	25 °C

Se emplearon soluciones patrón de vancomicina con concentraciones de: 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 y 50,0 µg/mL para realizar una curva de calibración. Cada patrón fue filtrado a través de un filtro 0,22 µm (Millex®, Millipore, Barcelona, España), depositadas en viales de vidrio.

Para evaluar las muestras se separaron las NPs PLGA del antibiótico sin encapsular centrifugando la muestra a 14000 rpm durante 30 minutos. El

precipitado se lavó 3 veces con agua y se centrifugó durante 5 minutos y 14000 rpm en cada lavado. Se añadió 2 mL de diclorometano por cada 10 mg de NPs precipitadas. Las muestras se agitaron vigorosamente en un vortex durante 5 minutos para solubilizar todo el precipitado. Posteriormente, se realizó la extracción de la vancomicina en la solución orgánica empleando 10 mL de una solución de buffer fosfato 25 mM a pH 3,2 (se emplearon 3 extracciones). Las muestras se filtraron con filtros de jeringa de 0,22 μm (Millex®, Millipore, Barcelona, España) y se inyectaron en el equipo de HPLC (Özalp, Özdemir, Kocagoz, y Hasirci, 2001).

3.3.2.4.2 Cuantificación de ofloxacina en NPs-PLGA. Para la cuantificación de ofloxacina encapsulada en las NPs de PLGA, se empleó el método de espectrofotometría de fluorescencia, ya que, durante el proceso de purificación no se pudo realizar la precipitación de las mismas para su posterior extracción y cuantificación por HPLC.

La NPs PLGA se separaron de la ofloxacina sin encapsular utilizando filtros *ultraFree*, MC 10KDa, Amicon, centrifugando las muestras durante 30 minutos y 5000 rpm. El antibiótico separado se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Photon Technology International, modelo QM-40). Las intensidades de fluorescencia para cada una de las muestras fueron medidas a 483 nm (longitud de onda de emisión), usando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

3.3.1 Determinación del efecto antibacteriano de los antibióticos libres y encapsulados en NPs de PLGA. Se determinó y comparó la concentración mínima inhibitoria CMI y concentración mínima bactericida (CMB) de los antibióticos (vancomicina y ofloxacina) libre y encapsulados en NPs de PLGA, a través del método de microdilución en caldo en placas multi-pocillo de ELISA, de acuerdo con los protocolos realizados anteriormente en laboratorio GIBIM para las bacterias estudiadas (Paredes Guerrero, 2011).

Inicialmente, se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo Luria-Bertani (LB), durante 12h a 37°C y 200rpm. De igual manera, se preparó un preinóculo de SARM en caldo Muller-Hilton (MH), durante 14 horas a 37°C y 200rpm. Cada uno de los preinóculos contenía un 10% del volumen final.

Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 µL de este inóculo bacteriano durante 8 horas, en microplacas que previamente contenían diluciones acuosas de: vancomicina (0,8 – 1,2 µg/mL), ofloxacina (0,05-0.5 µg/mL) y de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA a 37°C con una agitación de 200rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La CMI fue definida como la menor concentración de antibiótico (encapsulado y sin encapsular) que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI 99 y CMI 90 corresponden a las dosis que inhibe el 99% y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de cada uno de los antibióticos vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA, se realizó por el método de nanoprecipitación empleando 3 polímeros catiónicos (PEI, gelatina y BSA), tal como se ha descrito en la sección anterior. Cada uno de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA en presencia de los polímeros catiónicos generó emulsiones de apariencia lechosa, con propiedades fisicoquímicas diferentes.

La caracterización de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA se estudió en función del tamaño promedio de la partículas, expresado como el diámetro hidrodinámico; distribución de tamaño, expresado como índice de polidispersión (IP); estudios de morfología, carga de las NPs por la medida del potencial zeta y eficiencia de encapsulación.

4.1 DETERMINACIÓN DE DIÁMETRO HIDRODINÁMICO PROMEDIO Y LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS

Se estudió el efecto de diferentes polímeros catiónicos sobre el diámetro hidrodinámico promedio de los antibióticos encapsulados en NP de PLGA. Cada uno de los polímeros catiónicos se emplearon con el fin de mejorar la interacción de las antibióticos encapsulados en NPs de PLGA frente a las bacterias *E. coli* O157:H7 y SARM, debido a la posibilidad de localizar cargas positivas sobre la superficie de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA, favoreciendo así la interacción de las mismas con la pared celular de las bacterias con carga negativa. Además, cada uno de los polímeros catiónicos empleados en la síntesis presenta baja toxicidad (Yu, Zhang, Zhou, Mao, y Gao, 2012).

Se utilizaron aditivos tales como: polietilenimina (PEI), gelatina (GEL) y albúmina de suero bovino (BSA), en concentraciones de 0,2 % v/v, 0,1% p/v y 0,05% p/v, respectivamente.

En la tabla 3, se resumen los valores del diámetro hidrodinámico promedio (dH) y la distribución de tamaños obtenidos (IP) para vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA.

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico y distribución de tamaños de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA en función del aditivo utilizado.

Muestra	Agente catiónico	dH* ± DS** nm	IP*** ±DS
OFL-PLGA-C	NE****	107 ±1	0,09 ± 0,02
OFL-PLGA-BSA	BSA (0,05 %p/v)	127 ± 2	0,12 ± 0,005
OFL-PLGA-GEL	GEL (0,1 %p/v)	ND*****	ND
OFL-PLGA-PEI	PEI (0,2% v/v)	234 ± 4	0,15 ± 0,02
VAN-PLGA-C	NE	261 ± 1	0,09 ± 0,02
VAN-PLGA-GEL	GEL (0,1% p/v)	281 ±4	0,10 ±0,06
VAN-PLGA-PEI	PEI (0,2 %v/v)	233 ± 3	0,15 ± 0,02

*dH indica diámetro hidrodinámico promedio; **DS, desviación estándar (n=3); ***IP, significa índice de poli-dispersión, el cual se expresa usando una escala de 0 a 1; OFL simboliza ofloxacina y VAN, vancomicina; ****ND, no detectado y *****NE, no empleado.

Como se puede observar, los antibióticos (ofloxacina y vancomicina) encapsulados en NPs de PLGA sin modificar (en ausencia de un polímero catiónico) mostraron un tamaños promedios de 107 y 261 nm, y un índice de polidispersión alrededor de 0,01, para ofloxacina y vancomicina, respectivamente. Al comparar los valores de tamaño obtenidos por Barichello y colaboradores para vancomicina encapsulada en NPs de PLGA (189 nm), se observó un incremento

en el tamaño de las mismas. Este incremento puede ser atribuido al mayor peso molecular del PLGA empleado en la síntesis de NPs(Astete y Sabliov, 2006).

