

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE  
VANCOMICINA Y OFLOXACINA ENCAPSULADAS EN NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DE PLGA-mPEG SOBRE *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTE A LA METICILINA Y *Escherichia coli* O157:H7**

**KEYLA MAYDEE ORTIZ ORTIZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE  
VANCOMICINA Y OFLOXACINA ENCAPSULADAS EN NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DE PLGA-mPEG SOBRE *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTE A LA METICILINA Y *Escherichia coli* O157:H7**

**KEYLA MAYDEE ORTIZ ORTIZ**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Químico**

**Director:**

**RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph, D.**

**Co-Director:**

**Dra. CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, Ph, D.**

**Qca. DAISSY PAREDES GUERRERO, Qca.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

*...A mi familia por su infinito amor, confianza, consejos, y apoyo.*

*La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien  
a quien amar y alguna cosa que esperar.*

*Thomas Chalmers*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Profe Rodrigo y la profe Claudia por su orientación en esta etapa de formación, por sus consejos, tiempo, disposición y paciencia; gracias por hacerme crecer y conocer más de mi carrera.

A mi familia por apoyarme siempre incondicionalmente, por su amor y comprensión, por ayudarme a perseguir mis sueños.

A la Universidad Industrial de Santander, por brindarme la oportunidad recibir mi formación académica, por mostrarme un mundo más allá de las aulas.

A todos mis compañeros del grupo de investigación GIBIM por hacer amena esta etapa de mi vida, fue más divertido aprender compartiendo con ustedes, a Daissy y Yuly por su ayuda en cada etapa de mi trabajo, a Jennifer Ruiz por toda su colaboración.

Finalmente, a mis amigos con quienes tuve la oportunidad de compartir en estos últimos años, gracias por tantos momentos de felicidad, por su amistad y apoyo, son una parte más de mi vida.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	18
1 MARCO TEÓRICO.....	21
<b>1.1 Nanosistemas de liberación de fármacos</b>	<b>21</b>
1.1.1 Nanopartículas poliméricas .....	21
<b>1.2 Polímeros biodegradables.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3 Métodos de síntesis de nanocápsulas.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Nanoprecipitación.....	24
1.3.2 Precipitación por sales .....	25
1.3.3 Emulsificación-Difusión de solvente .....	25
1.3.4 Emulsificación-evaporación del solvente.....	26
1.3.5 Doble emulsión (A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> ) .....	26
<b>1.4 Técnicas de caracterización del bloque polimérico PLGA-mPEG</b>	<b>27</b>
1.4.1 Espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR).....	27
1.4.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) .....	28
<b>1.5 Métodos de caracterización fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas.....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	29
1.5.2 Carga superficial (potencial zeta) .....	30
1.5.3 Microscopia de barrido electrónico (SEM).....	31
1.5.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	31
1.5.5 Espectroscopia UV-Vis.....	32
<b>1.6 Microorganismos de estudio</b>	<b>33</b>
1.6.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	33
1.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) .....	34
<b>1.7 Antibióticos</b>	<b>35</b>

1.7.1	Vancomicina.....	35
1.7.2	Ofloxacin.....	36
2	OBJETIVOS.....	38
	<b>2.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
	<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>38</b>
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
	<b>3.1 Reactivos y medios de cultivo.....</b>	<b>39</b>
	<b>3.2 Microorganismos.....</b>	<b>39</b>
	<b>3.3 Métodos.....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Síntesis del bloque polimérico de PGLA-mPEG.....	40
3.3.2	Preparación de vancomicina y ofloxacin encapsuladas en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG.....	42
3.3.3	Caracterización fisicoquímica de vancomicina y ofloxacin encapsuladas en nanopartículas poliméricas del PLGA-mPEG .....	44
3.3.4	Determinación del efecto antimicrobiano de los antibióticos sin encapsular y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG .....	48
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
	<b>4.1 Obtención y caracterización del bloque polimérico</b>	<b>49</b>
4.1.1	Espectroscopia infrarroja ATR.....	50
4.1.2	Resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>-1</sup> H).....	52
	<b>4.2 Preparación de vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG</b>	<b>53</b>
4.2.1	Caracterización fisicoquímica .....	53
4.2.2	Tamaño hidrodinámico promedio .....	53
4.2.3	Carga superficial.....	55
4.2.4	Porcentaje de encapsulación.....	59
4.2.5	Microscopia electrónica de barrido STEM para vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG .....	63
	<b>4.3 Encapsulación de ofloxacin en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG</b>	<b>64</b>

<b>4.4 Determinación del efecto antimicrobiano de los antibióticos libres y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG</b>	<b>67</b>
5 CONCLUSIONES .....	79
6 RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82
ANEXOS.....	,92

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de los tipos de nanopartículas poliméricas.....	22
<b>Figura 2</b> Representación del potencial zeta de una nanopartícula esférica .....	30
<b>Figura 3.</b> Estructura de vancomicina.....	35
<b>Figura 4.</b> Estructura ofloxacina.....	36
<b>Figura 5.</b> Montaje síntesis del bloque polimérico PLGA-mPEG.....	40
<b>Figura 6.</b> Estructura bloque polimérico PLGA-mPEG .....	50
<b>Figura 7.</b> Espectro IR-ATR del bloque polimérico PLGA-mPEG sintetizado.....	50
<b>Figura 8.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H del bloque polimérico PLGA-mPEG.....	52
<b>Figura 10</b> Estabilización estérica de la nanopartículas porliméricas. ....	55
<b>Figura 10.</b> Estructura de la PEI .....	57
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la carga superficial de las nanopartículas recubiertas con PEI a diferentes pHs.....	57
<b>Figura 12.</b> Cromatograma obtenido para un extracto de vancomicina con una concentración de 6,29 ppm.....	60
<b>Figura 13.</b> Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG.. ....	61
<b>Figura 14.</b> Histograma de distribución de carga superficial de vancomicina encapsulada en nanopartículas positivas de PLGA-mPEG.....	62
<b>Figura 15.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica STEM para vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG.....	64
<b>Figura 16.</b> Histograma de distribución de tamaño hidrodinámico promedio de ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG.....	65
<b>Figura 17.</b> Histograma distribución de carga superficial para ofloxacina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG.....	65
<b>Figura 18.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica STEM para ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG.....	67
<b>Figura 19.</b> Cinética de crecimiento de SARM frente a nanopartículas positivas en ausencia de fármaco.. ....	69

<b>Figura 20.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a nanopartículas positivas.....	69
<b>Figura 21.</b> Cinética de crecimiento de SARM a diferentes concentraciones de vancomicina libre. ....	70
<b>Figura 22.</b> Cinética de crecimiento de SARM frente a vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG positivas. ....	71
<b>Figura 23.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a ofloxacina libre...	73
<b>Figura 24.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG positivas.....	74
<b>Figura 25.</b> Cinética de crecimiento de SARM frente a ofloxacina libre.....	76
<b>Figura 26.</b> Cinética de crecimiento de SARM frente a ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG positivas.....	77

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones cromatográficas para la cuantificación de vancomicina. ....	47
<b>Tabla 2.</b> Resumen bandas de vibración espectro IR del PLGA-mPEG .....	51
<b>Tabla 3.</b> Tamaño hidrodinámico promedio agente estabilizante-agente catiónico	54
<b>Tabla 4.</b> Determinación del potencial zeta de nanopartículas de PLGA-mPEG en diferentes mezclas de agente catiónico –agente estabilizante .....	56
<b>Tabla 5.</b> Evaluación del efecto de la variación de la concentración de PEI a pH 6,0 sobre la carga superficial de vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG. ....	58
<b>Tabla 6.</b> Efecto del tipo de disolvente sobre el porcentaje de encapsulación de vancomicina en nanopartículas de PLGA-mPEG. ....	60
<b>Tabla 7.</b> Características fisicoquímicas de los compuestos nanoestructurados evaluados frente a SARM y <i>E. coli</i> O157:H7 .....	68
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de vancomicina frente a SARM...	71
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de ofloxacina sobre <i>E. coli</i> O157:H7 .....	74
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones mínimas bactericidas de ofloxacina a SARM.....	77

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A</b> Análisis estadístico t-student.....	92
<b>Anexo B</b> Curva de calibración HPLC para cuantificación de vancomicina.....	93
<b>Anexo C</b> Curva de calibración UV-VIS para cuantificación de ofloxacina a 294 nm.....	<b>94</b>
<b>Anexo D</b> Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> frente a nanopartículas negativas de PLGA-mPEG en ausencia de fármaco.....	95
<b>Anexo E</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a nanopartículas negativas de PLGA-mPEG en ausencia de fármaco.....	96
<b>Anexo F</b> Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> frente a vancomicina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG.....	97
<b>Anexo G</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a ofloxacina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG.....	98
<b>Anexo H</b> Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> frente a ofloxacina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A/O/A</b>	Emulsión agua/aceite/agua
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion (Infusión de cerebro y corazón)
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin (Albumina de suero bovino)
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DAD</b>	Diode Array Detector (Detector de arreglo de diodos)
<b>DLS</b>	Dynamic Light scattering (Dispersión de luz en modo dinámico)
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FDA</b>	Food Drug Administration
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>PdI</b>	Índice de Poli-dispersión
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>NPs</b>	Nanopartículas poliméricas
<b>OFL</b>	Ofloxacina
<b>%P/V</b>	Porcentaje peso-volumen
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PLA</b>	Ácido poli-láctico
<b>PLGA</b>	Acido poli-láctico-co-glicólico
<b>PLGA-mPEG</b>	Ácido poli-láctico-co-glicólico pegilado
<b>PR-HPLC</b>	Reversed phase HPLC ( HPLC de fase reversa)
<b>PVA</b>	Acetato de polivinilo
<b>PZ</b>	Potencial zeta
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscope ( Microscopio electrónico de barrido)

**STEM**

Scanning transmission electronmicroscope (Microscopía  
Electrónica De Barrido En Modo De Transmisión)

## RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA in vitro DE VANCOMICINA Y OFLOXACINA ENCAPSULADAS EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA-mPEG SOBRE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA Y *Escherichiacoli* O157:H7\*

AUTOR: ORTIZ ORTIZ, Keyla\*\*

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas de ácido poli-láctico-co-glicólicopegilado (NPs PLGA-mPEG), Doble emulsión solvente-evaporación, Concentración mínima inhibitoria (CMI), vancomicina, ofloxacina.

Se realizó la síntesis de vancomicina y ofloxacina encapsulados en nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico-co-glicólicopegilado (NPs PLGA-mPEG) utilizando el método de doble emulsión solvente-evaporación. Con el objetivo de modificar la carga superficial de los antibióticos nanoencapsulados, se emplearon 2 tipos de polímeros catiónicos, gelatina y polietilenimina. 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, espectroscopía UV-Vis y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los diferentes antibióticos encapsulados en NPs PLGA-mPEG se obtuvieron como líquidos blancos de aspecto lechoso, con tamaños alrededor de los 300 nm y carga superficial positiva. Se evaluó la actividad antimicrobiana de muestras de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en NPs de PLGA-mPEG frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina (*SARM*) y *E. coli* O157:H7 empleando el método de microdilución en caldo. Se observó que encapsular vancomicina en NPs PLGA-mPEG con carga positiva, la actividad del antibiótico frente a *SARM* disminuyó con respecto al antibiótico sin encapsular. Por otro parte, al evaluar la actividad de ofloxacina encapsulada frente *E. coli* O157:H7 y *SARM* se observó que el antibiótico encapsulado mejoró la actividad antimicrobiana con respecto al antibiótico libre.

---

\* Trabajo de grado

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

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF *in vitro* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF VANCOMYCIN AND OFLOXACIN ENCAPSULATE IN PLGA-Mpeg POLYMERIC NANOPARTICLES ON METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* O157:H7\*.

**AUTHOR:** ORTIZ ORTIZ, Keyla \*\*

**Keywords:** Pegylated Poly lactide-co-glycolide nanoparticles (PLGA-mPEG NPs), double emulsion solvent evaporation, Minimum Inhibitory concentration, Vancomycin, Ofloxacin.

In this work, vancomycin and ofloxacin were encapsulated in pegylated poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles (PLGA-mPEG NPs) by double emulsion solvent evaporation. We used two different cationic polymers, polyethyleneimine and gelatin with the goal to modifying nanoparticle's surface charge. Antibiotics encapsulated in PLGA-mPEG NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), zeta potential, and by high performance liquid chromatography (HPLC). This antibiotics encapsulated in PLGA-mPEG nanoparticles were obtained as white and milky liquids, with sizes (z-average) around 300 nm and zeta potential values between +9 mV and +15 mV. The antimicrobial activity of the samples of vancomycin and ofloxacin, free and loaded PLGA nanoparticles, were evaluated against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *E. coli* O157:H7 strains by broth microdilution method. We observed that the activity of PLGA-mPEG nanoparticles loaded with vancomycin decreased compared to free antibiotic antimicrobial against MRSA. On the other hand, the antimicrobial activity of the PLGA-mPEG nanoparticles loaded with ofloxacin against *E. coli* O157: H7 and MRSA was improved compared to free antibiotics.

---

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

## INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos ha permitido que diferentes microorganismos patógenos desarrollen múltiples mecanismos de resistencia para evadir la efectividad de los mismos. A su vez, la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales, ha aumentado significativamente la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas atribuidas a estos patógenos (Cabrera et al. 2007). Dentro de este grupo de bacterias patógenas se encuentran las cepas infectivas *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)(Cosgrove et al. 2003). La prevalencia de infecciones, tanto nosocomiales como brotes en la comunidad causados por *S. aureus*, representan un grave problema de salud pública, particularmente en Colombia, donde se ha observado un incremento de las patologías asociadas a esta bacteria (Alvarez et al. 2010). Por ejemplo, *S. aureus* ha mostrado disminución en la sensibilidad a diferentes clases de antibióticos, tales como: fluoroquinolonas, clindamicina, tetraciclina, meticilina, entre otros. Varios estudios demuestran que los pacientes colonizados con SARM presentan un mayor riesgo de mortalidad que los pacientes colonizados por *S. aureus* sensible a la meticilina (Cosgrove et al. 2003).

Otro de los patógenos que presenta un mayor número de brotes es *Escherichia coli*, una bacteria Gram-negativa que se encuentra generalmente en la flora intestinal de los seres humanos. Sin embargo, algunas cepas pueden causar efectos adversos, como por ejemplo *E. coli* O157:H7, que es el serotipo aislado más importante causante del síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH se caracteriza por provocar daño renal agudo, deficiencia plaquetaria, anemia hemolítica precedida por diarrea con presencia de sangre, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómito (Abong'o & Momba 2009; Smith et al. 2013).

La resistencia que han desarrollado los microorganismos a los tratamientos terapéuticos preocupa a la comunidad científica y ha despertado un gran interés por la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlos. En este contexto, la nanotecnología ha hecho un esfuerzo notable en el desarrollo de nuevos nanosistemas de liberación de fármacos, tales como, micelas lipídicas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanotubos, entre otros. En general, estos sistemas mejoran la biodisponibilidad y biodistribución del fármaco, ofreciendo protección en el medio biológico al evitar la degradación enzimática. Debido a su tamaño, los nanosistemas de liberación de fármacos pueden superar las barreras fisiológicas, pueden ser modificados y funcionalizados de modo que realicen una entrega más eficiente sobre la diana biológica y mejorar la interacción con la misma (Huh & Kwon 2011; Chan et al. 2012). Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas poliméricas presentan grandes ventajas debido a sus características fisicoquímicas de tamaño, morfología y carga superficial. Estas características pueden ser controladas de acuerdo con la elección de la matriz polimérica, adición de agentes catiónicos o aniónicos que modifiquen la carga superficial, y por los métodos de síntesis empleados (Karavelidis et al. 2010). Los polímeros más utilizados para la síntesis de nanopartículas poliméricas son el ácido poli-láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y su co-polímero ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA); en general, estos polímeros se caracterizan por ser polímeros biodegradables, biocompatibles, y no inmunogénicos, y están aprobados por la agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA) (Danhier et al. 2012). La naturaleza hidrofóbica de estos polímeros hace que sean fácilmente eliminados por el sistema fagocítico endotelial mononuclear, disminuyendo así el tiempo de vida en el sistema biológico (Beletsi et al. 2005). Una de las estrategias para aumentar la permanencia en el torrente sanguíneo es la modificación de las propiedades hidrofílicas de estos polímeros realizando una funcionalización estructural con polímeros de carácter hidrofílico. Entre las modificaciones más comunes está la funcionalización con polímeros de carácter hidrofílico como el

polietilenglicol (PEG), el cual es un polímero biocompatible y no inmunogénico; características que le permiten ser usado para aplicaciones biológicas (Govender et al. 2000; Murugesan et al. 2007).

Actualmente, uno de los tratamientos empleados contra infecciones causadas por SARM incluye el uso del antibiótico vancomicina, el cual presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (An et al. 2013) y ofloxacina cuyo espectro de acción se extiende a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *E. coli* O157:H7 (Sato et al. 1982). En este trabajo de investigación, se encapsuló vancomicina y ofloxacina en nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico-co-glicólico pegilado (PLGA-mPEG), empleando un agente catiónico polietilenimina (PEI) para conferir una carga superficial positiva y lograr mejorar la interacción con la membrana celular de la bacteria. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los antibióticos nanoencapsulados frente a SARM y *E. coli* O157:H7 empleando el método de microdilución en caldo.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Nanosistemas de liberación de fármacos

La medicina requiere que los sistemas de administración de fármacos sean precisos en su control, distribución y que respondan directamente al entorno local de la patología con el fin de lograr una interacción con la diana biológica. La nanobiotecnología ha desarrollado nuevos nanosistemas biocompatibles para la liberación de fármacos, tales como, nanopartículas poliméricas, liposomas, nanotubos, sistemas micelares, dendrímeros, entre otros. Generalmente, el fármaco de interés es funcionalizado a la superficie y/o cargado en el interior de las nanoestructuras para ser transportado y liberado. Los compuestos nanoestructurados como sistemas de liberación controlada de fármacos han mostrado ser altamente eficaces, mejorando la interacción con la diana biológica por sus características superficiales y la liberación de acuerdo con su degradación *in vitro* (Ravi Kumar et al. 2004; Huh & Kwon 2011).

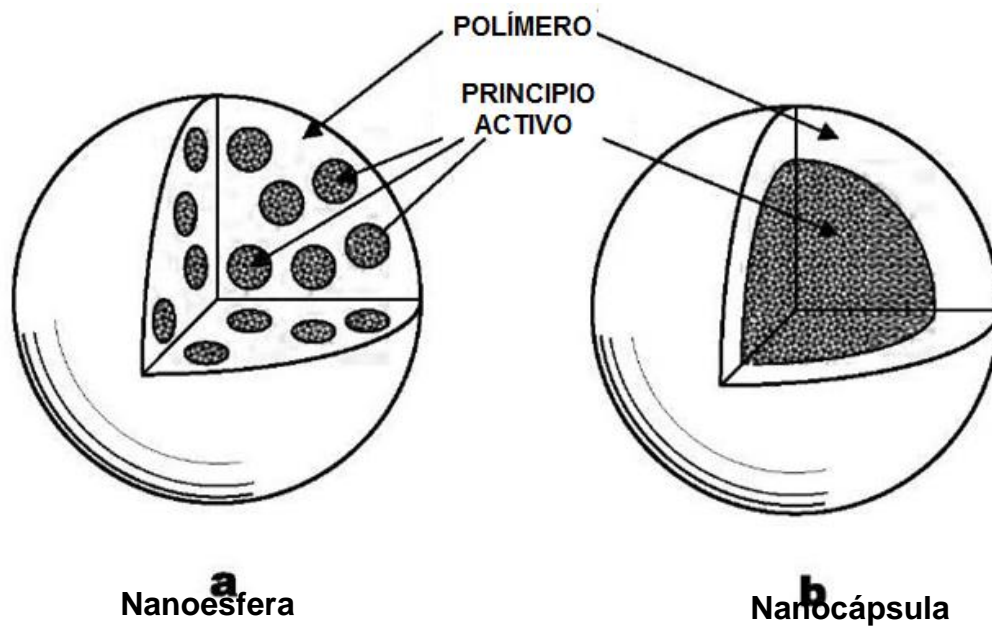
### 1.1.1 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas están compuestas por agregados moleculares de una matriz polimérica, presentando generalmente una morfología esférica con tamaños menores a 1 micrómetro. En general, se usan como vehículo de liberación de fármacos debido a que permiten la funcionalización de principios activos a su superficie como en el caso del transporte de proteínas y DNA (Schaffazick & Pohlmann 2002); también pueden contener el principio activo en su interior y ofrecer una liberación controlada del mismo de acuerdo con la velocidad de biodegradación de la matriz polimérica y/o fugacidad del fármaco hacia el exterior, manteniendo así una liberación sostenida sobre la

diana biológica. Las nanopartículas poliméricas pueden clasificarse en dos tipos de acuerdo con su estructura y morfología:

- a. **Nanoesferas:** Pueden ser definidas como sistemas nanoparticulados de carácter matricial en donde se puede dispersar el fármaco.
- b. **Nanocápsulas:** Se definen como nanosistemas vesiculares, es decir, presentan una cavidad interior que contiene al fármaco.

