

“DESARROLLO DE SISTEMAS
PORTADORES PARA REDUCIR LAS
LIMITACIONES DE LA TERAPÉUTICA
ANTIMICROBIANA DISPONIBLE”



Farm. Melisa Belén Corti

-2020-

Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas - Unidad
de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (FCQ - UNITEFA)

Universidad Nacional de Córdoba - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas
y Técnicas (UNC - CONICET)

“DESARROLLO DE SISTEMAS PORTADORES PARA REDUCIR LAS LIMITACIONES DE LA TERAPÉUTICA ANTIMICROBIANA DISPONIBLE”

Trabajo de Tesis para acceder al grado de
Doctor en Ciencias Químicas de
Farm. Melisa Belén Corti

Directora

Prof. Dra. Fabiana del Lujan Alovero

Comisión Evaluadora

Prof. Dr. José Luis Bocco

Prof. Dr. Santiago Palma

Prof. Dra. Marisa Martinelli

Prof. Dr. Dante Beltramo (Evaluador externo)
CEPROCOR (Centro de excelencia en productos y procesos de Córdoba), MINCYT
(Ministerio de Ciencia y Tecnología Córdoba)

A mis padres con amor...

“Vivir la vida y aceptar el reto, recuperar la risa, ensayar el canto, bajar la guardia y extender las manos, desplegar las alas e intentar de nuevo, celebrar la vida y retomar los cielos”

Mario Benedetti

Quiero agradecer de corazón a todas las personas que me acompañaron en este largo camino, que no sólo forma parte de un logro académico, sino también de crecimiento a nivel personal y emocional.

A mi directora, Fabi, gracias por confiar en mí y por ayudarme a crecer profesionalmente.

A los miembros de mi comisión asesora de tesis, los Dres. José L. Bocco, Santiago Palma y Marisa Martinelli, gracias por sus valiosos aportes durante estos años y por aceptar formar parte de la misma.

Al Dr. Dante Beltramo, gracias por haber aceptado ser evaluador externo de esta tesis doctoral.

A la Dra. Marisa Martinelli por ayudarme con Espectroscopía Infrarroja, por su dedicación y paciencia... Gracias Doctora!!!!

A las instituciones que financiaron esta tesis doctoral: FONCyT y CONICET.

Al departamento de Ciencias Farmacéuticas de la FCQ-UNC, y a UNITEFA-CONICET por brindarme el espacio físico para realizar esta tesis doctoral.

A la Facultad de Ciencias Químicas, quién ha sido mi segunda casa durante doce años de estudio y de excelencia académica.

A las instituciones que facilitaron los medios económicos para llevarla a cabo: CONICET, SECyT y FONCyT.

A los profesores de UNITEFA, en especial a los del laboratorio 210, 209 y 114, Dres. Manzo, Mini, Álvaro, Daniel, Dani y Santi, gracias por todos sus valiosos aportes y por su ayuda desinteresada.

En especial quiero agradecer al Dr. Daniel Allemandi por haber estado cuando más lo necesite, por haberse puesto la sotana como usted dice... Gracias Doc.

A la Dra. Lilian Canavoso, muchas gracias Lilian por tu ayuda y tu buena predisposición en este último tiempo.

A las secres más lindas, Fer, Laurita y Cari... Gracias por toda la buena onda de siempre... Las quiero mucho!!!

Al laboratorio de la Dra. Andrea Smania del Departamento de Química Biológica Ranwell Caputto, en especial a Tone Colque, gracias por tu ayuda y predisposición para trabajar.

A la Dra. Marcela Longhi y a mi compañera y amiga Dra. Vane, gracias por aceptar hacer colaboración con los ensayos de estabilidad. Vane, gracias por tu ayuda y tu buena onda para trabajar siempre... Por tantos memes en las esperas de HPLC...Mi amiga memera ☺ más mejor...Te quiero

A mis compañeros del labo: Guzmi, Flora, Carito L., Lili, Carola, Norma, Cele, Fran, Yani, Solcito, Lu, Anita, Sofi M., Bessonita, Lauri, Coty, Nani, Lina, Nati, Nahue, Alan, Sofi B., Ale, Eugi, Nacho, Juampi, Eze, Tamy y Hamou. A aquellos que ya no están en el labo, pero sin dudas que sin ellos nada habría sido igual: Gringuis, Verito Romero, Fran Batti, Boierito, Gabi, Quinito, Ramita y Eze Quiroga. Gracias por lo que hemos compartido juntos.