Por otro lado, se ha observado que fármacos de naturaleza hidrófoba como la ofloxacina conducen a la formación de nanopartículas más pequeñas que las obtenidas en fármacos hidrófilos, debido a la disminución en la tensión interfacial entre la fase acuosa y la fase orgánica, lo cual se traduce en un aumento de la relación área-volumen generando partículas más pequeñas(Pillai, Somayaji, Rabinovich, Hudson, y Gonsalves, 2008).

Al estudiar el efecto de polímeros catiónicos sobre el tamaño promedio de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA, se observaron valores de diámetro hidrodinámico superiores a los obtenidos en ausencia de un polímero catiónico (ver tabla 3). Así, para cada una de las diferentes formulaciones, se obtuvieron valores de dH entre 127-234 nm para ofloxacina, y 233-281 en el caso de vancomicina. Este aumento en el tamaño promedio de las NPs de PLGA se puede deber a la adsorción de los polímeros catiónicos dentro y sobre la superficie del antibiótico nanoencapsulado durante la formación de las NPs a través de interacciones electrostáticas entre la interfase hidrófoba de las NPs de PLGA y el polímero catiónico en el medio acuoso. Sin embargo, al utilizar gelatina como polímero catiónico en la encapsulación de ofloxacina en NPs de PLGA, no se logró formar la suspensión, precipitando rápidamente en el medio acuoso. Este comportamiento, estaría indicando que se está produciendo la aglomeración de diferentes NPs de PLGA, generando partículas de mayor tamaño molecular, las cuales precipitan en el medio acuoso(Lee, Khan, y Lim, 2011).

A modo de ejemplo, la figura 5 muestra los histogramas que ilustran la distribución de tamaños obtenidos para las muestras de vancomicina (VAN-PLGA-C) y ofloxacina (OFL-PLA-C) encapsulados en NPs de PLGA.

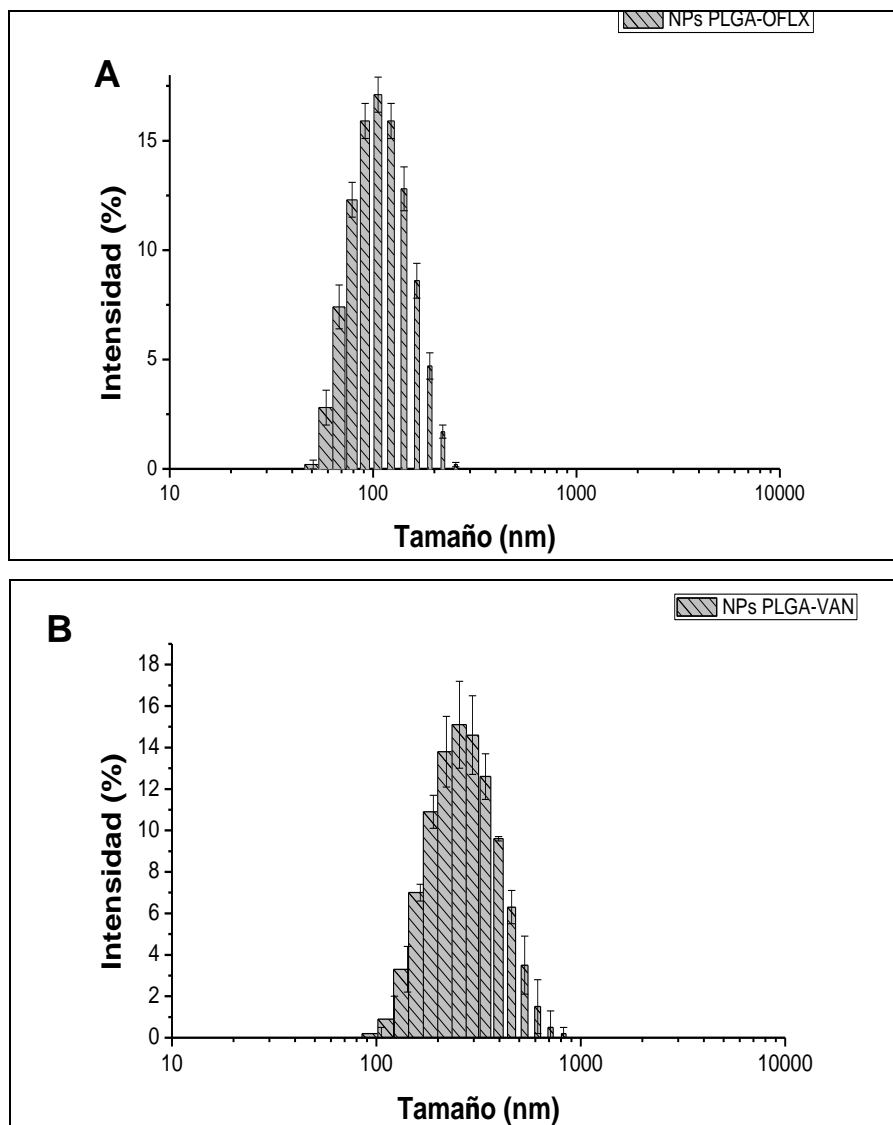


Figura 5. Histogramas de la distribución de tamaño de ofloxacina (A) y vancomicina (B) encapsulada en NPs de PLGA.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL

La carga superficial de los antibióticos encapsulados se estudió por la determinación del potencial zeta (PZ). Una carga superficial alta (negativa o positiva), es un parámetro para medir la estabilidad de las partículas en el medio, ya que una carga superficial alta conduce a una mayor repulsión electrostática en

entre las mismas, previniendo así su aglomeración (Dillen, Vandervoort, Mooter, Verheyden, y Ludwig, 2004; Mora-Huertas et al., 2010).

Se estudió el efecto de diferentes polímeros catiónicos (PEI, GEL y BSA) sobre la carga superficial de ofloxacina y vancomicina encapsulados en NPs de PLGA. En la tabla 4 se muestran los valores de PZ obtenidos.

Tabla 4. Medidas de potencial zeta de los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA en función del aditivo utilizado.

Muestra	Agente catiónico	PZ ± DS mV
OFL-PLGA-C	NE	-22,66 ± 1,00
OFL-PLGA-BSA	BSA (0,05 %p/v)	-18,20 ± 4,60
OFL-PLGA-GEL	Gelatina (0,10 %v/v)	ND
OFL-PLGA-PEI	PEI (0,2% v/v)	11,23 ± 0,20
VAN-PLGA-C	NE	-4,40 ± 0,02
VAN-PLGA-GEL	Gelatina (0,1 %p/v)	24,00±1,00
VAN-PLGA-PEI	PEI (0,2 %v/v)	27,73 ±0,37

PZ indica el potencial zeta promedio; DS, desviación estándar (n=3); OFL simboliza ofloxacina y VAN, vancomicina; ND, no detectado. NE, no empleado

Los resultados mostraron que, muestras de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA, sintetizadas en ausencia de polímeros catiónicos en el medio acuoso (OFL-PLGA-C y VAN-PLGA-C, respectivamente), presentaban valores de potencial zeta negativos (-4.4 y -22.66 mV) a pH 7.4. Se ha reportado en la literatura que NPs de PLGA presentan valores de potencial zeta negativos debido a la presencia de grupo ácidos en el polímero precursor (PLGA-COOH)(Radovic-Moreno et al., 2012). En este caso, los grupos carboxilo de las NPs de PLGA son disociados a pH 7.4 en el en medio acuoso confiriéndole una

carga negativa a la superficie de las NPs(Sahoo, Panyam, Prabha, y Labhasetwar, 2002).