Los nanosistemas poliméricos como vehículo para el transporte y liberación de fármacos mejoran su farmacocinética, su perfil de distribución en el tejido y aumentan su biodisponibilidad (Ravi Kumar et al. 2004).



**Figura 1. Representación gráfica de los tipos de nanopartículas poliméricas**(Tomado de Nokhodchi et al. 2012)

## 1.2 Polímeros biodegradables

Se consideran polímeros biodegradables aquellos que pueden ser degradados fácilmente en los procesos metabólicos. Estos pueden ser de tipo sintético o natural (proteínas o polisacáridos), sin embargo, estos últimos han recibido pocas aplicaciones para este propósito ya que varían en su pureza y con frecuencia requieren reticulación que podría desnaturalizar el fármaco que se incorpore a la nanopartícula. Por consiguiente, son los polímeros sintéticos los que han despertado mayor interés en esta área (Hans & Lowman 2002). Las matrices poliméricas para la fabricación de nanosistemas de liberación controlada más ampliamente utilizadas son el poli ácido láctico (PLA), poli ácido glicólico (PGA) y su copolímero poli ácido láctico co-glicólico (PLGA); ya que son biodegradables, biocompatibles, y no inmunogénicos. Además, han sido aprobados por la agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA) (Park et al. 2005; Hans & Lowman 2002). El PLGA se biodegrada por un proceso de hidrólisis en ácido láctico y ácido glicólico. El ácido láctico entra en el ciclo de Cori para ser transformado en piruvato y de allí puede ser re-utilizado para formar glucosa o entrar en otras rutas metabólicas (Lasprilla et al. 2012). El ácido glicólico es eliminado sin cambios por el riñón o es transformado en glioxilato y posteriormente en glicina por reacciones de transaminación, para finalmente transformarse en piruvato para formar glucosa o tomar otra ruta metabólica (Cicccone et al. 2001). Sin embargo, varios estudios han evidenciado que las nanoestructuras hechas con estos polímeros son fácilmente eliminadas por el sistema retículo-endotelial debido a sus características hidrofóbicas (Beletsi et al. 2005; Dhar et al. 2008; Yadav et al. 2010). Por esta razón, se han desarrollado diferentes estrategias para conferirle un carácter hidrofílico a las nanopartículas realizando una modificación en la estructura polimérica con polímeros hidrofílicos como el polióxido de etileno (PEO) o el polientilenglicol (PEG) (Wang & Thanou 2010). El PEG ha sido aprobado por

FDA para investigación y aplicaciones biomédicas (Kim et al. 2005). Las cadenas de PEG sobre la superficie forman una barrera estérica en la superficie de las nanopartículas impidiendo la opsonización y el reconocimiento por parte de los macrófagos; por lo tanto, la PEGilación incrementa el tiempo de vida media de las moléculas encapsuladas en el sistema biológico (Senthilkumar et al. 2008; Danhier et al. 2012).

### **1.3 Métodos de síntesis de nanocápsulas**

Existen diferentes métodos para la obtención de nanopartículas poliméricas. Dependiendo de la elección del método de síntesis se obtiene una organización estructural de “nanoesfera” o “nanocapsula” (Danhier et al. 2012). Entre los métodos más comunes están: nanoprecipitación, emulsión-evaporación de solvente, emulsión-difusión de solvente, doble emulsión solvente-evaporación, y precipitación por sales.

#### **1.3.1 Nanoprecipitación**

Se requiere de dos disolventes miscibles, idealmente tanto el polímero como el fármaco deben disolverse en el primero, denominado “solvente”, pero no en el segundo, denominado “no-solvente”. La nanoprecipitación se produce por una desolvatación rápida del polímero al añadir el “solvente” al “no solvente”; tan pronto como el “solvente” que contiene al polímero se añade sobre el “no solvente”, el polímero se precipita atrapando inmediatamente el fármaco. La formación rápida de las nanopartículas se rige por el efecto Marangoni, el cual se debe a las turbulencias en la interfase “solvente”-“no-solvente”, como

resultado de la variación en el flujo, la difusión y la tensión superficial (Bilati et al. 2005). Este método permite la obtención de nanopartículas de forma instantánea, es sencillo y fácil de realizar; evita el uso de solvente orgánicos tóxicos, y se ha usado para nanoencapsular fármacos hidrofóbicos. Sin embargo, se ha demostrado que los porcentajes de encapsulación son bajos para fármacos hidrofílicos; además, conduce a la adsorción del fármaco en la superficie y no en el interior de la nanopartícula (Cheow & Hadinoto 2010).

### **1.3.2 Precipitación por sales**

El principio de esta técnica es el uso de un solvente hidromiscible que tiene rápida difusión a la solución acuosa rica en electrolitos; el solvente más utilizado es la acetona ya que cumple con estas características y es de baja toxicidad. El polímero y el fármaco son disueltos en el solvente orgánico; posteriormente, esta solución es emulsificada en la solución acuosa que contiene electrolitos y un surfactante. Después de formada la emulsión, se agrega agua para aumentar la difusión de la acetona hacia el medio acuoso; de esta manera, el solvente orgánico es evaporado y los electrolitos son separados por filtración de flujo transversal (Zweers et al. 2006).

### **1.3.3 Emulsificación-Difusión de solvente**

Este método consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua. El polímero y el fármaco son disueltos en el disolvente y son emulsificados en una fase acuosa que contiene el surfactante. Posteriormente, se adiciona un volumen de agua para facilitar la difusión del solvente a la fase externa dando paso a la formación de las nanopartículas, el solvente orgánico es retirado de la emulsión por presión reducida (Cohen-sela, Teitlboim, et al. 2009).

### 1.3.4 Emulsificación- evaporación del solvente

Esta técnica se basa en una fase orgánica (insoluble en agua) que contiene disueltos el polímero y el fármaco; esta solución orgánica es emulsificada en una fase acuosa que contiene un surfactante. Durante la emulsión, el polímero se rompe en nanogotas por acción de un homogenizador en presencia del surfactante; estas nanopartículas preformadas se terminan de formar tras evaporar el solvente orgánico de la emulsión (Rosca et al. 2004).

### 1.3.5 Doble emulsión ( $A_1/O/A_2$ )

Es una técnica usada para nanoencapsular fármacos hidrofílicos. El fármaco se solubiliza en agua y, posteriormente, se emulsiona en un solvente orgánico en el que se ha disuelto previamente el polímero para formar una primera emulsión,  $A_1/O$  (agua: solvente orgánico). La primera emulsión es añadida a una solución acuosa que contiene un surfactante para formar una doble emulsión,  $A_1/O/A_2$  (agua:solvente orgánico:agua). Finalmente, se evapora el solvente orgánico y las nanopartículas quedan en la fase acuosa para su purificación. Las emulsiones se forman con ayuda de agitación mecánica o por sonicación.

Para el método de doble emulsión solvente- evaporación, las variables que influyen en el tamaño promedio, carga superficial y porcentaje de encapsulación de las nanopartículas son: peso molecular y concentración del polímero, concentración del fármaco, velocidad y tiempo de agitación, concentración del surfactante, concentración del agente catiónico, y la relación de las fases acuosa:orgánica:acuosa ( $A_1/O/A_2$ ) (Hachicha et al. 2006; Cohen-sela, Chorny, et al. 2009; Rahman et al. 2010).

Una de las desventajas de esta técnica es la polidispersión en el tamaño de las nanopartículas. Sin embargo, presenta una gran ventaja respecto a los demás métodos de obtención de nanopartículas mostrando altos porcentajes de encapsulación para fármacos hidrofílicos (Liu et al. 2005).

#### **1.4 Técnicas de caracterización del bloque polimérico PLGA-mPEG**

Es importante conocer la estructura y organización molecular del polímero sintetizado. La espectroscopia infrarroja y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones son las técnicas más usadas para la identificación y determinación estructural de polímeros, debido a que permiten detectar los principales grupos funcionales y la organización de los monómeros en la cadena.

##### **1.4.1 Espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR)**

Es una técnica que se emplea para realizar el análisis del espectro vibracional de las moléculas. El rango espectral se encuentra entre  $4000$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo son resultado de distintos cambios energéticos producidos por las moléculas desde unos estados vibracionales y rotacionales a otros. De este modo, se presentan un conjunto de bandas características de la estructura del sistema molecular, permitiendo la identificación de grupos funcionales, interacciones y conformaciones estereoquímicas. El ATR es una técnica de muestreo utilizada en el infrarrojo, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie

del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro infrarrojo del analito(Skoog et al. 2001).

#### **1.4.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Es una técnica no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Se basa en un fenómeno físico por el que núcleos atómicos situados bajo la influencia de un campo magnético exterior de intensidad determinada, absorben selectivamente energía del rango de radiofrecuencias para pasar luego a un estado excitado. Al cesar el aporte energético externo, estos mismos núcleos devuelven (liberan) la energía absorbida en un proceso de relajación que puede ser captado, medido y cuantificado, permitiendo la identificación de la molécula. RMN presenta una ventaja respecto a las demás técnicas de caracterización pues permite el estudio del movimiento y posiciones de los protones. La aplicación más importante de RMN a los polímeros se da en el estudio y determinación de la secuencia de los monómeros en la macromolécula y la relación de cada monómero en la estructura del polímero (Shit & Maiti 1986).

#### **1.5 Métodos de caracterización fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas**

Las características fisicoquímicas de las nanopartículas como el tamaño hidrodinámico, carga superficial, morfología, y porcentaje de encapsulación, confieren las principales propiedades de las nanopartículas poliméricas como sistema de liberación de fármacos. Entre las técnicas más empleadas para la determinación de tamaño promedio y distribución de tamaños se encuentra la

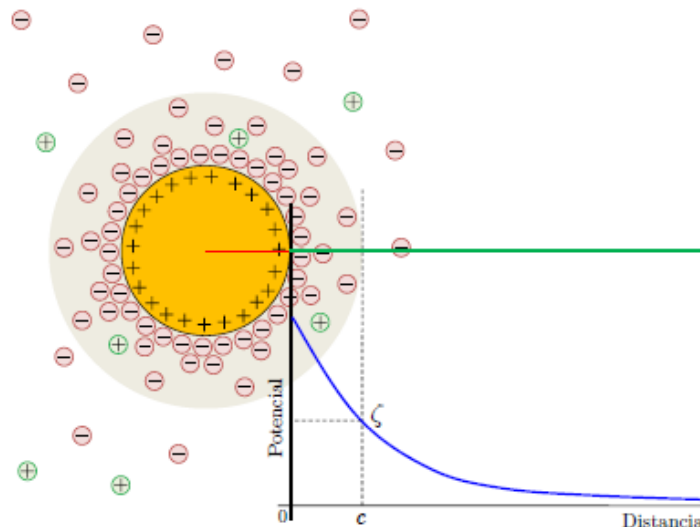
dispersión de luz en modo dinámico (DLS), la cual da información del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en suspensión. La carga superficial de las nanopartículas puede ser determinada por la medida de potencial zeta atribuido al desplazamiento electroforético de las nanopartículas en solución. Los porcentajes de encapsulación pueden ser determinados por diferentes técnicas analíticas como espectroscopia UV-VIS, espectroscopia de fluorescencia, y técnicas cromatográficas. La morfología de las nanopartículas puede ser determinada por microscopía electrónica de barrido (SEM) o transmisión (TEM).

### **1.5.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)**

Es una técnica óptica utilizada en la medición de diámetros de partículas de sistemas coloidales metálicos y poliméricos con partículas de tamaño nanométrico. Las partículas suspendidas en disolventes líquidos experimentan un movimiento Browniano aleatorio, al hacer incidir un haz de luz, éste es dispersado por las partículas en suspensión. Dado que las nanopartículas causan cambios localizados en el índice de refracción, las variaciones de intensidad producidas por las partículas son evaluadas utilizando una función de autocorrelación normalizada. Básicamente, el instrumental empleado consiste en: A) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una solución muy diluida a analizar; B) un fotómetro posicionado a un dado ángulo de detección,  $\theta_r$ , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas; y C) un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo (Hoo et al. 2008).

### 1.5.2 Carga superficial (potencial zeta)

El potencial zeta ( $\zeta$ ), es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen el coloide. Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, ya sea electrostático o estérico. La existencia de una capa de iones absorbidos y disolvente sobre las partículas coloidales está bien establecida en la ciencia de los coloides, esta interfaz recibe el nombre de capa Stern y se puede representar con modelos de absorción en equilibrio. La carga neta se refleja en las propiedades dinámicas de partículas coloidales, puede ser estudiada mediante la movilidad electroforética o la conductividad de la suspensión (Zukoski & Saville 1986). La carga neta se observa desde donde termina la capa de Stern y empieza la capa difusa (figura 2). Un potencial zeta de gran magnitud se correlaciona con una buena estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta tanto positivo como negativo, se repelerán unas con otras. Valores de  $\zeta < -30$  mV ó  $\zeta > +30$  mV son considerados estables (Guerrero 2008).



**Figura 2. Representación del potencial zeta de una nanopartícula esférica**  
(Tomado de Guerrero 2008)

### **1.5.3 Microscopia de barrido electrónico (SEM)**

Es una técnica que utiliza electrones secundarios en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la muestra para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y morfología de la muestra (Pino 2008).

### **1.5.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

La HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o Cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes de una muestra que se reparten entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida compuesta por partículas muy finas contenidas en una columna, y donde se utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente a través de ella, consiguiendo así separaciones de gran resolución, permitiendo su identificación y cuantificación.

La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil bombeada con alta presión a una columna rellena de fase estacionaria y allí el analito se retarda separándose por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

La HPLC permite muy buenas separaciones e identificaciones de sustancias o grupos de sustancias en un tiempo corto, tanto cualitativa como

cuantitativamente. Como condición, es imprescindible que la muestra sea soluble en un disolvente al ser la fase móvil un líquido. Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a sus cualidades de sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su gran adaptabilidad a sustancias que son de gran interés para la industria, la ciencia y la sociedad, incluyendo sustancias tan diversas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenos, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas.

La cromatografía líquida permite cuantificar un analito de una muestra por adición estándar o por curva de calibración. (Zambrano Herrera 2011).

### **1.5.5 Espectroscopia UV-Vis**

La espectroscopía UV-Vis, permite tener un espectro de la región electromagnética comprendida entre longitudes de onda de 250 a 800 nm, dando lugar a las transiciones que involucran a los electrones de valencia. Esta región del espectro, es la única detectable por el ojo humano, en el cual las soluciones coloreadas absorben selectivamente, como producto de las transiciones electrónicas de más baja energía. La concentración del analito es directamente proporcional a la absorbancia. Esta técnica permite cuantificar analitos que presentan absorción de luz en esta región del espectro electromagnético (Skoog et al. 2001)

## 1.6 Microorganismos de estudio

Se eligieron SARM y *E. coli* O157:H7 como modelo de estudio de microorganismos, ya que estas bacterias difieren en la estructura de la membrana, son microorganismos patógenos y presentan resistencia a antibióticos.

### 1.6.1 *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* es encontrada comúnmente en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales como parte de la flora normal (Schroeder et al. 2002). Aunque la mayoría de las cepas aisladas de *E. coli* en el tracto gastrointestinal no son patógenas, existe un porcentaje que lo son y pueden producir una gran variedad de lesiones en diferentes hospederos especialmente en aquellos que se encuentran inmunocomprometidos. Entre las enfermedades que puede causar se encuentran algunas letales como: la meningitis, endocarditis, infección del tracto urinario, septicemia, diarrea epidémica en adultos y niños, infección del saco vitelino, onfalitis, entre otros. En las últimas décadas se han observado brotes severos de enfermedad gastrointestinal producidos por *E. coli* transmitida por contaminación fecal durante el procesamiento de los alimentos, en especial de la cepa O157:H7 (Al-Ghamdi et al. 1999)

Se ha evidenciado que el uso de antibióticos puede llevar a la aparición y diseminación de *E. coli* resistentes, las cuales pueden pasar a la población a través de las comidas o el contacto directo con animales contaminados. El centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) estima que *E. coli* O157:H7 causa más 73.000 enfermedades y 60 muertes cada año en Estados Unidos (Schroeder et al. 2002). Entre los factores de virulencia de esta cepa están la producción de una o más toxinas Shiga, el plásmido pO157, el cual codifica para la hemolisina y el locus de desprendimiento de enterocitos. (Rahal

et al. 2012). Estas cepas de *E. coli* resistentes a una gran gama de antibióticos y altamente toxico-génicas, se han encontrado tanto en Europa como en Colombia y son motivo de preocupación de las autoridades en salud (Pérez et al. 2011; María et al. 2008).

### **1.6.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)**

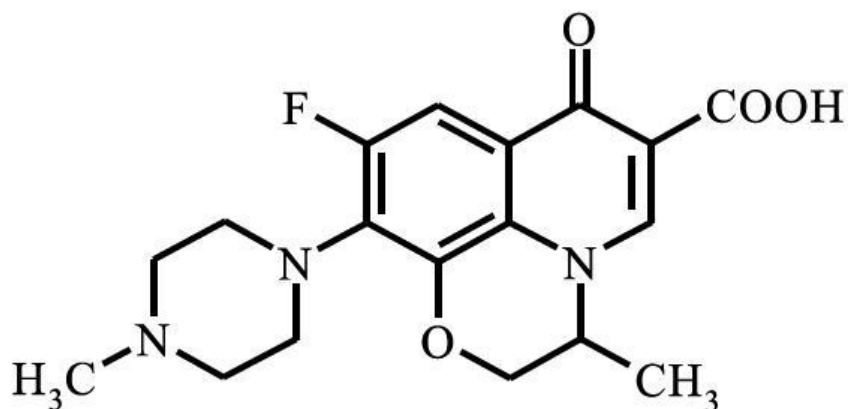
*Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista, Gram-positivo, con morfología de cocos agrupados en racimos y que se encuentra presente en la piel y mucosas de individuos sanos. Es causante de infecciones comunes como forunculosis, infección de heridas en el período postoperatorio e incluso enfermedades más graves como septicemia, neumonía, osteomielitis, endocarditis, síndrome de piel escaldada y síndrome de Shock tóxico, entre otros (Castillo et al. 2012; Zurita et al. 2010; Tarai et al. 2013).

*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue aislado por primera vez en la década del 1960. Esta cepa presenta resistencia inherente a todos los  $\beta$ -lactámicos e incluso algunos clones presentan resistencia a múltiples tipos de antibióticos (Ansari et al. 2011). Esta resistencia conlleva a mayores costos clínicos, secuelas y tiempo de recuperación del paciente, junto con un aumento de la mortalidad y morbilidad de estas infecciones. Esta cepa de *S. aureus* ha adquirido el gen *mecA* el cual codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), la cual interfiere con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, inhibiendo el efecto de éstos sobre la pared celular de las células bacterianas; este gen le confiere resistencia completa a todos los  $\beta$ -lactámicos incluyendo penicilinas semisintéticas (The Center for Food Security & public Health 2011). En Colombia el incremento de infecciones por SARM se ha transformado en un problema de salud pública en los hospitales, en los cuales al 2013 se había



*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos Gram-positivos condujo al uso de la vancomicina para el tratamiento de infecciones. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular de los microorganismos uniéndose a los residuos terminales D-alanil-D-alanina interfiriendo en las reacciones de trans-glicosilación (Van Bambeke et al. 2004). Sin embargo, este antimicrobiano presenta varias limitaciones como la poca penetración en algunos tejidos, el incremento de la concentración mínima inhibitoria y el desarrollo de resistencia en algunos microorganismos (Kullar et al. 2011).