A mis amigas con las que caminamos juntas este largo camino, Flora, Juli (como te extraño), Vane, Romi, Carito y Tali (Lina)... Gracias por tantos momentos compartidos, mates, cenas, juntadas y por estar cuando más las necesite... Mi Julita linda, la persona que me trajo hasta acá, gracias por esta amistad y tantos años compartidos!!! Tali, gracias por estar con la palabra justa, por ayudarme a poner los límites cuando lo necesite, y por hacerme ver que eso está bien (te adoro amiga). Gracias por su linda amistad las quiero muchísimo.

A mis compas más mejores del 214, Lulu y Anita... Gracias por todo el aguante, ayuda, escucha, et, etc... Gracias por su ayuda desinteresada y su apoyo incondicional siempre... Trabajar con ustedes es muy lindo...Las quiero un montón

A mis amigas jóvenes: Carito, Eugi, Sofi y Calo que aparecieron en un momento muy duro de mi vida, y se convirtieron en hermosas amigas. Gracias por tantas risas, llantos, cervezas, salidas, vacaciones (Sofi B, el viaje que tanto anhelamos, gracias por tu compañía cuando más lo necesitaba), y por sobre todo por sentirme más joven al lado de ustedes... Eugi hermosa, gracias por tu dulzura, por estar siempre, por tus palabras de aliento... Calo, gracias por estar pendiente cuando estaba triste con un chocolate, un mensajito, o de lo forma que fuera... Gracias a las 4 las adoro...

Quiero agradecer a Lulu, mi hermana académica, esa persona de fierro que está al pie del cañon siempre... Gracias por estar ahí, por trabajar juntas, por entendernos y aceptarnos tal cual somos... Por hemoderivar 3 años, y todo lo que eso trajo... Sin duda más unión y amistad... Gracias

por tu buena predisposición siempre para trabajar... Por confiar en mí y prestar ese oído para hablar de lo que sea... Por tantos Mac compartidos... ¡Esta tesis también es tuya!!! Gracias por tanto amiga te adoro ♡

Ani querida, Apas, gracias por tu ayuda, por estar conmigo siempre... Y por ser una hermosa compañera de docencia... Te quiero mucho ☺

Gracias a mi amiga la Dra. Flora por ser mi amiga que lo sabe todo, y cuando digo todo es todo jajaja... Por toda tu ayuda infinita a lo largo de este camino, por estar horas y horas conmigo ayudándome con la tesis y el “diseño” obvio jaja... Cada parte de mi tesis tiene un pedacito tuyo... Gracias amiga...Te adoro ♡

A mi Geme, mi hermanita del corazón, a vos Bessonita, no puedo dejar de agradecerte por cada momento que compartimos juntas, por estar ahí siempre conmigo personalmente, con un mensaje, o como sea... Por prestarme tu oído y nunca juzgarme... Sabes que te adoro y que estaré siempre con vos para lo que necesites ♡...

A mis “madres/amigas académicas” Naty, Lauri Guz, Dani Quinteros, Gringui (Marina) y Carito Boiero, gracias por ayudarme siempre a estar de pie frente a todas las adversidades, por aconsejarme y estar en cada momento de la tesis... También por los lindos momentos que compartí con cada una extra lab... Sin dudas, una hermosa amistad...Las adoro ♡

Y también no quiero dejar de agradecer a mis amigos Malu (Fran) y Rama... Gracias por estar siempre y por hacerme sonreír esos días en los que estaba triste... Los quiero mucho!!!

A Solcito Magi que nos conocimos casi al final de la tesis y sin embargo hemos compartido hermosos momentos, me hiciste volver al gym y me abriste las puertas de tu casa y de tu corazón para compartir la vida y la amistad ♡... Te quiero

Quiero agradecer a esas personas del Departamento de Ciencias Farmacéuticas que han estado apoyándome en distintos momentos de la tesis: Diame, Octi, Dani Santi, Jesi Dimmer, Gabi Ortega, Mica Ponce, Agus Bon., Sole Bueno, Sole Gualdesi, Jime, Cinthia y Dra. Ortiz. Gracias a todos!!!!

¡A mis amigas facultativas, Naty, Ro C., Ro F., Aye, Vicky y Sofi, gracias por bancarme y estar siempre en cada momento desde el inicio de esta aventura en la facu hasta ahora, cada una con sus proyectos, pero siempre juntas...Las quiero un montón!!!

A mis amigos del colegio y de la vida, por acompañarme en todas mis locuras, gracias por estar siempre, sin ustedes nada de esto sería igual: Maru, Belu, Johe, Maura y Arman. Los adoro amigos turris!!!