Por otro lado, las diferencias en los valores de potencial zeta para vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA se deberían probablemente a la adsorción de fármaco sobre la superficie de las NPs PLGA, modificando los valores de potencial zeta obtenidos. De esta manera, para las muestras de OFL-PLGA-C, la presencia de ofloxacina (pK_a 6,05) podría disminuir los valores de PZ obtenidos a pH 7,4 (Pillai et al., 2008).

Además, se encontró que al añadir polímeros catiónicos como PEI, GEL o BSA a las NPs, se observaron diferentes valores de PZ. Para muestras como OFL-PLGA-PEI, VAN-GEL-PEI y VAN-PLGA-GEL, en las que se emplearon aditivos como PEI y GEL, los valores de potencial zeta fueron positivos para ambos antibióticos (entre 11 - 27 mV). Sin embargo, al emplear BSA como aditivo, se obtuvieron valores de PZ negativos (-18 mV).

Los valores positivos de PZ obtenidos para los antibióticos encapsulados en NPs de PLGA, modificados con PEI y GEL se deben esencialmente a la naturaleza policatiónica de estos polímeros, en cuyas estructuras se encuentra una alta densidad de grupos amino primarios, los cuales pueden ser protonados a pH 7,4.(Lallemand, Daull, Benita, Buggage, y Garrigue, 2012).

4.3 DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ASPECTO

La determinación de las características morfológicas de las muestras VAN-PLGA-GEL, OFL-PLGA-C y OFL-PLGA-PEI se realizó mediante microscopía electrónica de barrido usando electrones secundarios (SEM), a través del método STEM. En la figura 6 se muestran las imágenes obtenidas para las muestras mencionadas.

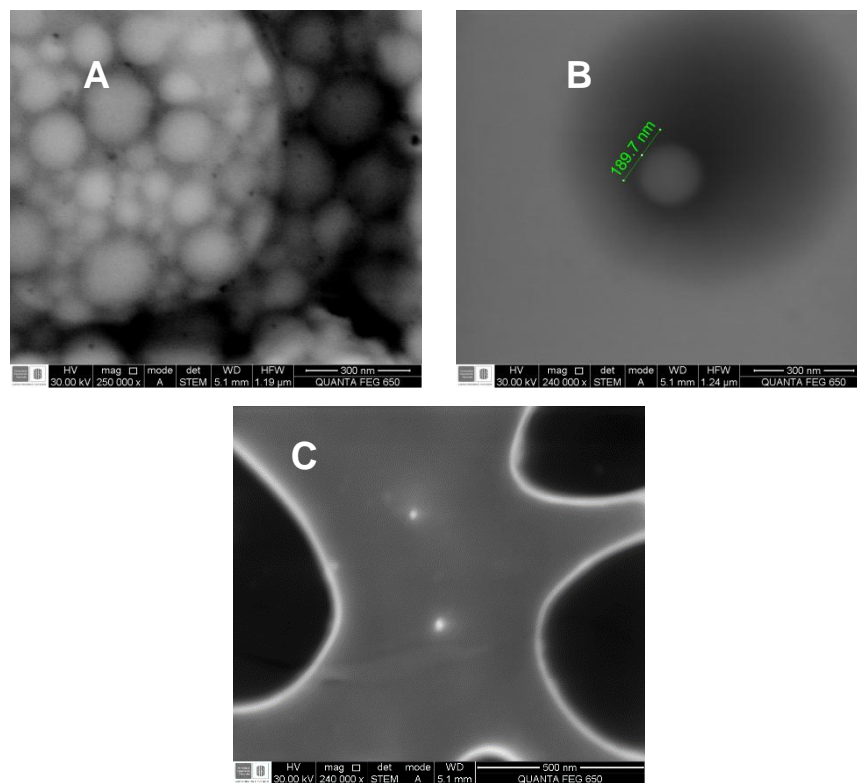


Figura 6. Morfología de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA, gelatina (A) como aditivos; (C) ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA, empleando PEI como aditivo (B) y en ausencia de un polímero, OFL-PLGA-C, (C).

Fotografía tomada por el autor empleando un equipo de microscopía SEM en el laboratorio de microscopía (sede UIS, Guatiguará).

Como se puede observar, las imágenes de SEM revelaron que las nanopartículas son de forma esférica y con una distribución homogénea. Sin embargo, no se logró diferenciar claramente una estructura del tipo núcleo-corteza, característica de las nanocápsulas. Además, las imágenes de microscopía revelan la porosidad de la película de carbono, la cual hace parte del *grid* (portamuestras) de oro.

4.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN

La determinación del contenido de ofloxacina y vancomicina encapsulados en NPs de PLGA se llevó a cabo mediante los métodos de espectroscopia de fluorescencia y HPLC, reportados en la literatura (Faustino y Kham, 2008; Özalp *et al.*, 2001; Ulu, 2009).

Se estudió el porcentaje de encapsulación en función del polímero catiónico empleado en las diferentes muestras de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en NPs de PLGA. En la tabla 5, se muestran los porcentajes de encapsulación para cada uno de los antibióticos.

Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de ofloxacina y vancomicina en NPs de PLGA.

Muestra	Antibiótico	Agente catiónico	EE %
OFL-PLGA-C	Ofloxacina	NE	33,18
OFL-PLGA-BSA	Ofloxacina	BSA (0,05 %p/v)	27,79
OFL-PLGA-GEL	Ofloxacina	Gelatina (0,1%v/v)	ND
OFL-PLGA-PEI	Ofloxacina	PEI (0,2 %v/v)	0,91
VAN-PLGA-C	Vancomicina	NE	1,98
VAN-PLGA-GEL	Vancomicina	Gelatina (0,1%v/v)	5,38
VAN-PLGA-PEI	Vancomicina	PEI (0,2 %p/v)	0,53

EE indica eficiencia de encapsulación; OFL simboliza ofloxacina y VAN, vancomicina; ND, no detectado, NE, no empleado

Las tablas y curvas de calibración de vancomicina y ofloxacina se muestran en los **ANEXOS A1 y A2.**

Se observó que al emplear PEI como polímero catiónico, los porcentajes de encapsulación no superaron el 1% en cada uno de los casos bajo las condiciones de síntesis empleadas. Al comparar los resultados obtenidos para las muestras VAN-PLGA-PEI y OFL-PLGA-C, en los que no se utilizó ningún polímero catiónico, con las muestras en las que se empleó PEI (VAN-PLGA-PEI y OFL-PLGA-PEI), la presencia de este polímero catiónico no favorece la encapsulación de vancomicina y ofloxacina, bajo las condiciones empleadas. Estos resultados sugieren que la PEI dificulta la interacción de los antibióticos con el PLGA, necesaria para la encapsulación de los mismos dentro de la membrana polimérica.