### 1.7.2 Ofloxacin



**Figura 4. Estructura ofloxacin**(Tomado de Sakore et al. 2010).

La ofloxacin es un antibiótico derivado del ácido piridonacarboxílico que pertenece a la familia de las fluoroquinolonas. Es un antimicrobiano que presenta un amplio espectro de acción frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Leroy 1991); el mecanismo de acción de este fármaco está relacionado con la inhibición de la DNA-girasa y la topoisomerasa IV bacteriana. Las topoisomerasas cumplen la función de incluir pliegues helicoidales en el

DNA de doble cadena, lo cual facilita el desenrollamiento de estas cadenas. Por otra parte, la DNA-girasa rompe el cromosoma bacteriano, para luego plegarlo al terminar la transcripción y replicación (Yoshida et al. 1993; Sato et al. 1986). La inhibición de estas dos proteínas conlleva a la muerte de la bacteria por mecanismos aún desconocidos. La ofloxacina es uno de los antibióticos más usados contra infecciones pulmonares, oculares, en el tracto digestivo y en el tracto urinario (Kam et al. 2006; Nayak et al. 2013). Sin embargo, se ha encontrado que diferentes bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus viridans*, entre otras, han desarrollado resistencia a este antibiótico (McGee et al. 2002; Kowalski et al. 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Encapsular vancomicina y ofloxacina en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG y evaluar su actividad antimicrobiana *in vitro* frente *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Escherichia coli* O157:H7.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar y caracterizar el bloque polimérico de PLGA-mPEG.
- ✓ Encapsular vancomicina y ofloxacina en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG.
- ✓ Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas: tamaño hidrodinámico, carga superficial, morfología y porcentaje de encapsulación.
- ✓ Determinar *in vitro* la concentración mínima inhibitoria y bactericida de vancomicina y ofloxacina libres y encapsuladas sobre cepas de 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, Poli etilenglicol monometil éter (mPEG, PM 5000 Da), 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 cultivo, caldo Luria-Bertani (LB), caldo Muller-Hilton (MH) e infusión cerebro corazón (BHI), fueron obtenidos de Oxoid. D-(+)-glucosa fue obtenida de Merck Novabiochem. El tolueno, diclorometano, acetato de etilo fueron obtenidos en 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 es un aislado clínico de la Escuela de Bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Síntesis del bloque polimérico de PGLA-mPEG

La síntesis del bloque polimérico se llevó a cabo por polimerización en masa fundida usando como catalizador 2-etilhexanoato estañoso siguiendo la metodología encontrada en la literatura tal como se describe a continuación (Li et al. 2001; Murugesan et al. 2007). La reacción se realizó empleando el montaje ilustrado en la figura 5. En la reacción se usó 1 gramo de PLGA y 0.2 gramos de mPEG los cuales fueron disueltos en 15 mL de tolueno seco, añadiendo como catalizador 2 mg de 2-etilhexanoato estañoso a la solución. La reacción se llevó a cabo a 114°C en baño de aceite, con agitación a 250 rpm y atmósfera de N<sub>2</sub> durante 8 h. Posteriormente, el tolueno fue retirado bajo presión reducida; el sólido obtenido fue disuelto en diclorometano (DCM), para posteriormente añadir un volumen de agua de 100 mL a esta solución orgánica a 60°C con agitación vigorosa. Finalmente, el sólido fue separado por decantación y secado al vacío durante 3 h.

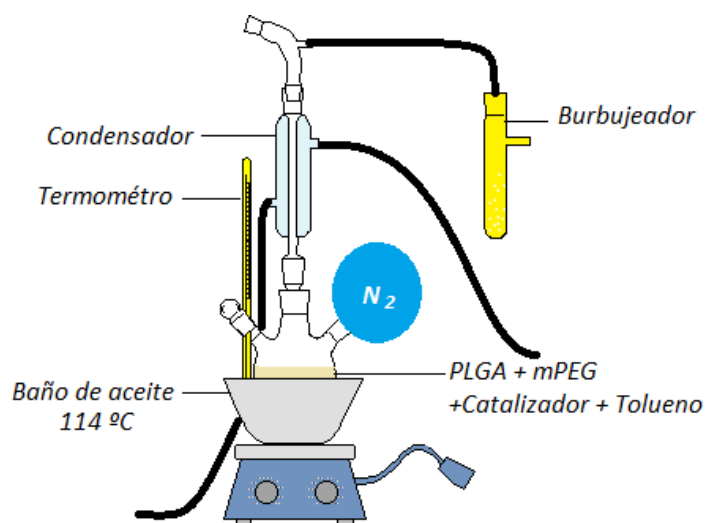


Figura 5. Montaje síntesis del bloque polimérico PLGA-mPEG.

### **3.3.1.1 Caracterización del bloque polimérico**

La caracterización estructural se llevó a cabo por diferentes técnicas instrumentales con el fin de confirmar la estructura del bloque polimérico.

#### **3.3.1.1.1 Espectroscopia infrarroja**

La caracterización de espectroscopia infrarroja se llevó a cabo usando un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker-Tensor 27, con celda ATR Platimun A225/Q de cristal de diamante.

Se tomó una muestra sólida representativa (15-20 mg) del bloque polimérico sintetizado, la cual se llevó a la celda ATR para la toma del espectro. El espectro fue tomado en un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.3.1.1.2 Resonancia magnética nuclear de protones**

El espectro RMN- $^1\text{H}$  fue adquirido utilizando un equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker Avance III de 400 MHz equipado con sonda para muestras líquidas usando como solvente  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado) y como patrón interno de referencia trimetilsilano. Se tomaron 15 mg de PLGA-mPEG y se disolvieron en 1 mL de  $\text{CDCl}_3$ , con una frecuencia de pulsos de 400 MHz. RMN- $^1\text{H}$  acompañado de espectroscopia IR permite la identificación de la estructura. Adicionalmente RMN- $^1\text{H}$  permite calcular la relación monomérica de Láctico:glicólico:etilenglicol en la estructura del bloque polimérico PLGA-mPEG. No fue necesario realizar RMN- $^{13}\text{C}$ , ya que esta técnica si bien permite corroborar los desplazamientos químicos característicos para cada monómero

en la estructura, no es posible integrar la señal, por tanto no da información sobre la abundancia de los monómeros en la estructura. El tratamiento del espectro de RMN-<sup>1</sup>H se realizó en el software MestreNova 5.1.1.

### **3.3.2 Preparación de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG**

De acuerdo con las características hidrofílicas que presentan los fármacos, vancomicina (Faustino & Khan 2008) y ofloxacina (Wongsinsup et al. 2009), se eligió como método de obtención de las nanopartículas doble emulsión solvente-evaporación.

Para determinar las variables que influyen significativamente en el tamaño y la carga superficial, se planteó y desarrolló un diseño experimental Plackett-Burman a dos niveles con las variables normalizadas en una relación 1:5 entre el nivel bajo y alto, respectivamente. Las variables estudiadas en el diseño experimental fueron: concentración del polímero, velocidad de agitación, concentración del surfactante, concentración de agente catiónico, concentración del fármaco, relación  $A_1/O/A_2$  y relación fármaco:polímero. El análisis estadístico se realizó por el cálculo de la *t*-student comparando el efecto de cada variable independiente con la variable respuesta (relación carga/volumen). Los resultados del diseño mostraron que ninguna de las variables tenía una influencia significativa en el tamaño y carga de las nanopartículas (ver **Anexo 1** análisis estadístico *t*-student). Por tanto, se tomaron los siguientes parámetros fijos: 25 mg de polímero, 100  $\mu$ L (12.5 mg/mL) de vancomicina, 1 mL de solvente orgánico, 10 mL de fase acuosa externa a pH 7.0. Se decidió variar las mezclas agente estabilizante-agente catiónico para buscar los tamaños en un rango de 200 – 400 nm y nanopartículas con carga positiva.

### **3.3.2.1 Encapsulación de vancomicina en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG**

La vancomicina fue encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG utilizando el método doble emulsión-solvente evaporación como se describe a continuación: 100  $\mu$ L de solución acuosa ( $A_1$ ) con una concentración 12.5 mg/mL de vancomicina se añadió sobre 1 mL de solvente orgánico ( DCM o acetato de etilo) (O) que contenía previamente disuelto 25 mg de PLGA-mPEG; esta mezcla se colocó en un Vortex a 3000 rpm durante 20 minutos para formar la primera emulsión  $A_1/O$ . Inmediatamente después, esta primera emulsión fue añadida sobre 10 mL de una solución acuosa ( $A_2$ ) a pH 7.0, que contenía una mezcla de surfactante (Poloxámero o PVA 0.5 % p/v) y un agente catiónico (gelatina ó PEI0.5%), la cual se agitó con un Ultraturrax a 15500 rpm durante 5 minutos en un baño de hielo externo para evitar la degradación del polímero. Una vez formada la segunda emulsión, el solvente orgánico fue retirado por presión reducida dando paso a la formación de las nanopartículas poliméricas. Posteriormente, se realizó la purificación de las nanopartículas por centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron tres lavados con agua tipo I para garantizar la completa eliminación de los remanentes de polímero, fármaco, surfactante y agente catiónico.

### **3.3.2.2 Ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG**

La ofloxacina fue encapsulada bajo las mismas condiciones estandarizadas para vancomicina. Debido a la diferencia de solubilidad de ofloxacina en agua respecto a vancomicina, se usó como fase acuosa interna solución tampón fosfato 25 mM pH 3.2, donde la ofloxacina presenta una mayor solubilidad. La concentración de ofloxacina en la fase acuosa interna fue de 5 mg/mL.

### **3.3.3 Caracterización fisicoquímica de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en nanopartículas poliméricas del PLGA-mPEG**

Las características fisicoquímicas de las nanopartículas, tales como el tamaño hidrodinámico, carga superficial, morfología, y porcentaje de encapsulación, están estrechamente relacionadas con la internalización celular, la interacción con la diana biológica y la eficiencia de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco (Huh & Kwon 2011; Chan et al. 2012). De manera que la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas es un paso determinante en la evaluación como nanosistemas de liberación de fármacos.

#### **3.3.3.1 Tamaño hidrodinámico promedio**

La determinación del tamaño hidrodinámico promedio y el índice de polidispersión, que indica la distribución de tamaños hidrodinámicos de las nanopartículas poliméricas, se realizó a 25 °C usando una cubeta plástica de volumen reducido utilizando la técnica DLS operado en un ángulo de incidencia de 90°, con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS. En cada experimento se tomó un volumen de muestra de 520 µL a pH 6.0 con una concentración de 0.5 mg/mL de nanopartículas.

### **3.3.3.2 Carga superficial**

La carga superficial fue evaluada a través de la medición del potencial zeta tomando una dilución de muestra 1:10 con una solución fosfato 1 mM pH 6.0. Las medidas del potencial zeta se llevaron a cabo en el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern, USA) por triplicado con cubeta capilar plástica DST 1060 con electrodos de oro.

### **3.3.3.3 Morfología**

El estudio de las características morfológicas de los encapsulados de vancomicina y ofloxacina en nanopartículas de PLGA-mPEG se llevó a cabo utilizando un microscopio de barrido electrónico (FE-SEM, QUANTA FEC 650) que posee un detector de electrones secundario, mediante el modo STEM.

Para la preparación de la muestra, se tomaron 5  $\mu$ L de las NPs purificadas y se depositaron sobre un *grid* con recubrimiento de oro (EMS, 100–400 mesh). Posteriormente, se evaporó el solvente acuoso de las NPs a temperatura ambiente y se analizaron las muestras empleando un voltaje de aceleración de 30 kV y 60000 X de ampliación.

### **3.3.3.4 Porcentaje de encapsulación**

El contenido de vancomicina y ofloxacina encapsulados en las NPs de PLGA-mPEG fue determinado empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa RP-HPLC y espectrofotometría UV-VIS, respectivamente.

En general, el porcentaje de encapsulación de los antibióticos se calculó empleando el método directo, es decir, se destruyeron las nanopartículas poliméricas en solución orgánica y se realizó una extracción líquido-líquido. Los cálculos del porcentaje de encapsulación se llevaron a cabo por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Encapsulación = \frac{\text{Antibiótico encapsulado}}{\text{Total antibiótico utilizado}} \times 100$$

Después del proceso de purificación de las nanopartículas, éstas fueron disueltas en DCM; se usó 1 mL de DCM por cada 10 mg de polímero; se agitó a 3000 rpm durante 5 minutos en Vortex para garantizar la solubilización de las nanopartículas en la fase orgánica. Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido para extraer los antibióticos desde la fase orgánica con solución tampón en una relación volumétrica 1:2. La vancomicina fue separada usando una solución de tampón fosfato 25 mM a pH 3.2 (Ozalp et al. 2001), para garantizar un mayor contacto entre las fases orgánica-acuosa se agitó en un Vortex a 3000 rpm durante 10 minutos. Para separar las dos fases se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el volumen de fase acuosa para su cuantificación por HPLC. Para la cuantificación de ofloxacina se empleó DCM para destruir las nanopartículas y posteriormente se cuantificó por UV-VIS.

#### **3.3.3.4.1 Cuantificación de vancomicina**

La cuantificación de vancomicina se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia con un cromatógrafo Agilent, modelo 1100, equipado con una bomba cuaternaria G1311A, detector de arreglo de diodos (DAD), modelo G1315A y un inyector automático, G1321.

El método para la cuantificación de vancomicina se basó en el desarrollado por la FDA (Faustino & Khan 2008); las condiciones cromatográficas se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas para la cuantificación de vancomicina.

Parámetro	Condición
Detector	UV-230 nm
Columna	C <sub>18</sub> 250 x 4.6 mm, 5m (Zorbax GF-250)
Precolumna	C <sub>18</sub> 3 x4.6 mm, 5m (Zorbax DIOL 2- Pack)
Elución	Isocrática
Fase móvil	9% ACN/ tampón 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH	3,2
Flujo	1,0 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Temperatura	25 °C

Se emplearon soluciones patrón de vancomicina con concentraciones en un rango lineal de: 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 y 50.0 µg/mL para realizar una curva de calibración (**anexo 2**). Cada patrón fue filtrado a través de un filtro 0.22 µm (Millex®, Millipore, Barcelona, España), depositados en viales de vidrio.

#### 3.3.3.4.2 Cuantificación de ofloxacina

La ofloxacina fue cuantificada por espectroscopia UV-VIS a una longitud de onda de 294 nm. La curva de calibración (**anexo 3**) se realizó tomando patrones con concentraciones en un rango lineal de 4.0, 5.0, 6.0,8.0 y 10ug/mL usando como solvente DCM.

### **3.3.4 Determinación del efecto antimicrobiano de los antibióticos sin encapsular y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los antibióticos (vancomicina y ofloxacina) sin encapsular y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG usando el método de microdilución en caldo en placas multi-pocillo de ELISA. Los protocolos para el control y crecimiento de bacterias fueron estandarizados previamente en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (Paredes 2011).

Inicialmente, se preparó un preinóculo para cada una de las bacterias en medio líquido, caldo Luria-Bertani (LB) y caldo Muller-Hilton (MH) para *E.coli* O157:H7 y SARM, respectivamente. Los preinóculos se realizaron en el 10% del volumen final de crecimiento, y se llevó a incubación por un período de 12 h a 37 °C y 200 rpm. Después de transcurrido el tiempo se llevó al volumen final, se ajustó a la escala McFarland hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $4.6 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL para *E. coli* O157:H7 y  $7 \times 10^8$  UFC/mL para SARM.

Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100  $\mu$ L de este inóculo bacteriano durante 8 horas, en microplacas que previamente contenían diluciones acuosas de: vancomicina (0,3– 3,2  $\mu$ g/mL) u ofloxacina (0,05-0,3  $\mu$ g/mL) o de cada antibiótico encapsulado en nanopartículas de PLGA-mPEG. A continuación, se incubaron las microplacas 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 cada una hora. 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<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> corresponden a las dosis que inhibieron el 50% y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

Los porcentajes de inhibición para cada uno de los antibióticos (libres y encapsulados) se calcularon por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = 100 - \frac{[(A_f - A_0) * 100]}{A_c}$$

$A_f$ = Absorbancia final de crecimiento en la concentración de fármaco evaluada

$A_0$ = Absorbancia inicial de crecimiento en la concentración de fármaco evaluada

$A_c$ = Absorbancia final de la bacteria en ausencia de fármaco

La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó a partir de los valores que presentaron una  $CMI \geq 50\%$ . Inmediatamente después de realizada la determinación de las CMI, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L en cada uno de los pocillos con las concentraciones a evaluar y se inocularon con 900  $\mu$ L de medio de cultivo líquido infusión de cerebro-corazón (BHI). Los cultivos se llevaron a cabo en tubos Eppendorf previamente esterilizados y fueron incubados a 37 °C con los respectivos controles. Después, se confirmó la CMB sembrando en cajas Petri aquellas concentraciones donde la absorbancia haya sido igual a la del medio puro. Posterior a la incubación en medio sólido BHI durante 24h, se determinó como CMB aquella concentración donde no hubo crecimiento alguno de colonias microbianas.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Obtención y caracterización del bloque polimérico**

La identidad del bloque polimérico sintetizado PLGA-mPEG fue determinada por espectroscopia infrarroja y espectroscopia de resonancia magnética nuclear; la estructura del bloque polimérico se ilustra en la figura 6.

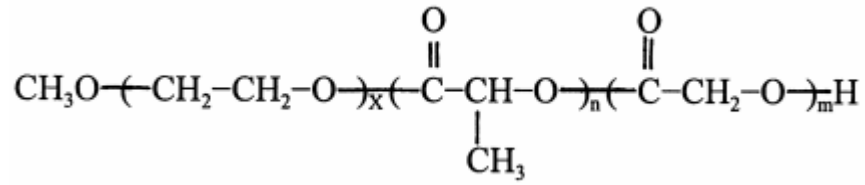


Figura 6. Estructura bloque polimérico PLGA-Mpeg

#### 4.1.1 Espectroscopia infrarroja ATR

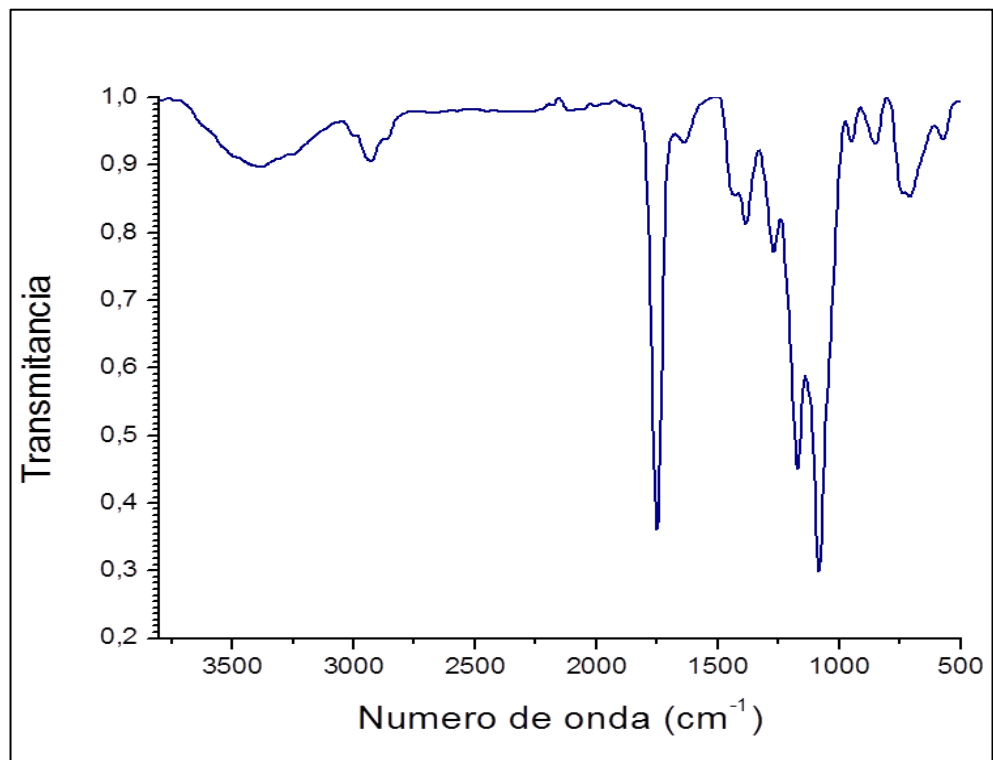


Figura 7. Espectro IR-ATR del bloque polimérico PLGA-mPEG sintetizado.

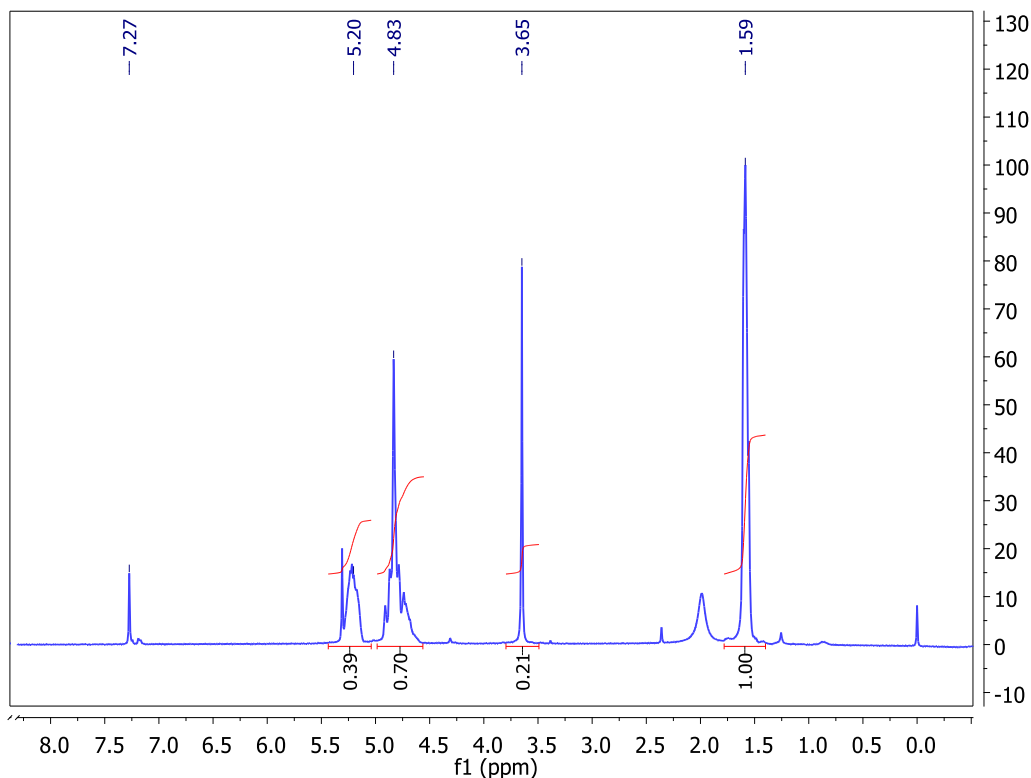
**Tabla 2.** Resumen bandas de vibración espectro IR del PLGA-mPEG

Número de onda [cm <sup>-1</sup> ]	Enlace	Tipo de vibración
3376	-OH	Tensión
2996	-CH <sub>2</sub> , -CH	Tensión
1751	C=O	Tensión
1171	-C-O	Flexión
1085		

El espectro infrarrojo obtenido del producto sintetizado (**Figura 7**) muestra las principales bandas características de los grupos funcionales presentes en la estructura del bloque polimérico PLGA-mPEG. A 3376 cm<sup>-1</sup> se evidencia la banda correspondiente a la tensión del enlace OH presente en el extremo glicólico de la estructura; mientras que a 2996 cm<sup>-1</sup> se observan as tensiones generadas por los grupos CH<sub>2</sub> y CH del residuo glicólico y láctico, respectivamente. La banda observada a 1751 cm<sup>-1</sup> es atribuida a la vibración del enlace C=O presentes en los residuos del ácido láctico y glicólico del copolímero. Finalmente, a 1171 y 1085 cm<sup>-1</sup> aparecen las vibraciones de la flexión del enlace C-O de los ácidos láctico y glicólico.