En especial, quiero agradecerte de nuevo amiga y hermana del corazón, Maru, quién es mi amiga desde chiquitas, y hemos caminando juntas toda nuestra vida... Gracias por tanto amiga!!! Te adoro ♡

A mi amiga con quien compartimos el camino de la Fe y una amistad hermosa, Angie, y me dio uno de los regalos más hermosos de mi vida: mi ahijada Juli... Gracias por la vida compartida, por estar siempre apoyándome en todo... Te adoro ♡

A los amigos y amigas que me regalo la vida: Ro. M, Mari Baima, Franco, Guille, Pablo, Vicki Pesci, Aye, Juli, Cin Fuentes, Susana, Anita, Tefita, Lu Rinaudo, Pauli, Mari Bordi... Gracias por su apoyo y por los lindos momentos compartidos... Los quiero mucho ♡

A las amigas que me regalo la Danza árabe: Gime, Belu del Pino, Flor Moré, Ivi, Flor Silva (My best designer), Mela, Mara (Aisha Mar), y a mis Bellysimas con quiénes compartí tantas horas de ensayo, juntadas, risas y llantos... Las quiero muchísimo ♡

A esa personita especial, mi hermana menor Agus Alasino... Gracias por confiar en mí y quererme tanto... Te adoro hermosa ♡

A esos profes referentes de mi vida que estuvieron en la etapa del secundario y me guiaron en el camino de la vida y en mi profesión: Alicia, Gabi Peña, Silvia, Hermana Maria Cristina y Sonia... Gracias por confiar en mí, por empujarme siempre y ayudarme en los momentos que las necesite... Las quiero mucho!!

A mí tía Roxana, quiero agradecerte loca por estar siempre, por aguantar cada locura mía y aconsejarme... Te amo tía ♡

A mis primos, Franco, Nico, Gastón, Mili, Maga y Lauti... Los quiero mucho!!!!

A mis tíos y primos Corti, que son un montón... Los quiero mucho a todos!!!

A mi tía Magui que siempre está apoyándome en todo... Te amo tía ♡

A mi tía Gra, gracias querida Grace por todos los momentos compartidos, por darme consejos siempre, escucharme, y enseñarme a valorar lo bella que es la vida... Te quiero muchísimo ♡

En especial a mis primos Ceci, Tano y Silvita con quiénes compartí mi vida más cercana... Gracias por estar siempre... Los quiero mucho!!!!

A mis madrinas Pri y Clau, gracias por estar acompañándome en cada momento de mi vida... Las amo ♡

A mi tía del corazón, Adri, gracias por estar siempre en cada momento de mi vida siempre apoyándome en todo... Te adoro Adri ♡

A mis abuelos, Marta y Oscar, dos pilares fundamentales de mi vida... Abuelo, te extraño mucho, gracias por ser como un padre para mí, por guiarme, por regalarme tu música, y por amarme tanto... A mi abuela Marta, por criarme, por estar conmigo desde el primer momento, por seguir aguantándome hasta ahora, y por mimarme, aunque yo reniegue ... Los amo profundamente ♡

A mi nona Yolanda, mi nono Juan y mi tía abuela Pelada (te extraño mucho). Los amo mucho, esta tesis es de ustedes también... Gracias por todo lo que hicieron por mí ♡

A mis hermanos, Mati y Cristian, por quiénes daría la vida... Fue lo más lindo de mi vida dejar de ser hija única y que lleguen ustedes los mellizos... Los amo con mi vida entera ♡

A mis sobrinos, Benja y Loli... Esos seres que llenan de luz mi vida, y que son capaces de hacerme sonreír aún en los días más tristes... Ustedes son mi motor y mi fuerza... Gracias por existir... Los ama con todo su corazón la tía Meli

A mi ahijada Juli, fue una bendición muy grande para mí, el día que me enteré que iba a ser tu madrina... Juli te amo, gracias por dejarme verte crecer y caminar con vos... Estaré siempre para guiarte y acompañarte a lo largo de tu vida... Te amo con todo mi corazón princesa ♡

A mi ahijada Coty, tu elección de ser tu madrina de confirmación sin duda fue un hermoso regalo, y a pesar de que no nos veamos seguido, siempre recuerdo con mucho cariño el camino de Fé compartido... Te quiero mucho ☺ !!!!