Además, se observó que para la muestra VAN-PLGA-GEL, la gelatina tuvo un efecto positivo en la encapsulación del fármaco en las NPs de PLGA (5,38 %) comparado con los resultados obtenidos en ausencia de GEL como aditivo (1,98%). La presencia de aditivos de alto peso molecular como la GEL podría disminuir la porosidad de las NPs de PLGA, impidiendo así la rápida difusión de la vancomicina a la fase acuosa.

Además, se encontró que en general los porcentajes de encapsulación para ofloxacina, comparados con los encontrados en vancomicina, fueron más altos para cada uno de los polímeros empleados. Estos resultados pueden atribuirse a la naturaleza lipofílica de la ofloxacina, cuya solubilidad en agua es de $3,46 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Ross y Riley, 1990), lo cual dificulta la difusión a la fase acuosa, y en consecuencia, que aumente el contenido del fármaco en las NPs de PLGA. Autores como Barichello y colaboradores han reportado que antibióticos altamente hidrófilos como la vancomicina presentan problemas de baja afinidad con el PLGA, generando porcentajes de encapsulación bajos, debido a la rápida difusión de la vancomicina al medio acuoso. (Barichello et al., 1999).

A partir de los resultados obtenidos para las diferentes muestras de vancomicina y ofloxacina encapsulados en NPs de PLGA, se construyó la tabla 6, la cual resume características fisicoquímicas (tamaño, carga y porcentaje de encapsulación) para cada una de las formulaciones.

Tabla 6. Características fisicoquímicas de vancomicina y ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA.

Muestra	Agente catiónico	Tamaño \pm DS nm	PZ \pm DS mV	IP \pm DS	EE %
OFL-PLGA-C	NE	107 \pm 1	-22,66 \pm 1,00	0,09 \pm 0,02	33,18
OFL-PLGA-BSA	BSA (0,05% p/v)	127 \pm 2	-18,20 \pm 4,60	0,12 \pm 0,01	27,79
OFL-PLGA-GEL	Gelatina (0,1%p/v)	ND	ND	ND	ND
OFL-PLGA-PEI	PEI (0,2% v/v)	234 \pm 4	11,23 \pm 0,20	0,15 \pm 0,02	0,91
VAN-PLGA-C	NE	261 \pm 1	-4,40 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	1,98
VAN-PLGA-GEL	Gelatina (0,1 %p/v)	281 \pm 4	24,00 \pm 1,00	0,10 \pm 0,06	5,38
VAN-PLGA-PEI	PEI (0,2 %v/v)	233 \pm 3	27,73 \pm 0,37	0,15 \pm 0,02	0,53

EE indica eficiencia de encapsulación; dH indica diámetro hidrodinámico promedio; DS, desviación estándar (n=3); PZ, potencial zeta; PI, significa índice de poli-dispersión, el cual se expresa usando una escala de 0 a 1. OFL simboliza ofloxacina y VAN, vancomicina; ND, no detectado; NE, no empleado

4.5 PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

De acuerdo con los resultados anteriores (ver tabla 6), se eligieron en términos de tamaño, carga y eficiencia de encapsulación, las muestras **VAN-PLGA-GEL** y **OFL-PLGA-C**, para realizar su evaluación antimicrobiana *in vitro* frente a SARM y *E. coli* O157:H7, respectivamente.

La determinación del efecto antibacteriano se llevó a cabo empleando el método de microdilución en caldo. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento en presencia de vancomicina y ofloxacina, libre y encapsulada en NPs de PLGA (VAN-PLGA-GEL y OFL-PLA-C, respectivamente)

4.5.1 Determinación del CMI y CMB de vancomicina libre y encapsulada en NPs de PLGA frente a SARM.

Se realizó la cinética de crecimiento de SARM en presencia de vancomicina (libre y encapsulada) a diferentes concentraciones, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Para validar el ensayo, se empleó NPs PLGA vacías como control de crecimiento.

En la figura 7, se muestran los resultados de la cinética de crecimiento obtenidos para la vancomicina libre y encapsulada en NPs PLGA, empleando diferentes concentraciones