Por medio de este análisis se logró evidenciar las principales bandas de los grupos funcionales presentes en la estructura del bloque polimérico PLGA-mPEG de acuerdo con los espectros encontrados de la literatura (Murugesan et al. 2007).

#### 4.1.2 Resonancia magnética nuclear de protones (RMN-<sup>1</sup>H)



**Figura 8. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del bloque polimérico PLGA-mPEG**

El análisis de RMN-<sup>1</sup>H se realizó usando como patrón de referencia el desplazamiento químico de tetrametilsilano (TMS) (**Figura 8**). En el espectro se observa un singulete con desplazamiento químico de 3.65 ppm generado por los grupos metilenos del mPEG. La superposición de dobletes observada a 1.56 ppm es atribuida a los protones de los grupos metil del ácido láctico en la cadena polimérica. Finalmente, las señales observadas en 5.2 ppm y 4.8 ppm corresponden a los multipletes del grupo CH del ácido láctico y CH<sub>2</sub> del ácido glicólico, respectivamente (Li et al. 2001).

La relación monomérica del ácido láctico, ácido glicólico y etilenglicol en la composición del bloque polimérico PLGA-mPEG se calculó integrando las señales normalizadas tomando como referencia la señal de 1.56 ppm del ácido

láctico que presenta la mayor intensidad; la relación encontrada fue 1:0.70:0.21 respectivamente (Kim et al. 2005; Mattheolabakis et al. 2009).

Los análisis llevados a cabo por espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear confirmaron la identidad del bloque polimérico sintetizado.

#### **4.2 Preparación de vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG**

La vancomicina y ofloxacina fueron encapsuladas por el método de doble emulsión solvente- evaporación ( $A_1/O/A_1$ ) variando diferentes parámetros como: el solvente orgánico (diclorometano y acetato de etilo), agente catiónico (polientilenimina y gelatina) y el pH, con el fin de obtener nanopartículas con un tamaño en un rango de 200-400 nm y de carga superficial positiva.

##### **4.2.1 Caracterización fisicoquímica**

Se realizó la caracterización fisicoquímica determinando el tamaño hidrodinámico promedio, carga superficial, morfología y porcentaje de encapsulación para cada uno de los antibióticos encapsulados con los diferentes parámetros evaluados.

##### **4.2.2 Tamaño hidrodinámico promedio**

Se estudió la variación del tamaño hidrodinámico promedio de las nanopartículas obtenidas con diferentes mezclas de agentes estabilizante-agente catiónico (Tabla 3), los cuales fueron evaluados en una concentración del 0,5 % p/v de acuerdo con la revisión bibliográfica.

**Tabla 3.** Tamaño hidrodinámico promedio agente estabilizante-agente catiónico

DS:

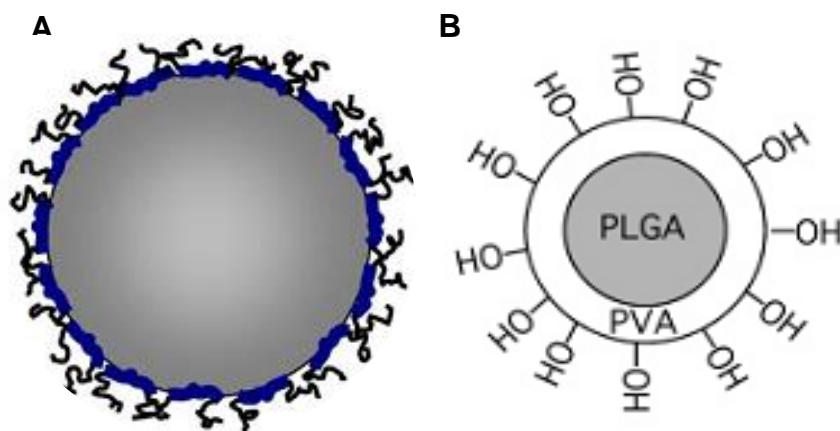
Agente Estabilizante	Agente Catiónico	Tamaño $\pm$ DS [nm]	Pdl (índice de polidispersión)
PVA 0,5% (p/v)	Gelatina 0,5% (p/v)	710 $\pm$ 12	1
PVA 0,5% (p/v)	PEI 0,5% (p/v)	452 $\pm$ 19	1
Poloxámero 407 0,5% (p/v)	Gelatina 0,5% (p/v)	233 $\pm$ 13	0,3
Poloxámero 407 0,5% (p/v)	PEI 0,5% (p/v)	292 $\pm$ 17	0,3

Desviación estándar para N=3

Con el uso del poloxámero 407 se obtuvieron nanopartículas con un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 300 nm y con baja polidispersión, siendo estos tamaños menores a los obtenidos con PVA. El poloxámero 407 es un polímero anfipático no-iónico con un centro hidrofóbico de polioxipropileno (POP) y extremos hidrofílicos de polioxietileno (POE); el poloxámero se une sobre la superficie de las nanopartículas hidrofóbicas a través de los grupos POP mientras sus brazos hidrofílicos son orientados hacia el medio acuoso proporcionando estabilidad a la suspensión por un mecanismo de estabilización estérica (**figura 9A**)(Moghimi & Hunter 2000; Santander et al. 2006). Por otra parte, el PVA es un agente estabilizante no iónico que ha demostrado permanecer en la superficie de las nanopartículas aún después de lavados repetidos, el PVA estabiliza las nanopartículas poliméricas orientando los

grupos  $-OH$  hacia el medio acuoso e interactúa a través de los grupos etileno con la superficie hidrofóbica de las nanopartículas (**figura 9B**)(Keegan et al. 2004).

La mayor estabilidad estérica del poloxámero frente al PVA podría estar asociada al volumen de los grupos POP orientados hacia la fase acuosa evitando la aglomeración y precipitación de las mismas (El Badawy et al. 2010).



**Figura 9 Estabilización estérica de la nanopartículas porliméricas. A) estabilización por medio poloxámero (Tomada de Santander et al. 2006) B) estabilización por medio del PVA(Tomada de Keegan et al. 2004)**

De acuerdo con los resultados obtenidos de tamaño hidrodinámico promedio y estabilidad de la emulsión, se eligió el poloxámero como agente estabilizante para los ensayos posteriores.

#### 4.2.3 Carga superficial

Se midió el potencial zeta de las nanopartículas preparadas para cada uno de los parámetros estudiados. Se buscó la obtención de nanopartículas poliméricas con carga superficial positiva para mejorar la interacción electrostática con la

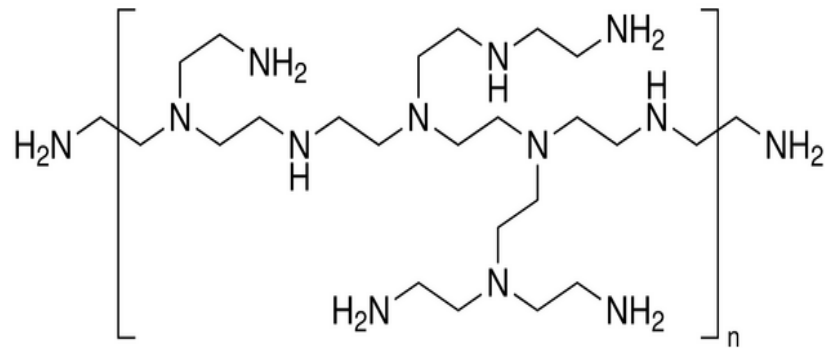
membrana bacteriana la cual posee una carga superficial negativa (Wilson et al. 2001; Dillen et al. 2008; Radovic-moreno et al. 2012).

**Tabla 4.** Determinación del potencial zeta de nanopartículas de PLGA-mPEG en diferentes mezclas de agente catiónico –agente estabilizante

Agente estabilizante	Agente Catiónico	Potencial [mV]±DS
PVA 0,5% (p/v)	Gelatina 0,5% (p/v)	+ 0,94±0,2
PVA 0,5% (p/v)	PEI 0,5% (p/v)	+ 6,25±0,3
Poloxamer 407 0,5% (p/v)	Gelatina 0,5% (p/v)	+ 0,33±0,06
Poloxamer 407 0,5% (p/v)	PEI 0,5% (p/v)	+ 3,14±0,70

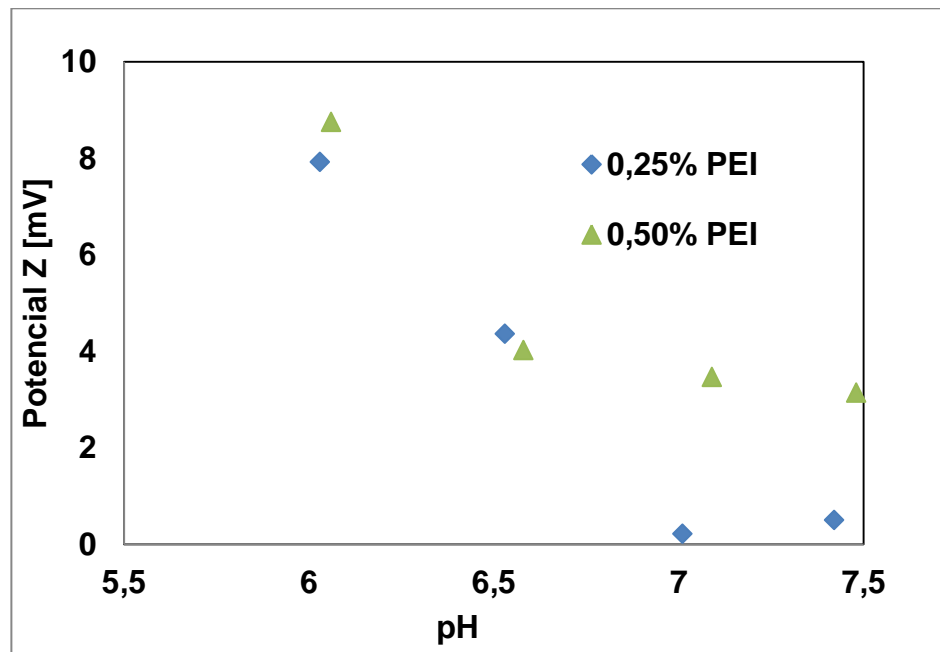
DS: Desviación estándar para N=3

Como puede observarse, el uso de PEI frente a la gelatina aumentó significativamente la carga superficial positiva de las nanopartículas. Estos resultados podrían estar atribuidos a la abundancia de grupos amino en la estructura de la PEI (Hunter 2006) (**figura10**). Por otro lado, la menor carga superficial positiva conferida por la gelatina con respecto a PEI se debe a que su punto isoeléctrico está en un rango de pH entre 7,0 y 9,0. (Vandervoort & Ludwig 2004; Kumari et al. 2010); por lo tanto, a pH 7,4 la carga neta tiende a ser cero, de manera que existe una menor interacción con la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, la adición de gelatina causó formación de agregados al cabo de tres horas, lo cual mostró la baja estabilidad de la emulsión.



**Figura 10. Estructura de la PEI** (Tomado de Sigma-Aldrich 2014a)

Se ha demostrado que la carga superficial es directamente proporcional al pH (Radovic-moreno et al. 2012; Rezvani Amin et al. 2013), por esta razón, se estudió el cambio del potencial zeta a diferentes pH (**figura 11**).



**Figura 11. Evaluación de la carga superficial de las nanopartículas recubiertas con PEI a diferentes pHs.** Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG, 1 mL DCM, 100  $\mu$ L vancomicina 12,5 mg/mL como fase acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámero y PEI (0,25 y 0,5) % p/v como fase acuosa externa.

Los resultados mostraron una dependencia de la carga superficial respecto al pH. Este hecho podría estar asociado a una mayor adsorción de la PEI sobre las nanopartículas. Debido a la disminución del pH, un mayor número de grupos amino presentes en la estructura del PEI podrían encontrarse protonados, de manera que el potencial zeta tiende a valores positivos (Vandervoort & Ludwig 2004).

Además, se encontró que a pH 6.0 se obtiene un potencial zeta positivo de mayor magnitud. Por esta razón, y con el fin de aumentar esta carga superficial se estudió el efecto de la concentración de PEI (0,15, 0.35, 1 % p/v) a pH 6,0 (tabla 5).

**Tabla 5.** Evaluación del efecto de la variación de la concentración de PEI a pH 6,0 sobre la carga superficial de vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG.

Porcentaje PEI %(p/v)	Tamaño±DS [nm]	Carga ± DS [mV]
0	253±1,73	-6,38±0,4
0,15	293±2,6	+ 9,3±0,6
0,25	278±13	+ 7,9±0,7
0,35	294±8	+ 3,8±1,2
0,5	243±11	+ 3,14±0,3
1	223±7	+ 0,13±0,05

Se demostró que en ausencia de PEI, las nanopartículas presentaron un potencial zeta negativo debido a que a pH 6,0 los grupos carboxílicos presentes

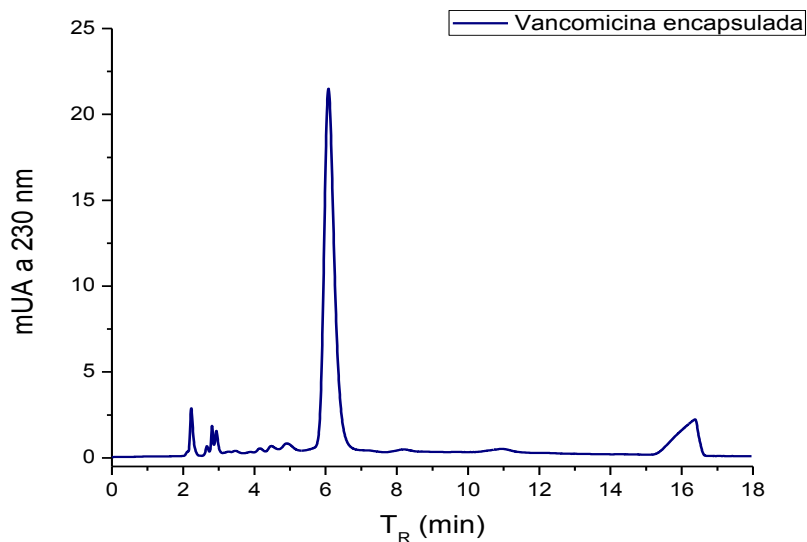
en la estructura del bloque polimérico se encuentran disociados, lo cuales confiere carga negativa.

La tendencia de los datos mostró que al incrementar la concentración de PEI la carga superficial de la nanopartícula disminuye, esto se debe a que la PEI es un polielectrolito, por tanto, incrementa la fuerza iónica del medio debido a los grupos ionizables presentes en su estructura, de manera que disminuyen las interacciones iónicas con la nanopartícula, en consecuencia el potencial zeta disminuye (Boussif et al. 1995). Además, se puede observar que el tamaño hidrodinámico promedio incrementa de manera proporcional al incremento de la carga positiva de la nanopartícula. Este hecho está asociado con una mayor adsorción de la PEI sobre la superficie.

Se logró obtener vancomicina encapsulada nanopartículas positivas de PLGA-mPEG con el uso de PEI en la fase acuosa externa permitiendo modificar la carga superficial de la NPs en un solo paso de obtención de nanopartículas tal como se ha reportado en la literatura para NPs de PLGA/ADN (Da et al. 2012). La mayor carga superficial positiva se obtuvo a una concentración de PEI de 0,15 % (p/v). Esta concentración se mantuvo constante en los ensayos posteriores de porcentaje de encapsulación, morfología y ensayos microbiológicos.

#### **4.2.4 Porcentaje de encapsulación**

La cuantificación de vancomicina se llevó a cabo utilizando HPLC. Este análisis permitió la identificación y cuantificación de vancomicina con un tiempo de retención de 6,2 minutos (**figura 12**), el cual aparece con el mismo tiempo de retención de los patrones de la curva de calibración.



**Figura 12. Cromatograma obtenido para un extracto de vancomicina con una concentración de 6,29 ppm.** Condiciones: Columna C<sub>18</sub> 250 x4.6 mm, 5 µm. Fase móvil: solución tampón fosfato 25 mM/ACN 91/9, flujo 1 mL,  $\lambda=230$  nm.  $t_R=6.2$  minutos.

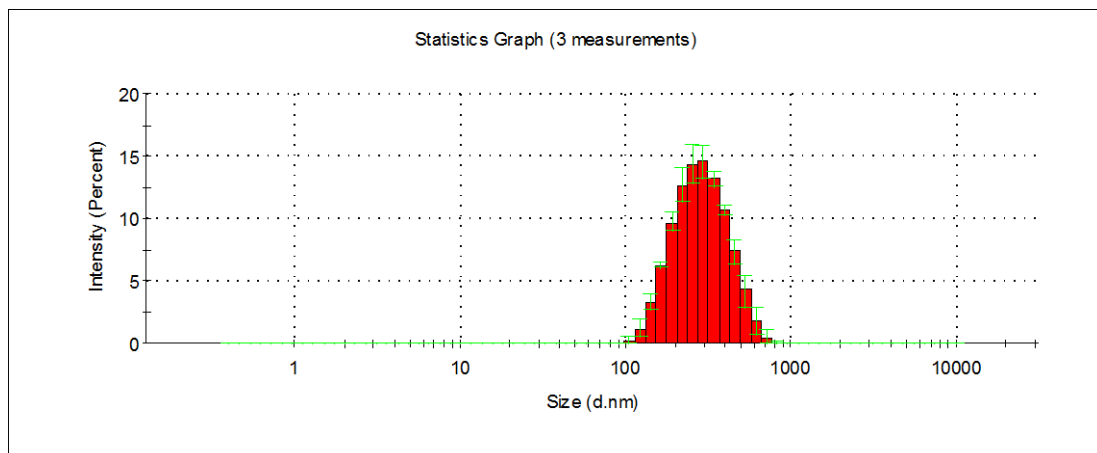
**Tabla 6.** Efecto del tipo de disolvente sobre el porcentaje de encapsulación de vancomicina en nanopartículas de PLGA-mPEG.

Solvente	% Encapsulación
DCM	0,21%
Acetato de Etilo	0,53 %

Inicialmente, se evaluó el porcentaje de encapsulación con los parámetros ya estandarizados para el tamaño hidrodinámico promedio y la carga superficial. Sin embargo, el porcentaje de encapsulación fue menor del 1%, debido a la baja afinidad de la vancomicina por el PLGA y la alta afinidad por la fase acuosa externa (Barichello et al. 1999). Por tanto, se evaluó el acetato de etilo como solvente, ya que uno de los factores que mayor efecto tiene en el porcentaje de

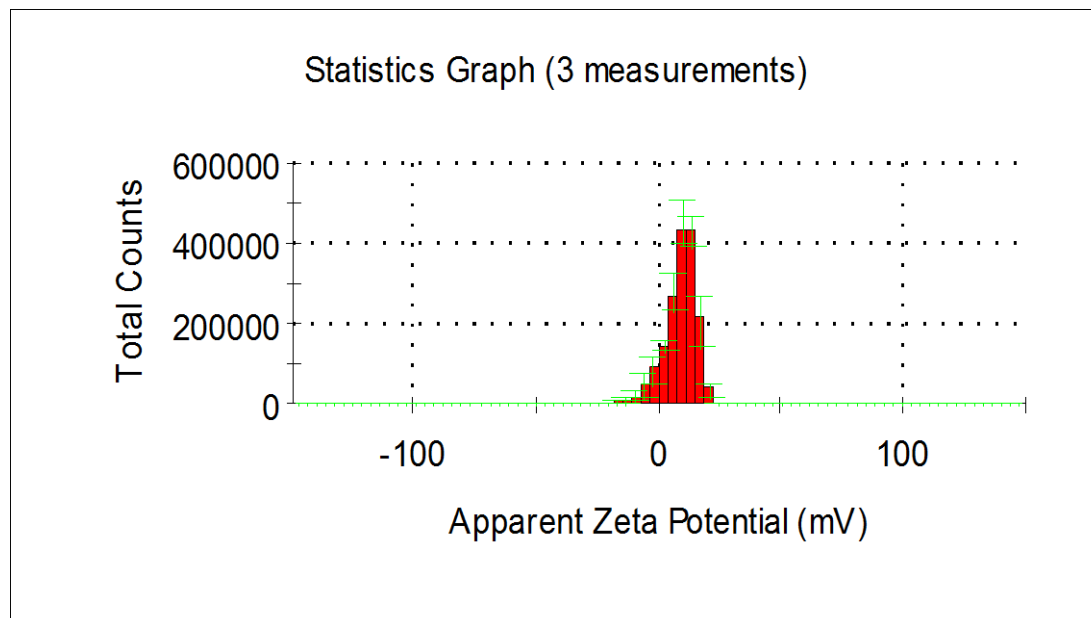
encapsulación es el solvente orgánico, debido a que las diferentes tasas de precipitación de nanopartículas dependen del nivel de miscibilidad en agua (Cheow & Hadinoto 2010). El uso de acetato de etilo condujo a un mejor porcentaje de encapsulación respecto al DCM. Esto se debe a que el acetato de etilo es parcialmente soluble en agua y puede difundirse en el medio acuoso más fácilmente que el DCM creando regiones de supersaturación. Como resultado de la agregación de polímero cada gota de solvente en la emulsión en las regiones de supersaturación conduce a la formación de varias nanopartículas atrapando una mayor cantidad de fármaco (Cohen-sela, Chorny, et al. 2009). Otros estudios han demostrado que el uso de acetato de etilo mejora el porcentaje de encapsulación con respecto al uso de DCM de diferentes agentes activos en nanopartículas poliméricas, hecho que es atribuido a las diferencias en la precipitación de las nanopartículas (Freytag et al. 2000; Cheow & Hadinoto 2010).