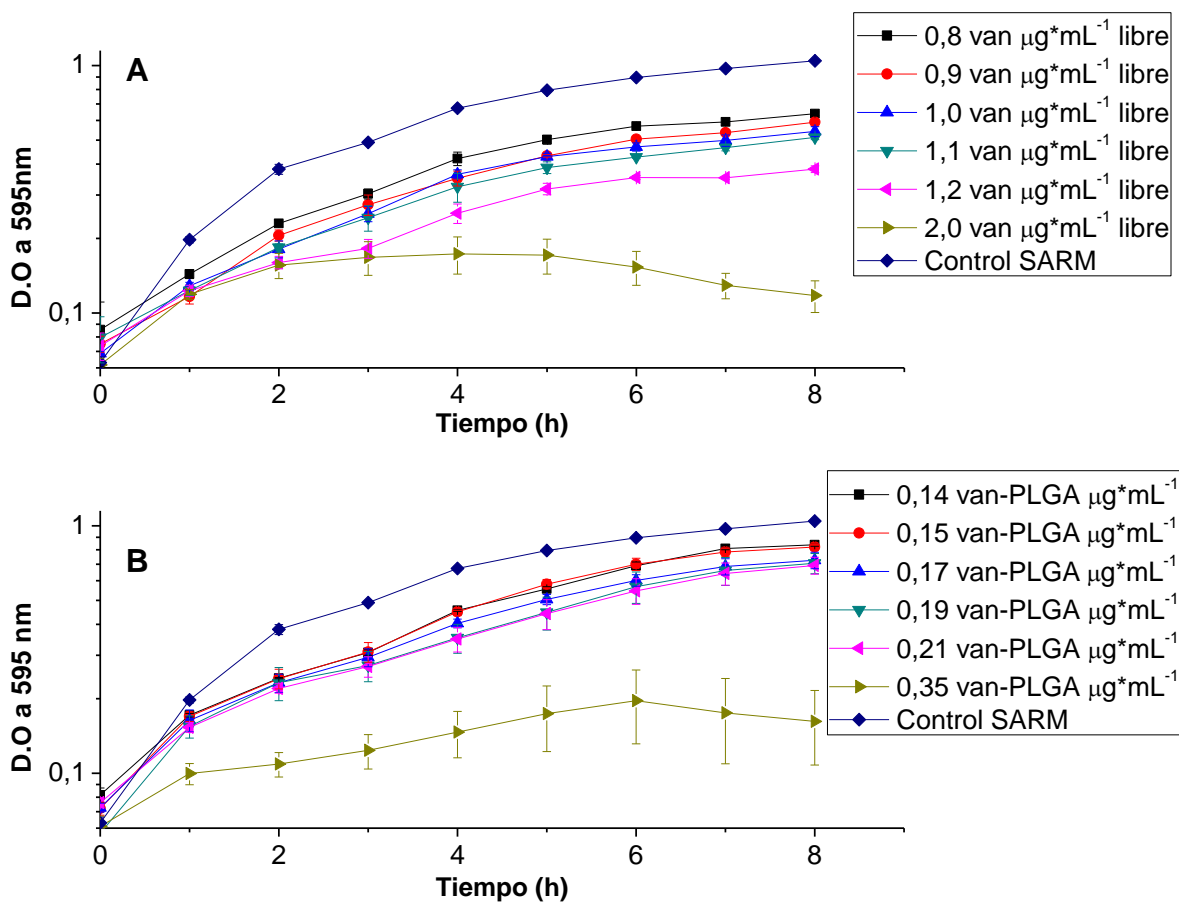


Figura 7. Cinética de crecimiento de SARM en presencia de vancomicina libre (A) y encapsulada en NPs de PLGA, VAN-PLGA-C (B).

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana, se realizaron los cálculos para encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI 50 y CMI 90) para la vancomicina libre y encapsulada (ver ecuaciones en el **anexo B**).

En la tabla 7, se resumen los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución en caldo, para la vancomicina libre y encapsulada frente a SARM.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana *in vitro* de vancomicina libre y encapsulada frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)

Agente antimicrobiano	*CMI (µg/mL)		CMB (µg/mL)
	50%	90%	
Vancomicina libre experimental	0,90	2,00	>2
VAN-PLGA-GEL	0,21	0,35	>2

* CMI, simboliza la concentración mínima inhibitoria

Autores como Hirschle y colaboradores han reportado valores de CMI 50 y CMI 90 entre 2,0 y 4,0 µg/mL. Sin embargo, los valores de CMI dependen de las variables experimentales tales como: método implementado, medio de cultivo, entre otras.

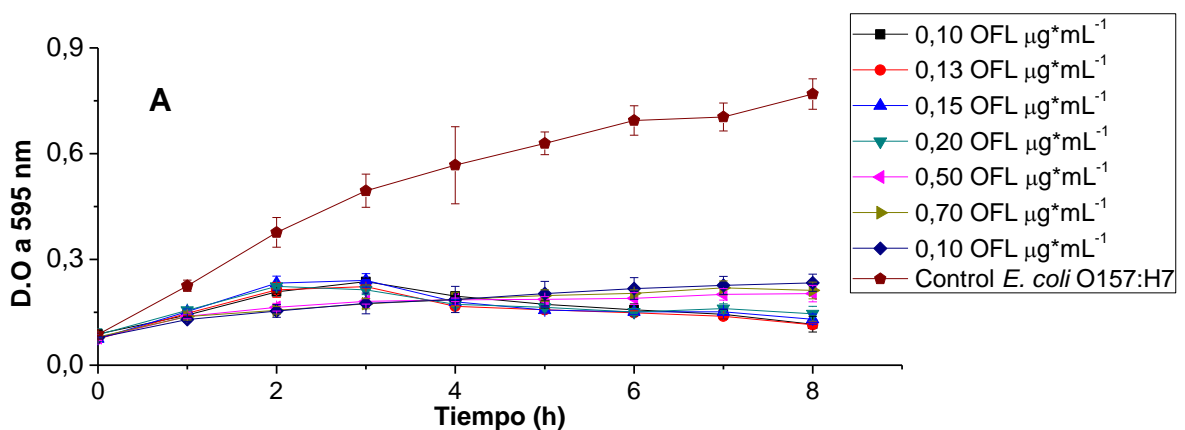
Los resultados mostraron que, a partir de concentraciones de 0,90 µg/mL de vancomicina libre, se logra inhibir en un 50% el crecimiento de SARM. Sin embargo, al emplear vancomicina encapsulada en NPs de PLGA, se logra mejorar la actividad del antibiótico, obteniendo valores de CMI 50 y CMI 90 de 0,21 y 0,35 µg/mL, respectivamente.

Estos resultados sugieren que al encapsular antibióticos como vancomicina en NPs de PLGA con carga positiva, se logra mejorar la actividad del antibiótico frente a SARM. Se ha determinado que las cargas positivas de NPs PLGA son esenciales para la atracción electrostática del antibiótico nanoencapsulado y la membrana de la bacteria, mejorando de esta manera la especificidad del antibiótico (Dillen et al., 2008; Radovic-Moreno et al., 2012).

Otros autores como (Esfandyari-Manesh *et al.*, 2013) sugieren que, NPs de PLGA podrían penetrar la pared celular de la bacteria, mejorando el envío del agente antimicrobiano al sitio de acción. Sin embargo, este tipo de hipótesis no pudo ser confirmada a partir de estudios de realizados en este trabajo.

4.5.2 Determinación del CMI y CMB de ofloxacina libre y encapsulada en NPs de PLGA frente a *E. coli* O157:H7. Se realizó la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de ofloxacina (libre y encapsulada) a diferentes concentraciones, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior.

En la figura 8, se muestran los resultados de la cinética de crecimiento obtenidos para la ofloxacina libre y encapsulada en NPs PLGA (OFL-PLGA-C), empleando diferentes concentraciones.



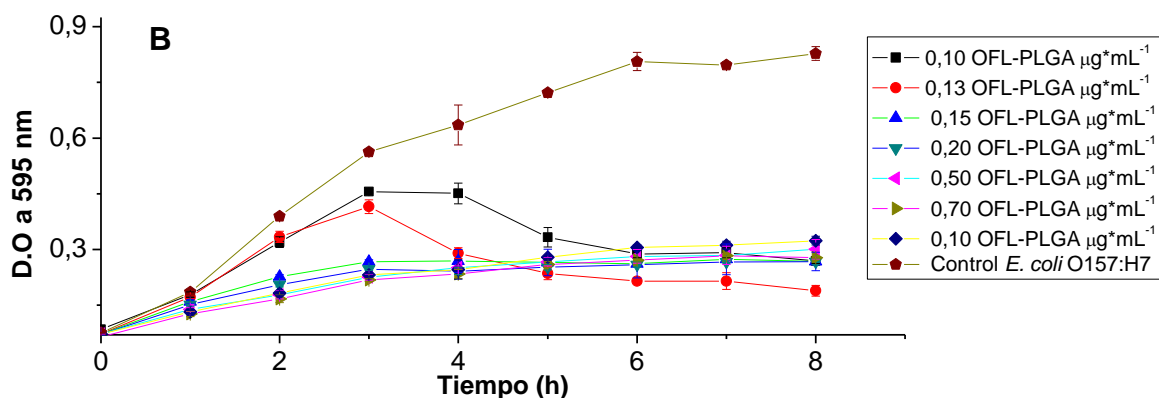


Figura 8. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de ofloxacin libre (A) y encapsulada en NPs de PLGA (B).