La evaluación de los diferentes parámetros permitió obtener nanopartículas poliméricas con un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de los 300 nm, (figura 13) con una carga superficial positiva de +9,7 mV (figura 14) y un porcentaje de encapsulación de 0,50%.



**Figura 13. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG. Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG,**

1 mL DCM, 100  $\mu$ L vancomicina 12,5 mg/mL como fase acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámeroy 0,15 PEI % p/v como fase acuosa externa.



**Figura 14. Histograma de distribución de carga superficial de vancomicina encapsulada en nanopartículas positivas de PLGA-mPEG.** Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG, 1 mL DCM, 100  $\mu$ L vancomicina 12,5 mg/mL como fase acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámeroy 0,15 PEI % p/v como fase acuosa externa.

Recientemente, Zakeri y colaboradores (Zakeri-milani et al. 2013) encapsularon vancomicina en nanopartículas de PLGA por el método doble emulsión-solvente evaporación ( $A_1/O/A_2$ ). Los tamaños hidrodinámicos promedio para vancomicina encapsulada en PLGA fueron mayores que los obtenidos en este trabajo, este hecho podría ser atribuido a las condiciones de la emulsión utilizados. Las diferencias en el tamaño de las nanopartículas podría ser atribuido a las condiciones para formar las emulsiones. Para la obtención de nanopartículas en este trabajo se usó una mayor velocidad y tiempo de agitación lo que conduce a una disminución del tamaño hidrodinámico (Ahmed et al. 2012). La carga superficial aumentó debido a la presencia del agente catiónico PEI. Sin

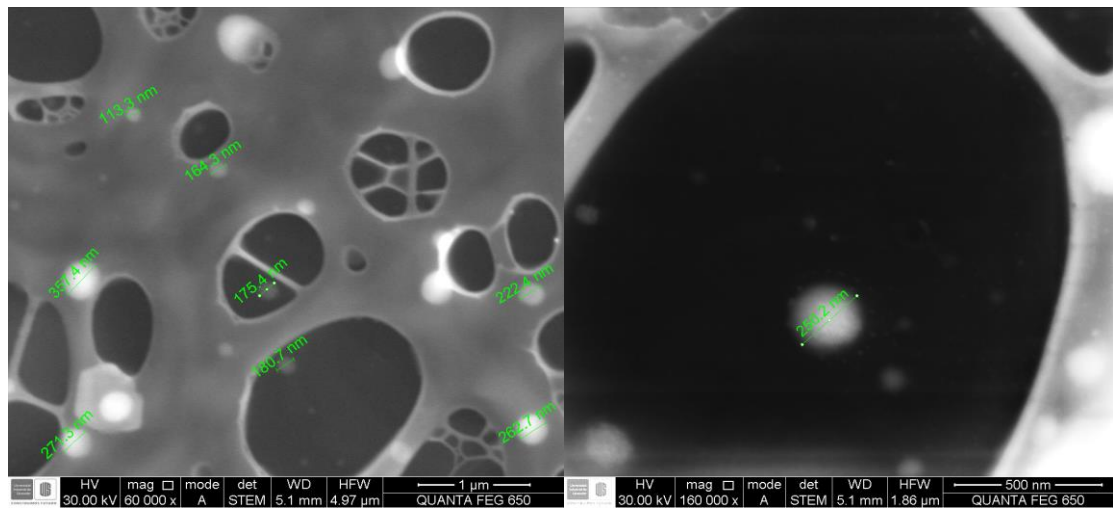
embargo, el porcentaje de encapsulación fue menor con respecto a los resultados de Zakeri, las diferencias podrían ser atribuidas al mayor tiempo de formación de la emulsión lo que facilita la difusión de la vancomicina al medio acuoso (Loveymi et al. 2012).

Radovic y colaboradores (Radovic-Moreno et al. 2012) encapsularon vancomicina en NPs de PLGA-mPEG y PLGA-PLH-mPEG ( PLH: polihistidina) por el método  $A_1/O/A_2$  con un tamaño de 196 nm y 221 nm, respectivamente. El tamaño hidrodinámico mayor con respecto al obtenido por Radovic podría atribuirse a una mayor concentración del polímero en la fase orgánica y una menor relación entre las fases  $A_1/O/A_2$  (Giri et al. 2013).

Finalmente, las mejores condiciones encontradas para obtener vancomicina encapsulada en un sistema nanoestructurado de PLGA-mPEG con un promedio hidrodinámico de 300 nm y carga superficial fueron: 25 mg PLGA-mPEG, 1 mL de acetato de etilo, 100  $\mu$ L (12,5 mg/mL) de vancomicina, 0,5 % (p/v) de poloxámero 407, 0,15% de PEI, velocidad de emulsión 15500 rpm.

#### **4.2.5 Microscopia electrónica de barrido STEM para vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG**

Como puede observarse en la figura 15, la vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG presenta una morfología esférica, con una distribución de tamaños cercana a 300 nm, tal como fue observada por DLS. La morfología de las nanopartículas fue similar a la obtenida por otros autores para vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG (Radovic-moreno et al. 2012). Por otra parte, no fue posible determinar mediante microscopia STEM el tipo de estructura, nanocápsula o nanoesfera, adoptada por las nanopartículas de PLGA-mPEG debido a que no se pudo observar el interior de la nanopartícula para diferenciar la estructura.

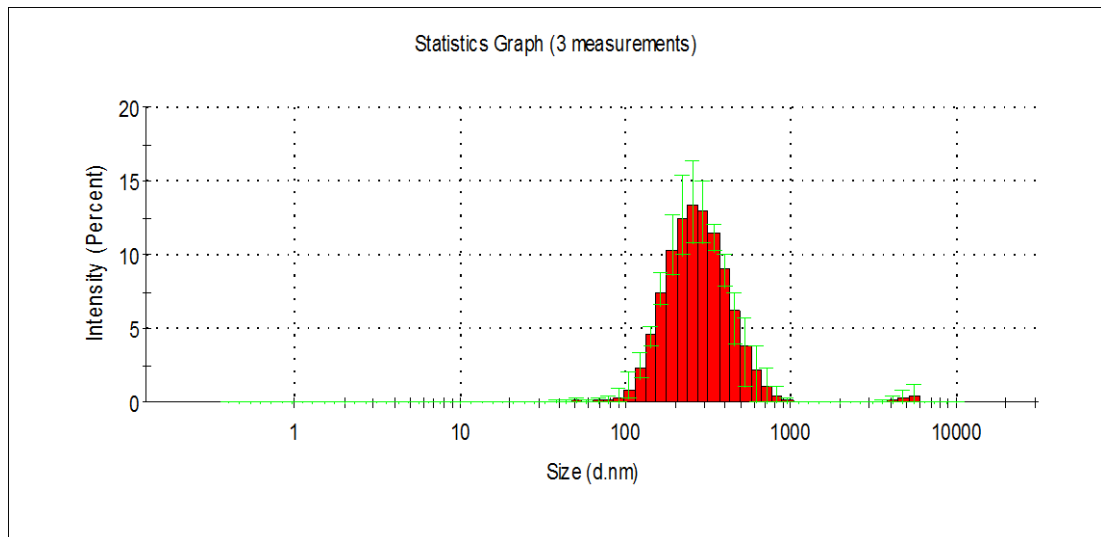


**Figura 15. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica STEM para vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG. Condiciones: voltaje de aceleración 30 kV, ampliación 160000 X, modo: STEM.**

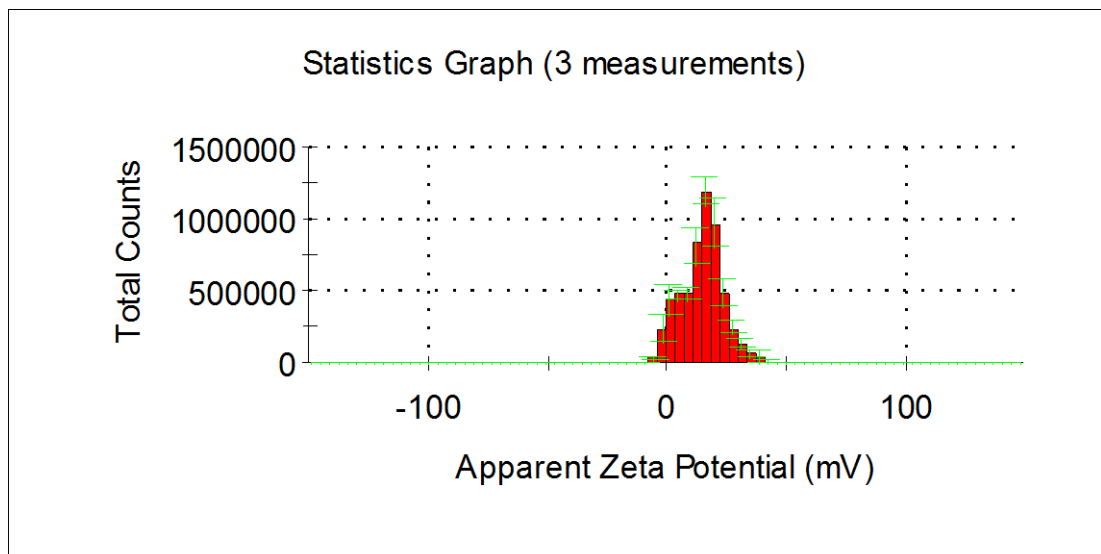
### **4.3 Encapsulación de ofloxacina en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG**

Para realizar la encapsulación de ofloxacina se tomaron las mejores condiciones evaluadas en la encapsulación de vancomicina, excepto la concentración de la fase acuosa interna debido a que ensayos preliminares mostraron que la ofloxacina difiere en la solubilidad respecto a vancomicina.

Los resultados mostraron que el tamaño hidrodinámico promedio se mantuvo alrededor de los 300 nm (**figura16**) y la carga superficial de las nanopartículas se encontró alrededor de +14,8 mV (**figura 17**).



**Figura 16.** Histograma de distribución de tamaño hidrodinámico promedio de ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG. Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG, 1 mL DCM, 100  $\mu$ L ofloxacina 5 mg/mL como fase acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámero y 0,15 PEI % p/v como fase acuosa externa.



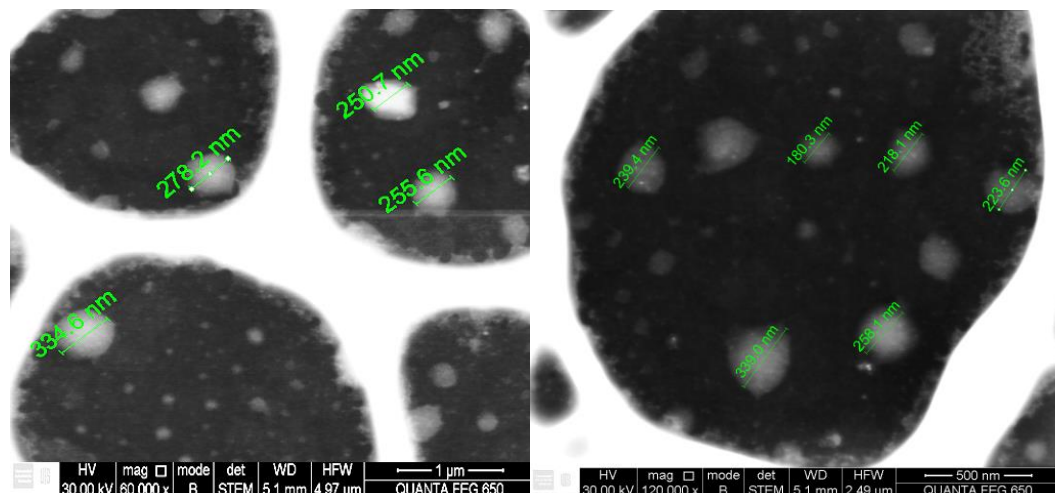
**Figura 17.** Histograma distribución de carga superficial para ofloxacina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG. Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG, 1 mL DCM, 100  $\mu$ L ofloxacina 5 mg/mL como fase

acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámero y 0,15 PEI % p/v como fase acuosa externa.

El porcentaje de encapsulación fue determinado por espectroscopia UV-VIS, el porcentaje de encapsulación de ofloxacina en NPs de PLGA-mPEG positivas fue de 3,7 % y en NPs de PLGA-mPEGnegativas fue de 2,95%. Los porcentajes de encapsulación de ofloxacina fueron más altos respecto a vancomicina, debido a que la ofloxacina presenta una menor solubilidad en agua a pH 7, de manera que disminuye la fugacidad hacia la fase acuosa externa(Ross & Riley 1990).

El tamaño hidrodinámico promedio obtenido para ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG fue similar al obtenido por Cheow y colaboradores (Cheow & Hadinoto 2011) para ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA. Sin embargo, los porcentajes de encapsulación obtenidos por Cheow (2011) fueron mayores, debido probablemente al método diferente usado para la obtención de las NPs. Se ha demostrado que fármacos que presentan una solubilidad en agua dependiente del pH, tal como ofloxacina, presentan mayores porcentajes de encapsulación en NPs obtenidas por emulsión simple solvente-evaporación respecto a doble emulsión solvente-evaporación (Tewes et al. 2007).

La morfología de las nanopartículas se estudió por medio de microscopia electrónica STEM (ver **figura 18**).



**Figura 18. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica STEM para ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG** Condiciones: voltaje de aceleración 30 kV, ampliación 160000 X, modo: STEM.

Como puede observarse en la figura 18, la ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG presenta una morfología relativamente esférica con una distribución de tamaños entre los 200 y 300 nm, similar a la distribución de tamaños obtenida por DLS. La morfología de las NPs de PLGA-mPEG es comparable con la obtenida para otros agentes activos encapsulados en nanopartículas de PLGA (Aryal et al. 2012). STEM no permitió la identificación de la estructura, nanocápsula o nanoesfera, que adopta la ofloxacina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG debido a que no se pudo observar el interior de la nanopartícula para diferenciar la estructura.

#### **4.4 Determinación del efecto antimicrobiano de los antibióticos libres y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG**

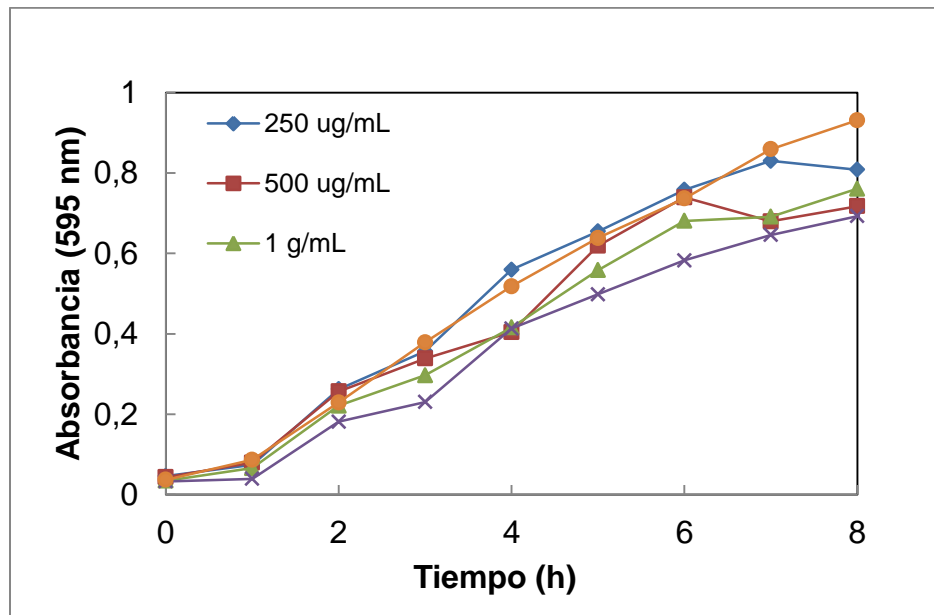
A continuación se presentan las características fisicoquímicas de los compuestos nanoestructurados los cuales fueron evaluados frente a los microorganismos de estudio (**tabla 7**).

**Tabla 7.** Características fisicoquímicas de los compuestos nanoestructurados evaluados frente a SARM y *E. coli* O157:H7

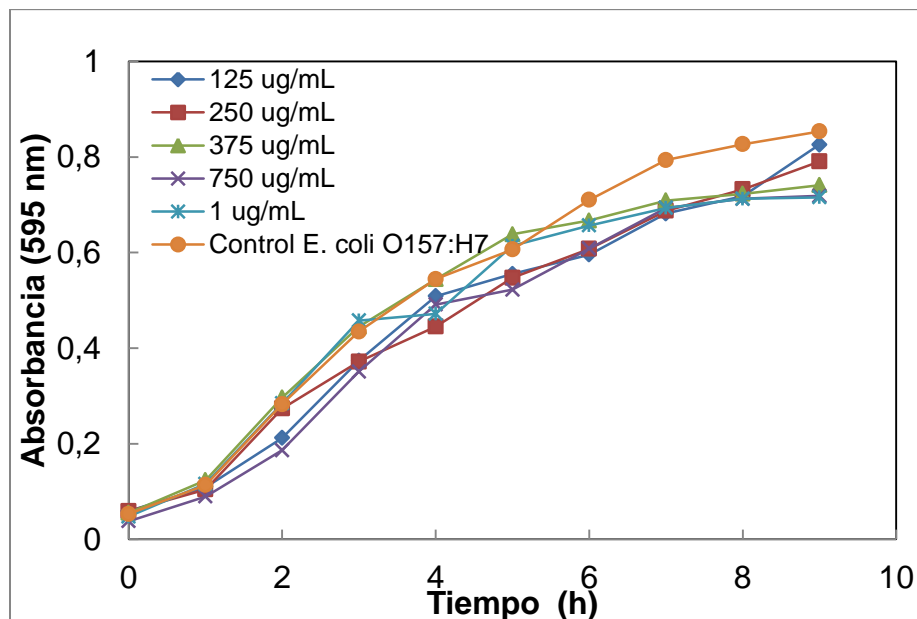
Nanoestructura	Tamaño hidrodinámico ±DS [nm]	Potencial zeta±DS [mV]	%encapsulación
<b>Vancomicina NPs negativas</b>	253±1,7	-6,38±0,48	1,7%
<b>Vancomicina NPs positivas</b>	301±10	+ 9,28±0,51	1,0%
<b>Ofloxacina NPs negativas</b>	249±11	-9,21±0,08	3,70
<b>Ofloxacina NPs positivas</b>	294±25	+ 14,2 ± 0,55	2,95
<b>NPs positivas (en ausencia de fármaco)</b>	290±2,8	+ 2,38 ± 0,04	ND
<b>NPs negativas (en ausencia de fármaco)</b>	261±3,53	-5,41 ± 0,67	ND

\*DS: Desviación estándar para N=3. \*ND: No determinado

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los antibióticos libres y encapsulados frente a las cepas de estudio SARM y *E. coli* O157:H7. Adicionalmente, se determinó el efecto antimicrobiano de las NPs de PLGA-mPEG en ausencia fármaco con cargas positivas (**figuras 19 y 20**) y NPs de PLGA-mPEG en ausencia de cargadas negativamente (**anexos 4 y 5**) en ausencia del fármaco sobre cada uno de los microorganismos, para verificar que el efecto antimicrobiano se atribuye al fármaco y no a las nanoestructuras. Para ello, se tomaron diferentes concentraciones de NPs y se realizó la cinética de crecimiento para cada una de las cepas de estudio.