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de *E. coli* O157:H7, se realizaron los cálculos para encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI 50 y CMI90) para la ofloxacin libre y OFL-PLGA-C (ver ecuaciones en el **anexo B**)

En la tabla 8 se resumen los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución en caldo, para la ofloxacin libre y encapsulada frente a *E. coli* O157:H7.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana *in vitro* de ofloxacin libre y encapsulada frente a *E. coli* O157:H7

Agente antimicrobiano	*CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		CMB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	50%	90%	
Ofloxacin libre experimental	<0,15	0,15	>1,0
OFL-PLGA-C	<0,15	0,15	>1,0

Al comparar los resultados de concentración mínima inhibitoria y bactericida no se observaron diferencias entre el antibiótico libre y encapsulado. Estos resultados podrían atribuirse al mecanismo de acción de la ofloxacina. Se sabe que la ofloxacina es un antibiótico que actúa sobre la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano.

Debido a que este tipo de enzimas se encuentran en el interior de la bacteria, la ofloxacina (libre o encapsulada) tiene que penetrar las membranas celulares para inhibir el crecimiento del microorganismo(Lilium *et al.*, 1998).

Por lo tanto, el uso de NPs de PLGA para la encapsulación de antibióticos hidrófobos como ofloxacina, bajo las condiciones implementadas, no mostraron mejorar la actividad antimicrobiana del mismo frente a *Escherichia coli* O157:H7.

CONCLUSIONES

El método de nanoprecipitación permitió la encapsulación de vancomicina y ofloxacina en NPs de PLGA.

La presencia de polímeros catiónicos como PEI, BSA y gelatina permiten modificar las propiedades físicas y químicas de las NPs de PLGA mediante interacciones electroestáticas, afectando en ocasiones la estabilidad de las mismas.

Se generaron nanopartículas esféricas, con tamaños entre los 107-237 nm, para las muestras de ofloxacina, y 233-281 para las diferentes muestras de vancomicina; Se obtuvieron índices de polidispersión inferiores a 0,2 y valores de potenciales zetas positivos y negativos.

Se demostró que, al encapsular antibióticos como vancomicina en NPs de PLGA con carga positiva, se logra mejorar la actividad del antibiótico frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), obteniendo valores de CMI 50 y CMI 90 de 0,21 y 0,35 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, al evaluar la actividad de ofloxacina libre y encapsuladas en NPs PLGA, con carga negativa, no se observaron diferencias significativas en los valores de CMI 90, presentado valores alrededor de 0,15 µg/mL frente a *E. coli* O157:H7.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios del perfil de liberación de vancomicina y ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA, por medio de técnicas como espectrofotometría de fluorescencia o cromatografía líquida HPLC en función del tiempo.

Es necesario realizar estudios de citotoxicidad de las muestras VAN-PLGA-GEL y OFL-PLGA-C que permitan establecer los posibles efectos tóxicos del uso de NPs PLGA y sus aditivos para el transporte de vancomicina y ofloxacina, utilizando como modelo experimental cultivos celulares y/o ensayos *in vivo* en animales.

Realizar estudios que permitan esclarecer las interacciones entre la vancomicina encapsulada en NPs de PLGA y la membrana exterior de la bacteria, empleando técnica como espectroscopia de fluorescencia empleando un marcador fluorescente.

BILIOGRAFÍA

Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 170–83. doi:10.1016/j.addr.2010.10.008

Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 17(3), 247– 289.

Bala, I., Hariharan, S., & Kumar, M. N. V. R. (2004). PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 21(5), 387–422. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719481>

Balogh, L. P. (2010). Why do we have so many definitions for nanoscience and nanotechnology? *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 6(3), 397–8. doi:10.1016/j.nano.2010.04.001

Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug development and industrial pharmacy*, 25(4), 471–6. doi:10.1081/DDC-100102197

Bender, E. a, Adorne, M. D., Colomé, L. M., Abdalla, D. S. P., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2012). Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International journal of pharmaceutics*, 426(1-2), 271–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.051

Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *AAPS PharmSciTech*, 6(4), E594–604. doi:10.1208/pt060474

Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F., & Varona, S. (2009). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications.

The Journal of Supercritical Fluids, 47(3), 546–555.
doi:10.1016/j.supflu.2008.08.015

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 133(2), 90–5. doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.073

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles : An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161, 505–522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043

Dillen, K., Bridts, C., Van der Veken, P., Cos, P., Vandervoort, J., Augustyns, K., ... Ludwig, A. (2008). Adhesion of PLGA or Eudragit/PLGA nanoparticles to Staphylococcus and Pseudomonas. *International journal of pharmaceutics*, 349(1-2), 234–40. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.041

Dillen, K., Vandervoort, J., Mooter, G. Van Den, Verheyden, L., & Ludwig, A. (2004). Factorial design , physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 275, 171–187. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.033

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., & Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International journal of nanomedicine*, 6, 877–95. doi:10.2147/IJN.S18905

Esfandyari-Manesh, M., Ghaedi, Z., Asemi, M., Khanavi, M., Manayi, A., Jamalifar, H., ... Dinarvand, R. (2013). Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 7(4), 290–295. doi:10.1016/j.jopr.2013.04.019

Faraji, A. H., & Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(8), 2950–62. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.043

Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug, 3(1), 16–20.

Faustino, P. J., & Kham, M. A. (2008). *Report to office of generic drugs vancomycin solubility study* (pp. 1–17).

Feng, S.-S. (2004). Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert review of medical devices*, 1(1), 115–25. doi:10.1586/17434440.1.1.115

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, N. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, 1–4.

Formiga, F. R., Ansorena, E., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Imbuluzqueta, E., González, D., & Blanco Prieto, M. J. (n.d.). 2. Nanosistemas a base de poliésteres, 41–101.

Gavini, E., Chetoni, P., Cossu, M., Gemma, M., Fabrizio, M., & Giunchedi, P. (2004). PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug , vancomycin using emulsification / spray-drying as the preparation method : in vitro / in vivo studies. *In Vivo*, 57, 207–212. doi:10.1016/j.ejpb.2003.10.018

Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., & Davis, S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation : drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57, 171–185.

Gupta, R. B., & Kompella, U. B. (2006). *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. (R. B. Gupta & U. B. Kompella, Eds.) (1st ed., p. 3). New York: Taylor & Francis Group. Retrieved from <http://www.taylorandfrancis.com>

Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Journal of Controlled Release*, 5(September), 319–327.

Holgado, M. a, Arias, J. L., Cózar, M. J., Alvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, a M., & Fernández-Arévalo, M. (2008). Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *International journal of pharmaceutics*, 358(1-2), 27–35. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.02.012

Ibrahim, H., Bindschaedler, C., Doelker, E., Buri, P., & Gurny, R. (1992). Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *International Journal of Pharmaceutics*, 87(1-3), 239–246. doi:10.1016/0378-5173(92)90248-Z

Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide- co -glycolide) (PLGA) devices, 21.

Jornada, D. S., Fiel, L. a., Bueno, K., Gerent, J. F., Petzhold, C. L., Beck, R. C. R., ... Pohlmann, A. R. (2012). Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, 8(24), 6646. doi:10.1039/c2sm25754h

Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Lallemand, F., Daull, P., Benita, S., Buggage, R., & Garrigue, J.-S. (2012). Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, novasorb. *Journal of drug delivery*, 2012, 604204. doi:10.1155/2012/604204

Lassalle, V., & Ferreira, M. L. (2007). PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromolecular bioscience*, 7(6), 767–83. doi:10.1002/mabi.200700022

Lee, E. J., Khan, S. A., & Lim, K. (2011). Gelatin nanoparticle preparation by nanoprecipitation. *Journal of Biomaterials Science*, 22(4-6), 753–771.

Liliam, D., Jackson, C., Andrés, L., Reyes, M., María, Y. D., & Hamilton, L. (1998). Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica*, 8(1), 58–65. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)00006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0099-5428(08)00006-3)

Maguiña Vargas, V., Ugarte Gil, C. A., & Montiel, M. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 15–20.

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Water*, 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377

Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review, 5(June), 561–573.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, a. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385(1-2), 113–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018

Mora-huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113–142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018

Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 125(3), 193–209. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013

Özalp, Y., Özdemir, N., Kocagoz, S., & Hasirci, V. (2001). Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 18, 89–110.

Paredes Guerrero, D. J. (2011). *Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. Universidad Industrial de Santander.

Pillai, R. R., Somayaji, S. N., Rabinovich, M., Hudson, M. C., & Gonsalves, K. E. (2008). Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Bone*, 034114. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034114

Radovic-Moreno, A. F., Lu, T. K., Puscasu, V. a, Yoon, C. J., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS nano*, 6(5), 4279–87. doi:10.1021/nn3008383

Ray, A. Le, Chiffolleau, S., looss, P., Grimandi, G., Gouyette, A., Daculsi, G., & Merle, C. (2003). Vancomycin encapsulation in biodegradable poly (ε-caprolactone) microparticles for bone implantation . Influence of the formulation process on size , drug loading , in vitro release and cytocompatibility. *Cell*, 24, 443–449.

Reis, C. P., & Neufeld, R. J. (2006). Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Chemical Engineering*, 2, 8 – 21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003

Roco, M. C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 337–346. doi:10.1016/S0958-1669(03)00068-5

Ross, L., & Riley, M. (1990). solubilities of some variously quinolone antimicrobials substituted, 63, 237–250.

Sahoo, S. K., & Labhasetwar, V. (2006). A Series of Textbooks and Monographs. In R. B. Gupta & U. B. Kompella (Eds.), *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, (pp. 1340–148). London: Taylor & Francis Group.

Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 82(1), 105–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106981>

Schubert, S., Delaney, J. J. T., & Schubert, U. S. (2011). Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, 7(5), 1581. doi:10.1039/c0sm00862a

Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215–23. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., & Kulkarni, A. R. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1–20.

Ulu, S. T. (2009). Rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of enrofloxacin, levofloxacin and ofloxacin with 2,3,5,6-tetrachloro-p-benzoquinone. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 72(5), 1038–42. doi:10.1016/j.saa.2008.12.046

Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Expert Review Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025–1058. doi:10.1007/s11095-008-9800-3

Walker, J. M. (University of H. (2011). *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. (S. E. McNeil, Ed.) (Springer S.). London: Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-198-1

Wang, Y., Kho, K., Cheow, W. S., & Hadinoto, K. (2012). A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 424(1-2), 98–106. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.045

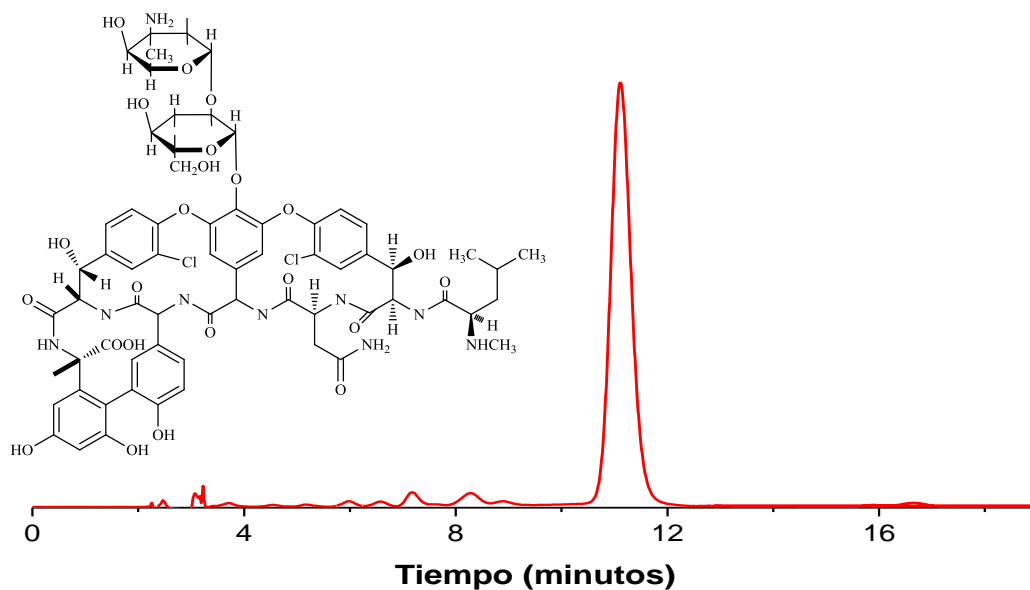
Yu, D., Zhang, Y., Zhou, X., Mao, Z., & Gao, C. (2012). Influence of surface coating of PLGA particles on the internalization and functions of human endothelial cells. *Biomacromolecules*, 13(10), 3272–82. doi:10.1021/bm3010484

Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 104–20. doi:10.1016/j.addr.2012.10.003