**Figura 19. Cinética de crecimiento de SARM frente a nanopartículas positivas en ausencia de fármaco.** Condiciones: Incubación 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Muller Hilton, 100  $\mu$ L de cultivo.

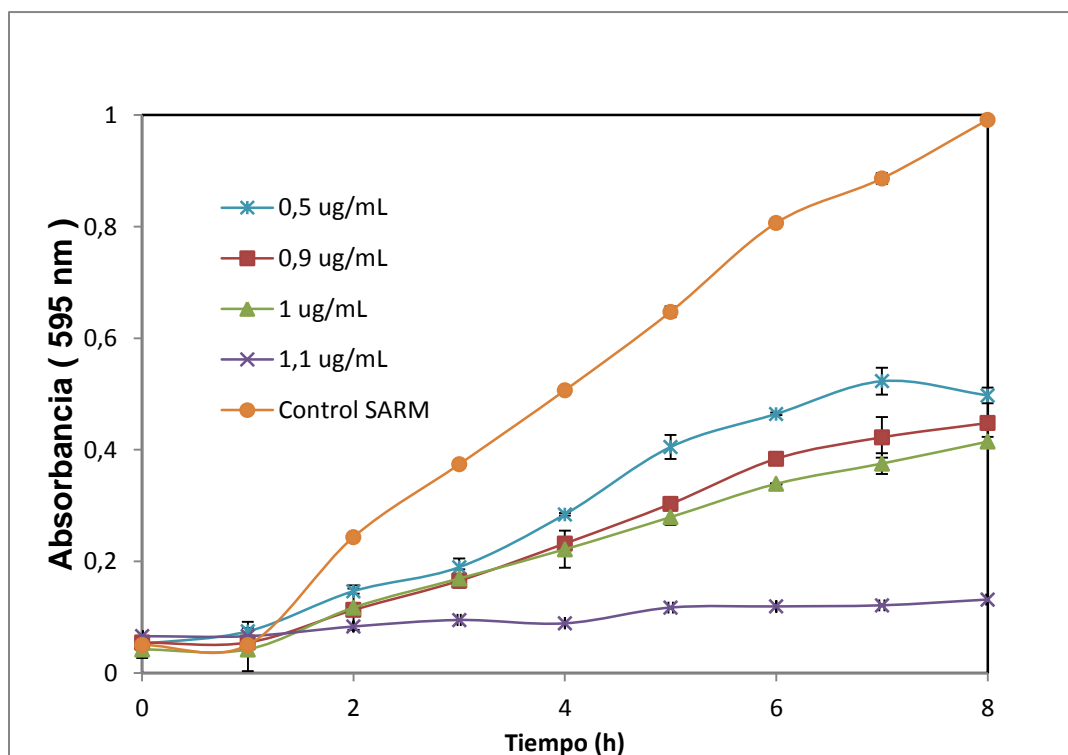


**Figura 20. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a nanopartículas positivas en ausencia de fármaco.** Condiciones: Incubación 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Luria-Bertani, 100  $\mu$ L de cultivo.

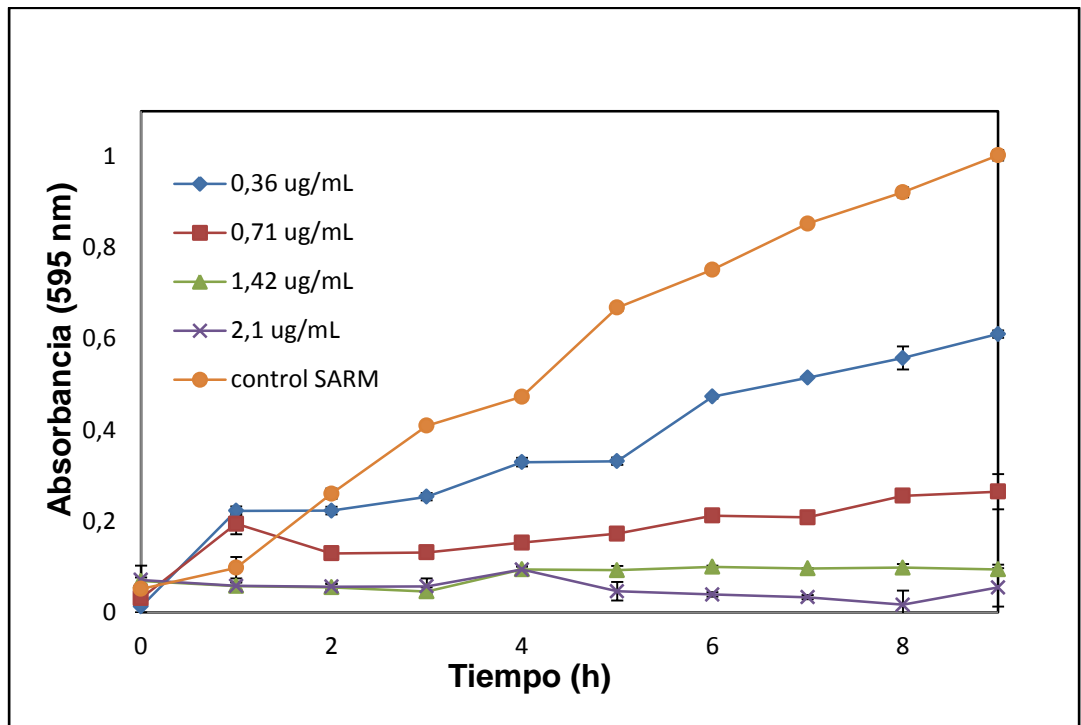
Como se puede observar en la cinética de crecimiento, para cada una de las bacterias expuestas a diferentes volúmenes de nanopartículas en ausencia del fármaco, no se presentó inhibición significativa en el crecimiento de las bacterias. De esta manera, se pudo corroborar que el sistema nanoestructurado en ausencia del fármaco no posee actividad antimicrobiana.

#### 4.4.1.1 Efecto antimicrobiano de vancomicina

Se evaluó la actividad antimicrobiana de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG con carga positiva (**figura 22**) y con carga negativa (**anexo 6**). Los resultados de la actividad antimicrobiana fueron comparados con la actividad antimicrobiana del fármaco libre frente a SARM (**figura 21**).



**Figura 21. Cinética de crecimiento de SARM a diferentes concentraciones de vancomicina libre.** Condiciones: Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100  $\mu$ L de cultivo.



**Figura 22.** Cinética de crecimiento de SARM frente a vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG positivas. Condiciones: Incubación 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100 µL de cultivo

**Tabla 8.** Concentraciones mínimas inhibitorias de vancomicina frente a SARM

Vancomicina	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Libre	0,5 µg/mL	1,1 µg/mL
NPs positivas	~0,51 µg/mL	1,42 µg/mL
Nps negativas	0,42 µg/mL	1,26 µg/mL

Los ensayos de actividad antimicrobiana de vancomicina encapsulada en nanopartículas positivas y negativas mostraron que no hay diferencias significativas en el efecto antimicrobiano respecto a la vancomicina libre (tabla 8). Los resultados obtenidos son comparables y similares al estudio

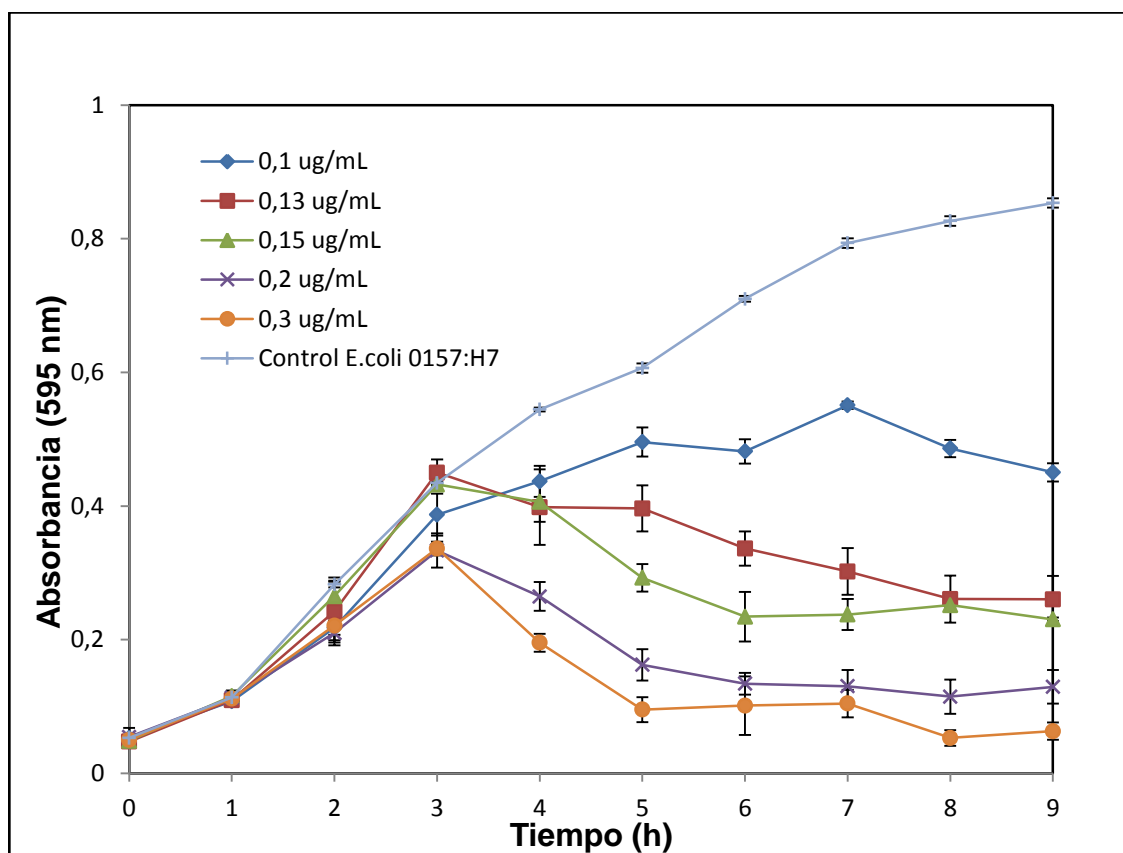
de Radovic y colaboradores (Radovic-Moreno et al. 2012), donde encapsularon vancomicina en NPs de PLGA-mPEG, y Nps de PLGA-PLH-PEG con carga positiva y evaluaron la actividad antimicrobiana frente *S. aureus*. Radovic demostró por medio de microscopia confocal de fluorescencia que las nanopartículas positivas interaccionan con la membrana de la bacteria. Sin embargo, CMI<sub>90</sub> en la vancomicina encapsulada en PLGA-mPEG con carga negativa y PLGA-PLH-PEG con carga positiva no mostró diferencias significativas sobre *S. aureus*; por otra parte la vancomicina encapsulada en NPs PLGA-mPEG y PLGA-PLH-PEG evidenció un aumento de la CMI<sub>90</sub> de con respecto el control de vancomicina libre.

Prasad y colaboradores (Prasad et al. 2012) estudiaron la vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de quitosano-2,2-bis etilendioxi-etilamina folato (CMC-EDBE-FA) y su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* susceptible a vancomicina (VSSA) y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA). Los resultados revelaron que la CMI frente a las dos cepas estudiadas, VSSA y VRSA, disminuyó en un 46,1% y 97,5 %, respectivamente. Estos resultados pueden ser atribuidos a un efecto sinérgico de actividad antimicrobiana entre en el antibiótico y el quitosano, ya que este último ha demostrado tener actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias Gram-positivas y Gram negativas (Huh & Kwon 2011). Además, Prasad y colaboradores (2012) demostraron la rápida liberación de la vancomicina desde las nanopartículas de CMC-EDBE-FA, ya que al cabo de 8 h se ha liberado aproximadamente el 90% del total de antibiótico encapsulado y ésta se estaría produciendo directamente sobre la membrana de la bacteria.

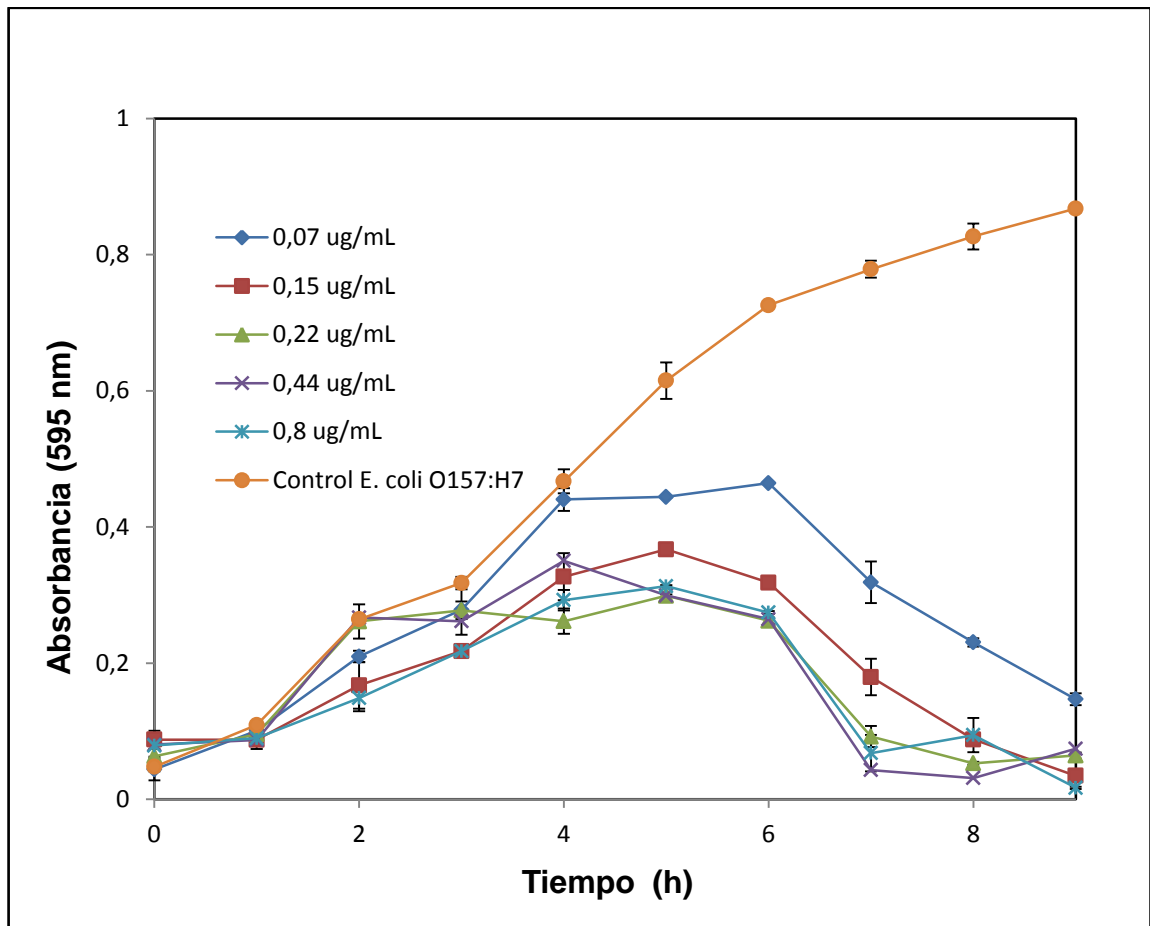
Las concentraciones que mostraron una inhibición CMI  $\geq 50$  % se evaluaron para determinar la concentración mínimas bactericidas. Dentro de las concentraciones evaluadas no se encontró ninguna concentración bactericida, esto confirma que la vancomicina a las concentraciones evaluadas actúa como agente antimicrobiano bacteriostático.

#### 4.4.1.2 Efecto antimicrobiano de Ofloxacina

Se evaluó la actividad antimicrobiana de ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG positivas (**figura 24**) y negativas (**anexo 7**) frente y *E. coli* 157:H7, los resultados fueron comparados con la actividad antimicrobiana de ofloxacina libre (**figura 23**).



**Figura 23. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a ofloxacina libre. Condiciones:** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Luria-Bertani, 100 µL de cultivo



**Figura 24.** Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a ofloxacin encapsulada en NPs de PLGA-mPEG positivas. Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Luria-Bertani, 100 µL de cultivo

**Tabla 9.** Concentraciones mínimas inhibitorias de ofloxacin sobre *E. coli* O157:H7

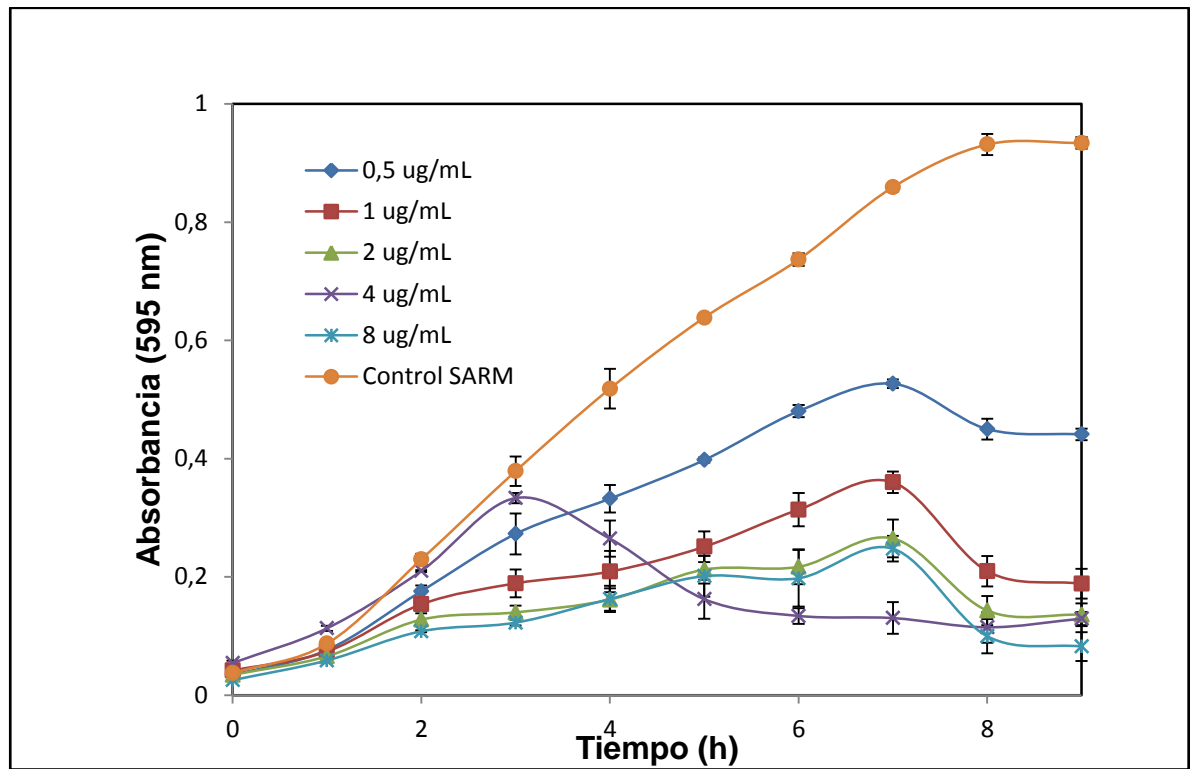
Ofloxacin	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Libre	0.1 µg/mL	0.2 µg/mL
NPs positivas	<0.07 µg/mL	0.15 µg/mL
NPs negativas	<0.09 µg/mL	0.28 µg/mL

Los resultados para los diferentes porcentajes de inhibición de ofloxacin sobre *E. coli* O157:H7 (**tabla 9**) evidenciaron que el antibiótico encapsulado en nanopartículas positivas presentóm mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento con respecto al fármaco libre. Probablemente, la carga positiva de las nanopartículas está mejorando la interacción con la membrana de la bacteria (Dillen et al. 2008; Radovic-moreno et al. 2012). Por otro lado, el antibiótico encapsulado en nanopartículas con carga negativa no mostró diferencias significativas respecto al fármaco libre.