ANEXOS

ANEXO A CURVAS DE CALIBRACIÓN

ANEXO A1. Curvas de calibración de vancomicina mediante HPLC-

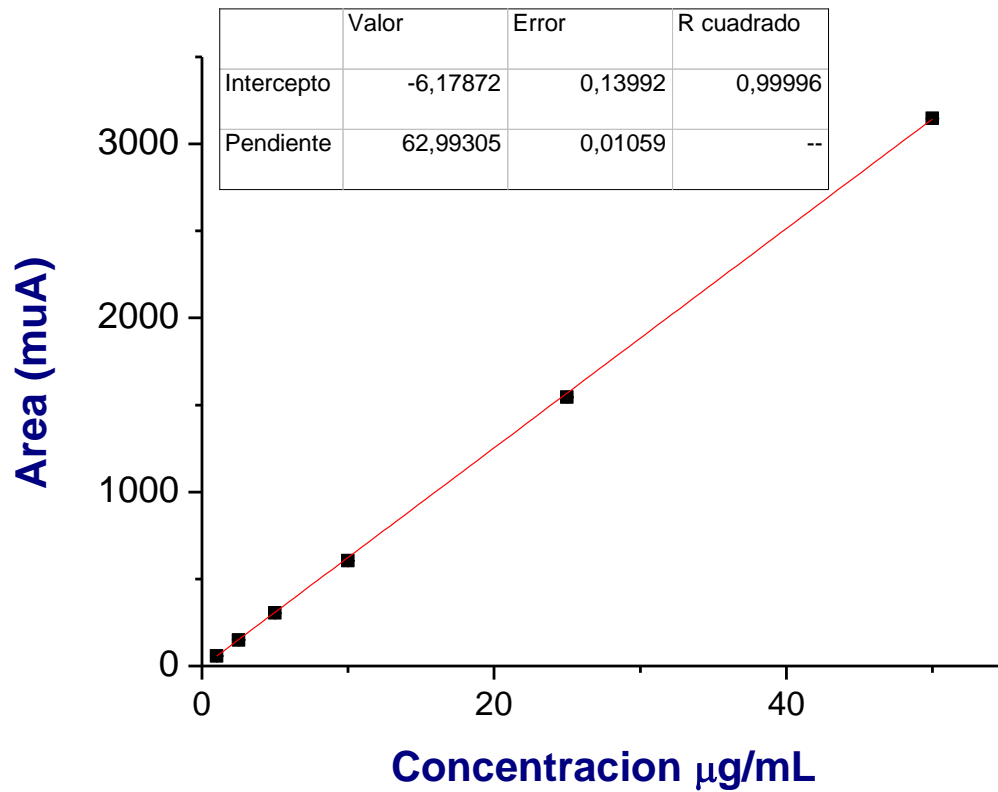


D

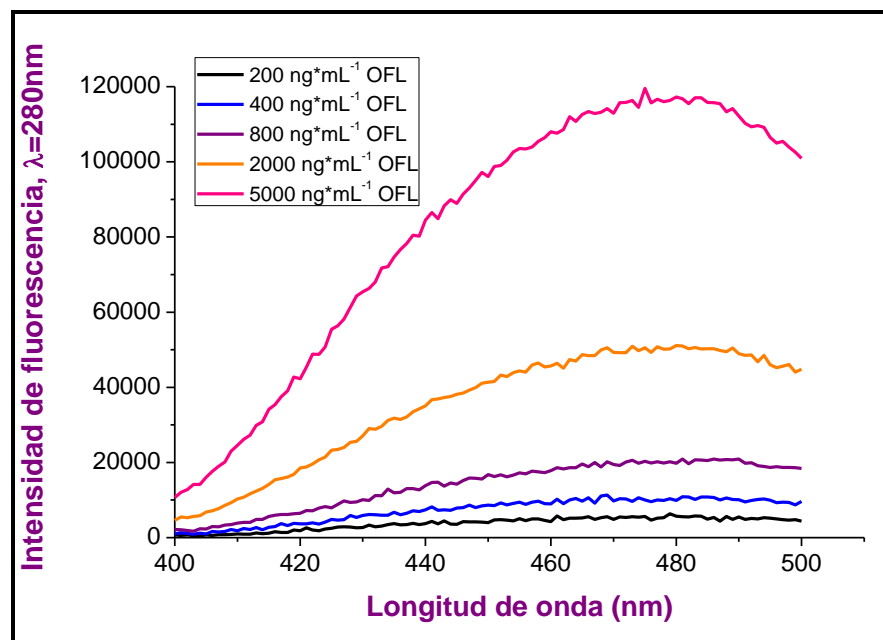
Figura N. Perfil cromatográfico, obtenido a 230 nm mediante HPLC-DAD. Fase móvil conformada por 91% Buffer fosfato 25 mM (pH 3,2) y 9% Acetonitrilo.

Tabla N. Datos de curva de calibración de vancomicina, obtenidos a través de HPLC-DAD.

Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Área mUA	DS \pm
1,0	58,08333	0,15011
2,5	149,7967	0,44287
5,0	305,2733	0,50013
10,0	604,8200	0,67439
25,0	1544,887	2,46982
50,0	3146,223	0,50143



ANEXO A2. Curvas de calibración de ofloxacina mediante espectroscopia de fluorescencia



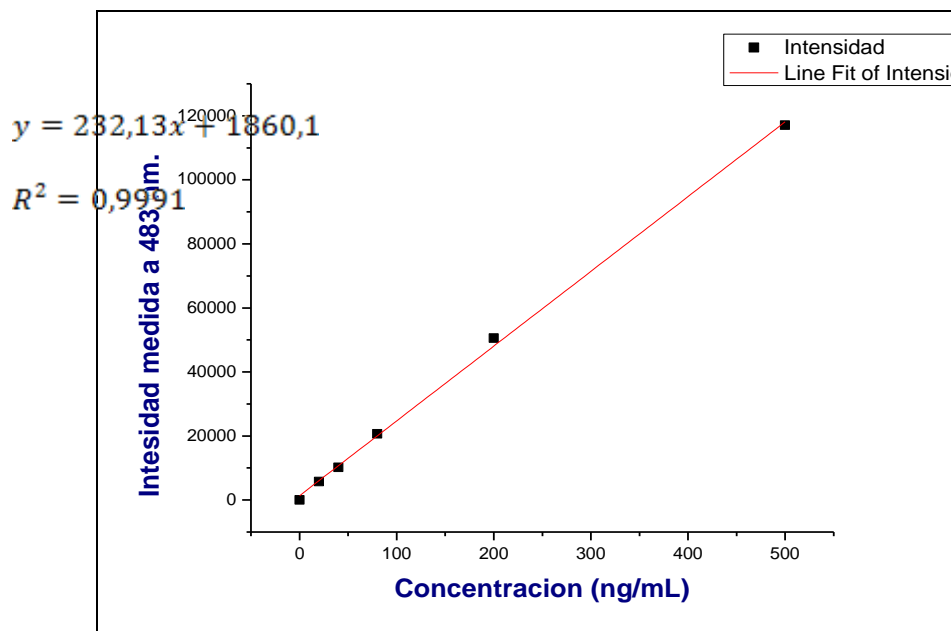


Figura N2. Espectro de fluorescencia (a) y curva de calibración (b) para ofloxacina. Las intensidades de fluorescencia fueron medidas a 483 nm, usando un longitud de onda de excitación de 280 nm

ANEXO B. CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA

Al realizar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de los antibióticos libres y encapsulados, se midió la absorbancia cada hora determinando con punto final $t = 8h$, con el fin de aplicar la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición:

$$Y = 100 - \frac{(A_F - A_0) * 100}{A_C}$$

Dónde:

A_F = La absorbancia en $T = 8h$ en presencia del antibiótico (libre y encapsulado)

A_0 = La absorbancia en $T = 0h$ en presencia del antibiótico (libre y encapsulado)

A_C = La absorbancia de la bacteria en ausencia del antibiótico