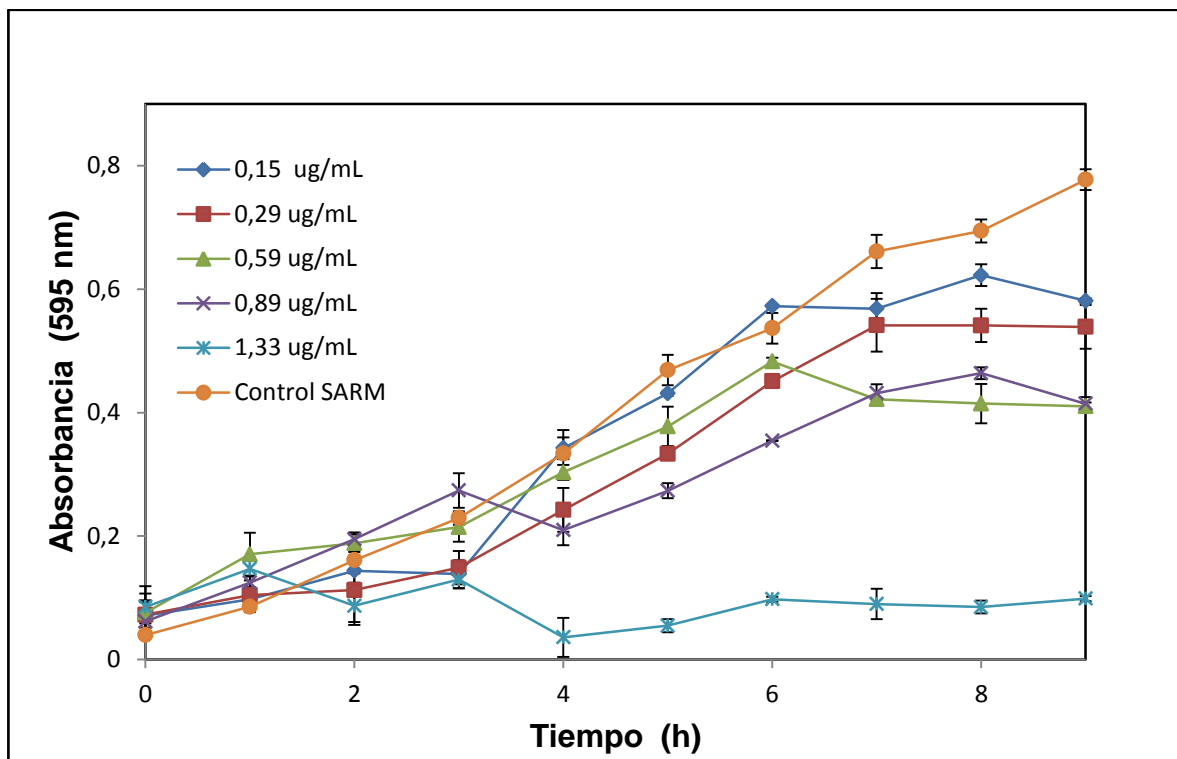
En la literatura, se encuentran pocos estudios de actividad antimicrobiana de ofloxacin encapsulada en nanopartículas poliméricas. Entre ellos se encuentra la investigación de Fresta y colaboradores (1995) donde demostraron que las fluoroquinolonas, entre ellas ofloxacin, encapsuladas en nanopartículas de poliaquil cianoacrilato (PACA) mejoraron la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. Los autores sugieren que el aumento la actividad antimicrobiana puede ser debido a una mejor interacción de la nanopartícula con la parte exterior de la bicapa en la membrana de la bacteria de manera que se facilita la penetración del fármaco (Fresta et al. 1995).

Para los ensayos de CMB fueron evaluadas las concentraciones que presentaron un CMI  $\geq 50\%$ . No obstante, ninguna de las concentraciones presentó actividad bactericida sobre *E. coli* O157:H7, por lo que el efecto de este antimicrobiano a las concentraciones evaluadas se considera bacteriostático.

Por otra parte, también se evaluó la actividad antimicrobiana de ofloxacin encapsulada en NPs de PLGA-mPEG con carga positiva (**figura 26**) y con carga negativa (**anexo 8**) frente a SARM, los resultados obtenidos fueron comparados con la actividad antimicrobiana de ofloxacin libre (**figura 25**)



**Figura 25. Cinética de crecimiento de SARM frente a ofloxacina libre.** Incubación a 37 a °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100 µL de cultivo



**Figura 26.** Cinética de crecimiento de *SARM* frente a ofloxacina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG positivas. Incubación 37 a °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100 µL de cultivo

**Tabla 10.** Concentraciones mínimas bactericidas de ofloxacina a *SARM*

Ofloxacina	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Libre	0,5 µg/mL	2,0 µg/mL
NPs positivas	0,59 µg/mL	1,33 µg/mL
NPs negativas	~0,57 µg/mL	1,13 µg/mL

Las concentraciones mínimas inhibitorias al 50% (CMI<sub>50</sub>) de la ofloxacina encapsulada en nanopartículas poliméricas respecto a ofloxacina libre no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, la actividad antimicrobiana para una inhibición del 90% (CMI<sub>90</sub>) fue mejor en el fármaco encapsulado

respecto al fármaco libre. Por otra parte, no se observaron diferencias entre la actividad antimicrobiana del fármaco encapsulado en nanopartículas positivas y nanopartículas negativas (**tabla 10**). Contrario a lo que se encuentra en la literatura, la carga superficial no mostró un aumento en la actividad antimicrobiana del fármaco encapsulado en las nanopartículas (Radovic-moreno et al. 2012). Por tanto, se requiere de otros estudios para conocer detalladamente la interacción que tiene lugar entre la nanopartícula y la membrana bacteriana.

Se evaluaron las concentraciones con  $\geq$  CMI<sub>50</sub> de ofloxacina libre y encapsulada frente a SARM para determinar la CMB. Ninguna de las concentraciones evaluadas mostró actividad bactericida. Por tanto, se consideran estas concentraciones como bacteriostáticas.

## 5 CONCLUSIONES

- ✓ Se sintetizó el bloque polimérico PLGA-mPEG con una relación monomérica del ácido láctico, ácido glicólico y etilenglicol de 1:0,70:0,21, respectivamente, empleando la metodología de polimerización en masa fundida.
- ✓ Se logró encapsular vancomicina y ofloxacina en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG empleando el método de doble emulsión solvente- evaporación. Los tamaños hidrodinámicos promedio obtenidos para vancomicina y ofloxacina fueron de  $301 \pm 10$  nm y  $295 \pm 25$  nm, respectivamente.
- ✓ El uso de PEI permitió obtener nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG con carga superficial positiva en un mismo paso de síntesis. Las cargas obtenidas para vancomicina y ofloxacina fueron de  $+9,28 \pm 0,5$  mV y  $14,2 \pm 0,5$  mV, respectivamente.
- ✓ La actividad antimicrobiana de vancomicina encapsulada en NPs poliméricas de PLGA-mPEG no presentó diferencias para una  $CMI_{50}$ , sin embargo para una  $CMI_{90}$  hubo pérdida de actividad del 29,1% con respecto a la vancomicina libre frente a *SARM*.
- ✓ La encapsulación de ofloxacina en NPs poliméricas con carga superficial positiva de PLGA-mPEG mejoró  $CMI_{50}$  y  $CMI_{90}$  frente a *E. coli* O157:H7 en un 30% y 25% respectivamente, comparado con ofloxacina libre.
- ✓ La actividad antimicrobiana de ofloxacina encapsulada en NPs poliméricas de PLGA-mPEG frente a *SARM* no presentó diferencias para una  $CMI_{50}$  comparado con ofloxacina libre; sin embargo para un  $CMI_{90}$

presentó un aumento de actividad del antimicrobiana 33,5%, pero no se observaron diferencias entre la carga positiva y negativa de las nanopartículas

## 6 RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios del perfil de liberación de vancomicina y ofloxacina encapsuladas en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG.
- ✓ Estudiar las interacciones de los antibióticos encapsulados en nanopartículas poliméricas con la membrana exterior de la bacteria por medio de espectroscopía de fluorescencia empleando un marcador fluorescente u otra técnica.
- ✓ Evaluar la posible actividad tóxica que puedan presentar las nanoestructuras frente a fibroblastos. Posteriormente, realizar estudios *in vivo* para evaluar el efecto de la encapsulación para cada uno de los antibióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abong'o, B.O. & Momba, M.N.B., 2009. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from meat and meat products sold in Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. *Food Microbiology*, 26(2), pp.173–6.
- Ahmed, N., Fessi, H. & Elaissari, A., 2012. Modified double emulsion process as a new route to prepare submicron biodegradable magnetic / polycaprolactone particles for in vivo theranostics. *Soft Matter*, 8, pp.2554–2564.
- Al-Ghamdi, M.S. et al., 1999. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry workers, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 4(4), pp.278–83.
- Alvarez, C.A. et al., 2010. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *American Journal Of Infection Control*, 38(4), pp.315–8.
- An, M.M. et al., 2013. Linezolid versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: a meta-analysis of randomised controlled trials. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 41(5), pp.426–33.
- Ansari, M. et al., 2011. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Biol Med*, 3(2), pp.141–146.
- Aryal, S. et al., 2012. hydrophobic – hydrophilic drug conjugates †. *Journal of Materials Chemistry*, 22, pp.994–999.
- El Badawy, A.M. et al., 2010. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology*, 44(4), pp.1260–6.
- Van Bambeke, F. et al., 2004. Glycopeptide antibiotics: from conventional molecules to new derivatives. *Drugs*, 64(9), pp.913–36.
- Barichello, J.M., Morishita, M. & Nagai, T., 1999. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), pp.471–476.

- Beletsi, a, Panagi, Z. & Avgoustakis, K., 2005. Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *International journal of pharmaceutics*, 298(1), pp.233–41.
- Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E., 2005. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 24(1), pp.67–75.
- Boussif, O. et al., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp.7297–301. [ov/articlerender.fcgi?artid=41326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract).
- Cabrera, C.E., Gómez, R.F. & Zúñiga, A.E., 2007. Colombia Médica La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación Colombia Médica. *Colombia Médica*, 38, pp.149–158.
- Castillo, J.S. et al., 2012. Mortality among critically ill patients with bacteremia : a multicenter cohort study in Colombia. *Revista Panamericana Salud Publica*, 32(5), pp.343–350.
- Chan, Y.-H. et al., 2012. Antibiotics nonadherence and knowledge in a community with the world's leading prevalence of antibiotics resistance: implications for public health intervention. *American journal of infection control*, 40(2), pp.113–7.
- Cheow, W.S. & Hadinoto, K., 2010. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1-3), pp.79–86.
- Cheow, W.S. & Hadinoto, K., 2011. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid – polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), pp.214–220.
- Ciccione, W.J. et al., 2001. Implants in Orthopaedics : New Developments and Clinical Applications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9, pp.280–288.
- Cohen-sela, E., Chorny, M., et al., 2009. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles.

*Journal of Controlled Release*, 133(2), pp.90–95. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.073>.

- Cohen-sela, E., Teitlboim, S., et al., 2009. Single and Double Emulsion Manufacturing Techniques of an Amphiphilic Drug in PLGA Nanoparticles: Formulations of Mithramycin and Bioactivity. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), pp.1452–1462.
- Cosgrove, S.E. et al., 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1), pp.53–9.
- Da, M. et al., 2012. A one-step process in preparation of cationic nanoparticles with poly ( lactide-co-glycolide ) -containing polyethylenimine gives efficient gene delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), pp.522–529.
- Danhier, F. et al., 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), pp.505–22. Available at:
- Dhar, S. et al., 2008. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), pp.17356–61.
- Dillen, K. et al., 2008. Adhesion of PLGA or Eudragit / PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 349, pp.234–240.
- Faustino, P. & Khan, M. (FDA), 2008. Office of generic drugs vancomycin solubility study division of product quality research office of testing and research. *Center for Drug Evaluation and Research*, pp.2–17.
- Fresta, M. et al., 1995. Pef loxacin Mesilate- and Of loxacin-Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 84(7), pp.895–901.
- Freytag, T. et al., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Colloid and Interface Science*, 69, pp.197–207.

- Giri, T.K. et al., 2013. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), pp.125–41.
- Govender, T. et al., 2000. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 199(1), pp.95–110.
- Guerrero, R., 2008. Índice general. , pp.13–17.
- Hachicha, W., Kodjikian, L. & Fessi, H., 2006. Preparation of vancomycin microparticles : Importance of preparation parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, pp.176–184.
- Hans, M.L. & Lowman, A.M., 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(September), pp.319–327.
- Hoo, C. et al., 2008. A comparison of atomic force microscopy ( AFM ) and dynamic light scattering ( DLS ) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, pp.89–96.
- Huh, A.J. & Kwon, Y.J., 2011. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release : Official Journal Of The Controlled Release Society*, 156(2), pp.128–45.
- Hunter, a C., 2006. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), pp.1523–31.
- Kam, K.M. et al., 2006. Stepwise decrease in moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: correlation with ofloxacin susceptibility. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 12(1), pp.7–11.
- Karavelidis, V. et al., 2010. Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 41(5), pp.636–43.
- Keegan, M.E. et al., 2004. Biodegradable Microspheres with Enhanced Capacity for Covalently Bound Surface Ligands. *Macromolecules*, 14, pp.9779–9784.

- Kim, M.S. et al., 2005. Sustained release of bovine serum albumin using implantable wafers prepared by MPEG-PLGA diblock copolymers. *International journal of pharmaceutics*, 304(1-2), pp.165–77.
- Kowalski, R.P. et al., 2003. Gatifloxacin and moxifloxacin: an in vitro susceptibility comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. *American Journal of Ophthalmology*, 136(3), pp.500–505..
- Kullar, R. et al., 2011. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(8), pp.975–81.
- Kumari, A., Yadav, S.K. & Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), pp.1–18.
- Lasprilla, A.J.R. et al., 2012. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances*, 30(1), pp.321–328.
- Leroy, O., 1991. Ofloxacin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1, pp.57–74.
- Li, Y.-P. et al., 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release*, 71(2), pp.203–211.
- Liu, R. et al., 2005. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 45(3-4), pp.144–53.
- Loveymi, B.D. et al., 2012. Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(1), pp.43–56.
- Machuca, M.A., Sosa, L.M. & González, C.I., 2013. Molecular typing and virulence characteristic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Bucaramanga, Colombia. *PloS one*, 8(8), p.e73434.
- María, J. et al., 2008. Correspondencia José María Sánchez Merino Rúa da Zanfona , 3 San Pedro de Nos-Oleiros 15176 A Coruña . ( España ). , 7, pp.776–780.

- Mattheolabakis, G. et al., 2009. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics* : V, 71(2), pp.190–5.
- McGee, L., Goldsmith, C.E. & Klugman, K.P., 2002. Fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* belonging to international multiresistant clones. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), pp.173–6.
- Moghimi, S.M. & Hunter, A.C., 2000. engineering and experimental medicine. *Reviews*, 18(October), pp.2958–2964.
- Murugesan, S. et al., 2007. PEGylated Poly(Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticulate Delivery of Docetaxel: Synthesis of Diblock Copolymers, Optimization of Preparation Variables on Formulation Characteristics and <I>In Vitro</I> Release Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(1), pp.52–60.
- Nayak, A.K., Das, B. & Maji, R., 2013. Gastroretentive hydrodynamically balanced systems of ofloxacin: In vitro evaluation. *Saudi Pharmaceutical Journal* , 21(1), pp.113–7.
- Nokhodchi, A., Ghafourian, T. & Mohammadi, G., 2012. Nanotechnology Tools for Efficient Antibacterial Delivery to Salmonella. In *A diversified superbug*. pp. 139–168.
- Olarte, N. & Valderrama, I., 2010. Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: caracterización fenotípica y molecular. *Revista del Instituto*, 182, pp.353–361.
- Ozalp, Y. et al., 2001. Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules. *Journal of microencapsulation*, 18(1), pp.89–110.
- Paredes, D., 2011. *Estudio del efecto antibacteriano de nanoparticulas de plata sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. Universidad Industrial de Santander.
- Park, H. et al., 2005. A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 41(August), pp.188–196.
- Pérez, N., Pavas, N. & Rodríguez, E.I., 2011. Resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* con beta-lactamasas de espectro extendido en un hospital de la Orinoquia colombiana Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* with

- extended spectrum beta - lactamase in a hospital at the Colombian Orin. , 15(5786), pp.147–154.
- Pino, J., 2008. “*Estudio nanométrico de biocompatibilidad y adhesividad celular a biomateriales utilizados en cirugía ortopédica.*” Universidad de Santiado de Compostela.
- Prasad, S. et al., 2012. In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), pp.659–676.
- Radovic-moreno, A.F. et al., 2012. Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall- Targeted Delivery of Antibiotics. *America Chemical Society Nanotechnology*, 6(5), pp.4279–4287.
- Rahal, E. a et al., 2012. *Escherichia coli* O157:H7-Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 2(November), p.138.
- Rahman, Z. et al., 2010. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett – Burman design. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1-2), pp.186–194.
- Ravi Kumar, M.N.V., Bakowsky, U. & Lehr, C.M., 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), pp.1771–1777.
- Reynolds, P.E., 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 8(11), pp.943–50.
- Rezvani Amin, Z. et al., 2013. The effect of cationic charge density change on transfection efficiency of polyethylenimine. *Iranian Journal Of Basic Medical Sciences*, 16(2), pp.150–6..
- Rosca, I.D., Watari, F. & Uo, M., 2004. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal Of Controlled Release : official journal of the Controlled Release Society*, 99(2), pp.271–80.
- Ross, L. & Riley, M., 1990. Aqueous solubilities of some variously quinolone antimicrobials substituted. *International Journal Of Pharmaceutics*, 63, pp.237–250.

- Sakore, S., Choudhari, S. & Chakraborty, B., 2010. BIOWAIVER MONOGRAPH FOR IMMEDIATE RELEASE SOLID ORAL DOSAGE FORMS : OFLOXACIN. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, pp.156–161.
- Santander, M. et al., 2006. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles : A variety of stabilisation mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302, pp.522–529.
- Sato, K. et al., 1986. Antibacterial activity of ofloxacin and its mode of action. *Infection*, 14 Suppl 4, pp.S226–30.
- Sato, K. et al., 1982. In Vitro and In Vivo Activity of DL-8280 , a New Oxazine Derivative. *American Society for Microbiology*, 22(4), pp.548–553.
- Schaffazick, S.R. & Pohlmann, A.R., 2002. Caracteriza çã o e Estudo de Estabilidade de Suspens õ es de Nanoc á psulas e de Nanoesferas Polim é ricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2), pp.99–106.
- Schroeder, C.M. et al., 2002. Antimicrobial Resistance of Escherichia coli O157 Isolated from Humans , Cattle , Swine , and Food Antimicrobial Resistance of Escherichia coli O157 Isolated from Humans , Cattle , Swine , and Food.
- Senthilkumar, M., Mishra, P. & Jain, N.K., 2008. Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *Journal Of Drug Targeting*, 16(5), pp.424–35.
- Shit, S. & Maiti, S., 1986. Application of nmr spectroscopy in molecular weight determination of polymers. *European Polymer Journal*, 22(12), pp.1001–1008.
- Sigma-Aldrich, 2014a. Poly(ethyleneimine) solution. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/p3143?lang=en&region=CO>.
- Sigma-Aldrich, 2014b. Vancomycin hydrochloride hydrate. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/861987?lang=en&region=CO>.
- Skoog, D., Holler, J. & Nieman, T., 2001. *Principios de Análisis Instrumental* 5ta ed. M. Hill, ed.,
- Smith, B. a., Fazil, A. & Lammerding, A.M., 2013. A risk assessment model for Escherichia coli O157:H7 in ground beef and beef cuts in Canada: Evaluating the effects of interventions. *Food Control*, 29(2), pp.364–381.

- Tarai, B., Das, P. & Kumar, D., 2013. Recurrent Challenges for Clinicians: Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin Resistance, and Current Treatment Options. *Journal Of Laboratory Physicians*, 5(2), pp.71–78.
- Tewes, F. et al., 2007. Comparative study of doxorubicin-loaded poly ( lactide-co-glycolide ) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, 66, pp.488–492.
- The Center for Food Security & public Health, 2011. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. , pp.1–14.
- Vandervoort, J. & Ludwig, a, 2004. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics : V*, 57(2), pp.251–61.
- Wang, M. & Thanou, M., 2010. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(2), pp.90–9.
- Wilson, W.W. et al., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge. *Journal of Microbiological Methods*, 43, pp.153–164.
- Yadav, K. et al., 2010. Long Circulating Nanoparticles of Etoposide Using PLGA-MPEG and PLGA-Pluronic Block Copolymers: Characterization, Drug-Release, Blood-Clearance, and Biodistribution Studies. *Drug*, 239(November 2009), pp.228–239.
- Yoshida, H. et al., 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 37(4), pp.839–45.
- Zakeri-milani, P. et al., 2013. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, pp.174–181.
- Zambrano Herrera, C., 2011. *Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio pichichí s.a.* Universidad Tecnológica de Pereira.
- Zukoski, C.F. & Saville, D.A., 1986. The Interpretation of Electrokinetic Measurements Using a Dynamic Model of the Stern Layer I . The Dynamic Model. *Journal of Colloid and Interface Science*, 114(1), pp.32–45.

Zurita, J., Mejía, C. & Guzmán-Blanco, M., 2010. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 14 Suppl 2, pp.S97–106.

Zweers, M.L.T. et al., 2006. Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal Of Controlled Release*. 114(3), pp.317–24.

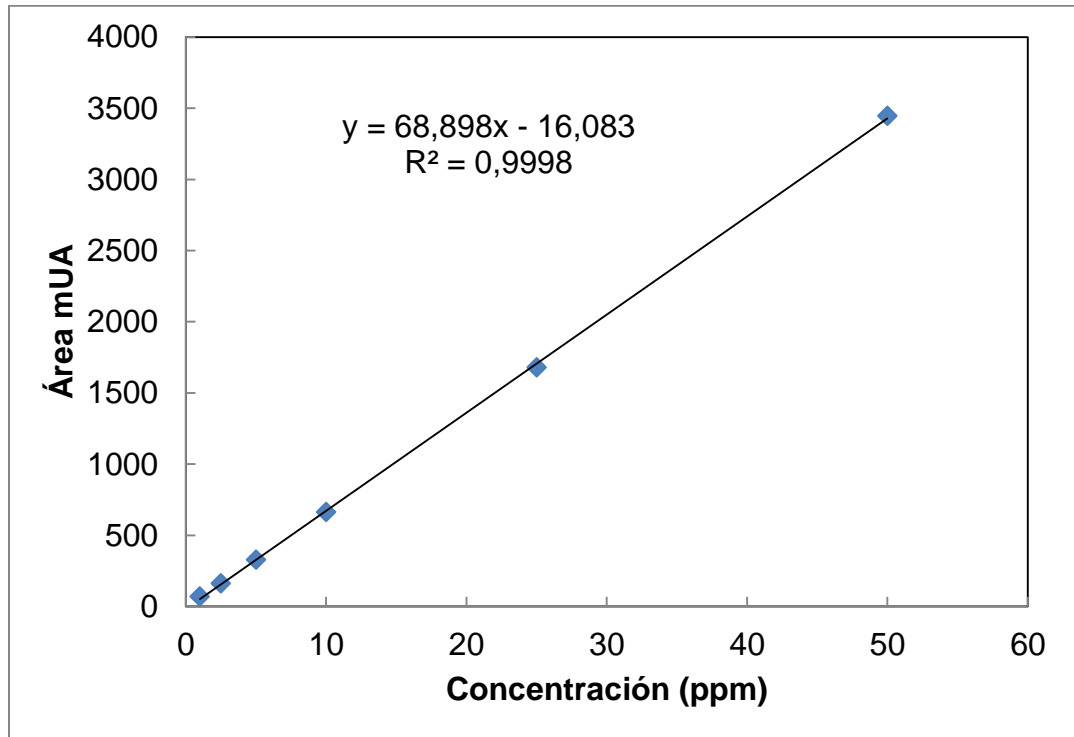
## ANEXOS

### ANEXO A. Análisis estadístico t-student

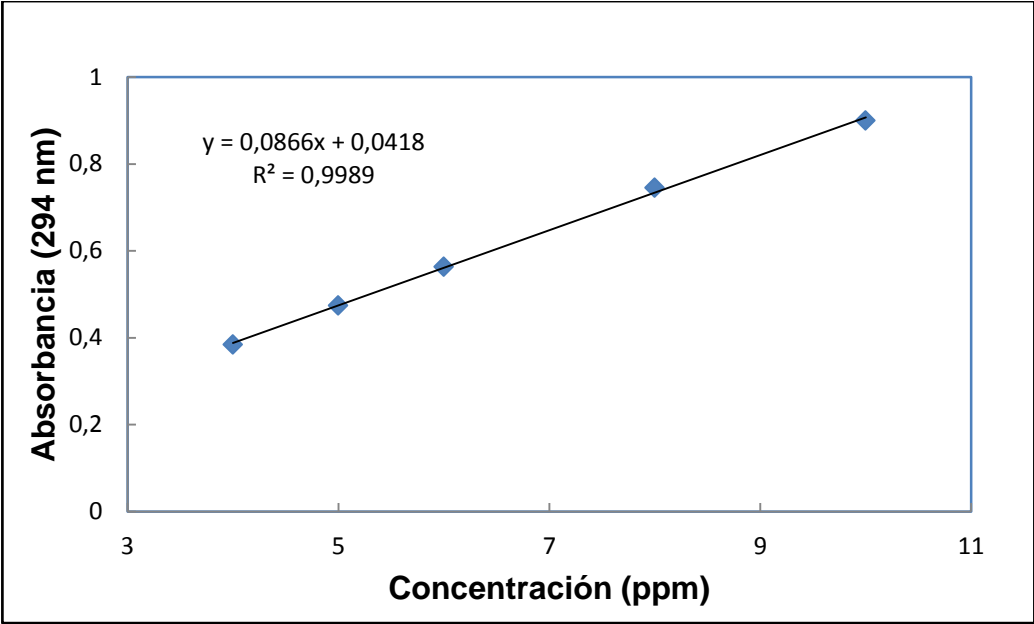
Variable	t-student
[Polímero]	0,905
[PVA]	0,065
[w:o:w]	-0,108
[PEI]	-0,892
velocidad	0,962
Polímero:fármaco	0,123
Gelatina	-0,956

%	70	75	80	90	95	97,5	99	99,5	99,75	99,9	99,95
t-student	0,568	0,740	0,941	1,533	2,131	2,776	3,746	4,604	5,597	7,173	8,610

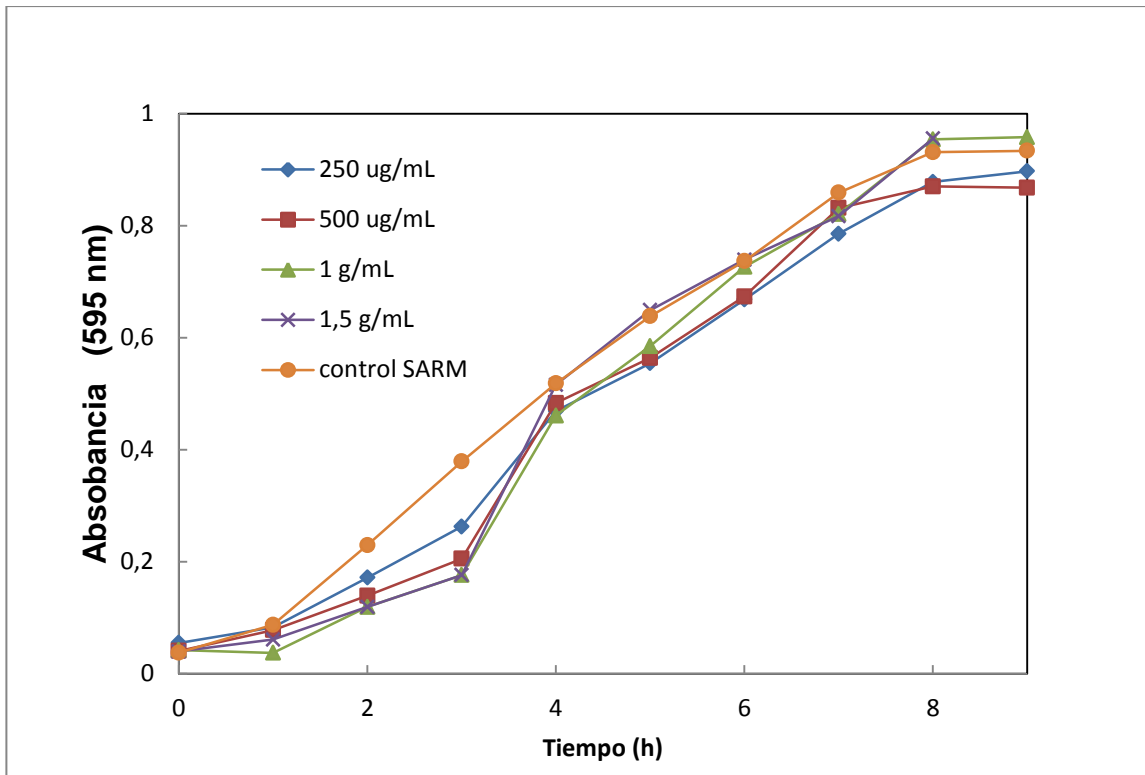
**ANEXO B. Curva de calibración HPLC para cuantificación de vancomicina**



**ANEXO C. Curva de calibración UV-VIS para cuantificación de ofloxacinaa 294 nm.**

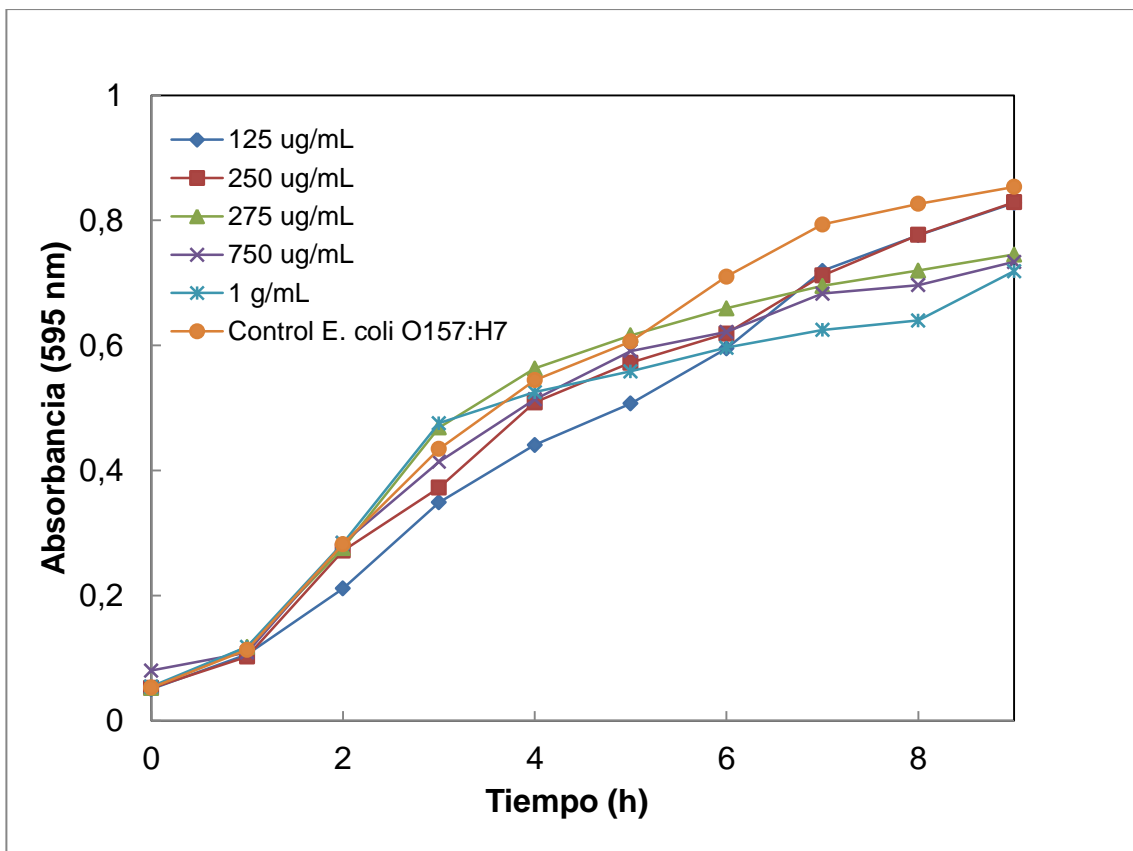


**ANEXO D. Cinética de crecimiento de SARM frente a nanopartículas negativas de PLGA-mPEG en ausencia de fármaco**



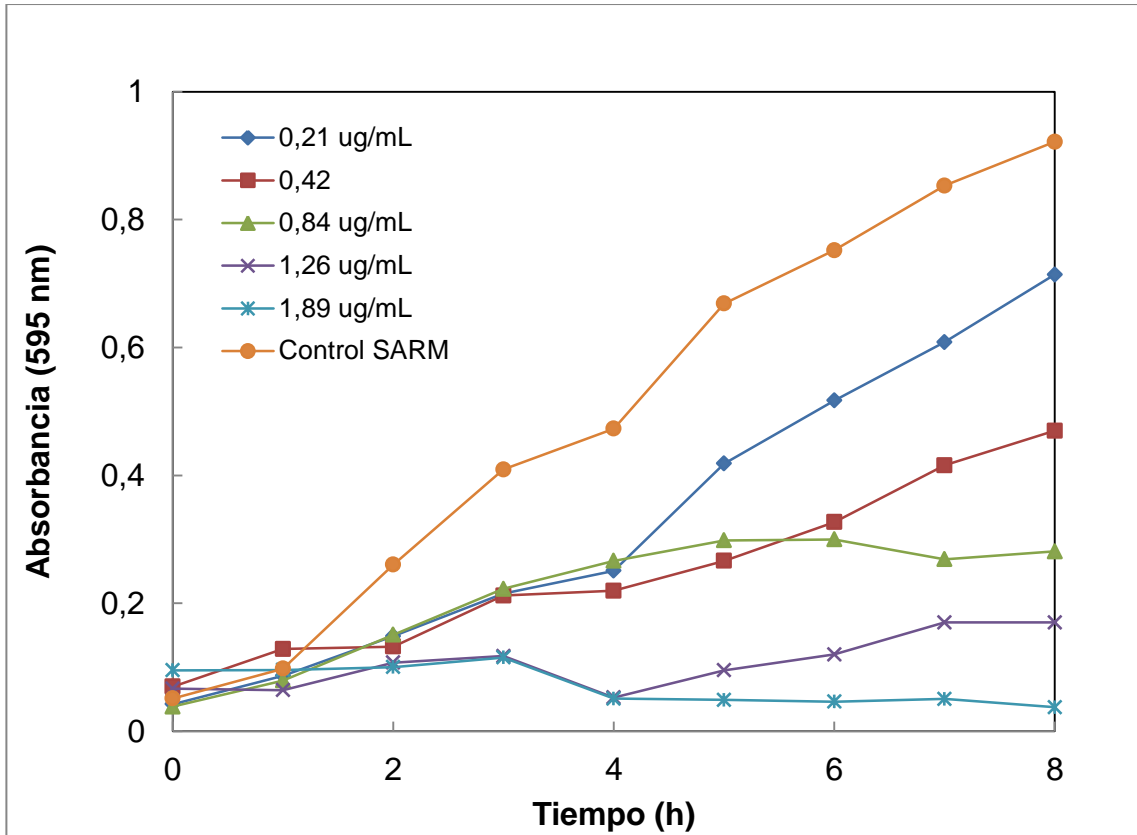
**Cinética de crecimiento de SARM frente a NPs de PLGA-mPEG negativas en ausencia de fármaco.** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100  $\mu$ L de cultivo

**ANEXO E. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a nanopartículas negativas de PLGA-mPEG en ausencia de fármaco**



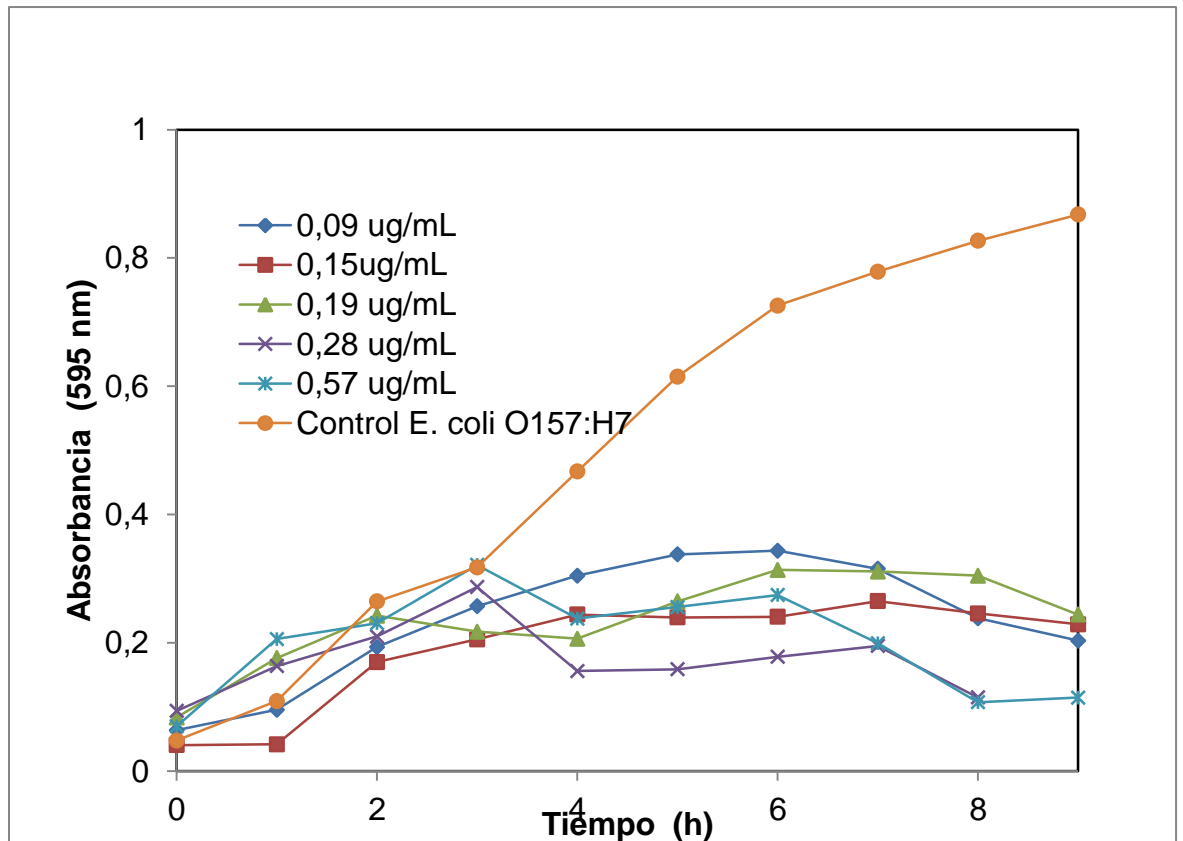
**Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a NPs de PLGA-mPEG negativas en ausencia de fármaco.** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Luria-Bertani, 100 µL de cultivo

**ANEXO F. Cinética de crecimiento de SARM frente a vancomicina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG**



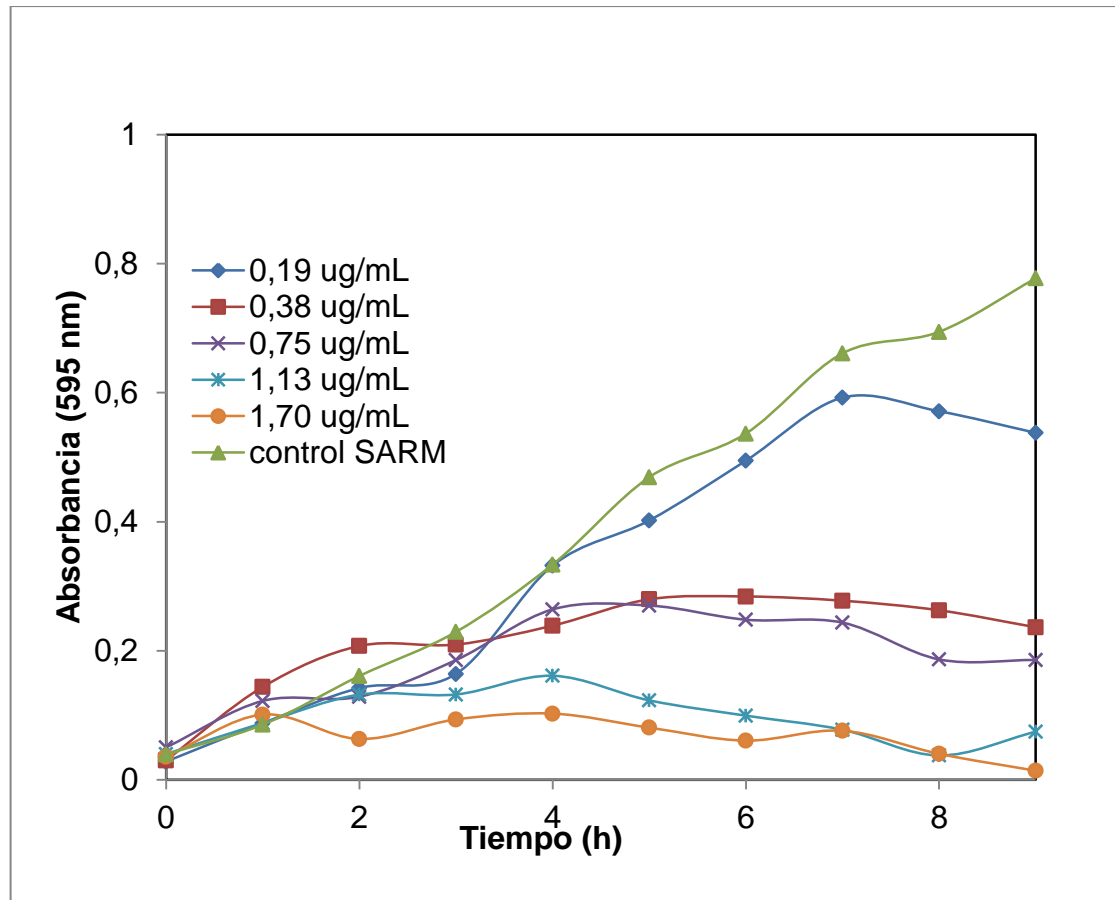
**Cinética de crecimiento de SARM frente a vancomicina encapsula NPs de PLGA-mPEG negativas.** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100 µL de cultivo

**ANEXO G. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a ofloxacina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG**



**Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 frente a ofloxacina encapsulada NPs de PLGA-mPEG negativas.** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Luria-Bertani, 100 µL de cultivo

**ANEXO H. Cinética de crecimiento de SARM frente a ofloxacina encapsulada nanopartículas negativas de PLGA-mPEG**



**Cinética de crecimiento de SARM frente a ofloxacina encapsula NPs de PLGA-mPEG negativas.** Incubación a 37 °C a 200 rpm, medio de cultivo Mueller-Hilton, 100  $\mu$ L de cultivo