A mis papás gracias por dar todo por nosotros, por enseñarnos el valor del respeto y el trabajo... Mami, gracias por ser esa persona incondicional para mí, por enseñarme la importancia del estudio, todo lo que hoy tengo... Gracias por estar juntas siempre... Por cuidarme, estar pendiente de mí, por apoyarme en todo, por amarme y por ser la mejor madre y amiga de todas... Te amo mucho Mami.... Papi, gracias por confiar en mí y por apoyarme en mis elecciones... Por enseñarme a ser honesta ante todo y por valorar todo lo que hice... Gracias por ser el mejor padre de todos... Te amo mucho Pa... Esta tesis es de ustedes ♡

Resumen

El presente trabajo de Tesis aborda el desarrollo y evaluación de sistemas portadores de fármacos antimicrobianos, utilizando una plataforma tecnológica en nuestro grupo de investigación que se basa en la utilización de polielectrolitos (polímeros ionizables) que vehiculizan fármacos de carga opuesta. Utilizamos un polímero catiónico, Eudragit E100 (EuE) y dos fármacos, vancomicina (VAN) y ciprofloxacino (CIP). Se diseñaron y prepararon los sistemas y se obtuvieron dispersiones acuosas (EuE-VAN y EuE-CIP). Se evaluaron propiedades físico químicas de interés biofarmacéutico para su potencial utilización en formulaciones de uso oftálmico. Se estudió la influencia de EuE en la eficacia antibacteriana *in vitro* de los fármacos vehiculizados. Los sistemas en desarrollo exhiben potenciación de la acción de VAN frente a *S. aureus* a la vez que exhiben acción bactericida frente a *P. aeruginosa*, Gram negativo considerado fuera del espectro de acción de VAN. Cabe destacar, que, a diferencia de lo descrito para otros polímeros catiónicos, EuE no exhibe actividad antimicrobiana por sí mismo. El uso de diversas microscopías evidenció alteraciones morfológicas tanto en *S. aureus* como en *P. aeruginosa*, atribuidas a la interacción de EuE con las envolturas bacterianas. El uso de VAN con un *probe* fluorescente puso en evidencia que tales interacciones facilitan el acceso de VAN a la capa de mureína (sitio de acción). Lo expuesto permite explicar la potenciación de EuE-VAN.

Además, se implementaron estudios de eficacia *antibiofilm*. Se determinó un efecto EuE concentración-dependiente tanto para inhibir parcialmente la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa*, como para reducir la actividad metabólica de células en *biofilms* maduros. Posteriormente, se evidenció potenciación del efecto *antibiofilm* de CIP vehiculizada en sistemas EuE-CIP frente a *P. aeruginosa* resistente a este fármaco.

Posteriormente, se evaluó la selectividad del polímero frente a células eucariotas mediante diversos estudios de sensibilización *in vitro*.

Los resultados obtenidos indican que los sistemas estudiados exhiben propiedades adecuadas para su utilización en el diseño de sistemas farmacoterapéuticos de administración oftálmica, con mayor eficacia antibacteriana y espectro ampliado respecto de los fármacos libres.

Summary

This work deals with the development and evaluation of antimicrobial drug carrier systems, using a technological platform in our research group that is based on the use of polyelectrolytes (ionizable polymers) that carry drugs of opposite charge. We use a cationic polymer, Eudragit E100 (EuE) and two drugs, vancomycin (VAN) and ciprofloxacin (CIP). The systems were designed and prepared and aqueous dispersions (EuE-VAN and EuE-CIP) were obtained. Physical chemical properties of biopharmaceutical interest were evaluated for potential use in ophthalmic use formulations. The influence of EuE on the *in vitro* antibacterial efficacy of vehicularized drugs was studied. The developing systems exhibit potentiation of the action of VAN against *S. aureus* while exhibiting bactericidal action against *P. aeruginosa*, a negative Gram considered outside the spectrum of action of VAN. It should be noted that, unlike that described for other cationic polymers, EuE does not exhibit antimicrobial activity by itself. The use of various microscopes showed morphological alterations in both *S. aureus* and *P. aeruginosa*, attributed to the interaction of EuE with bacterial envelopes. The use of VAN with a fluorescent probe showed that such interactions facilitate the access of VAN to the cell wall (site of action). The above explains the empowerment of EuE-VAN.

In addition, antibiofilm efficacy studies were implemented. A concentration-dependent EuE effect was determined both to partially inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa*, and to reduce the metabolic activity of cells in mature biofilms. Subsequently, potentiation of the antibiofilm effect of CIP vehicularized in EuE-CIP systems against *P. aeruginosa* resistant to this drug was evidenced.

Subsequently, the selectivity of the polymer against eukaryotic cells was evaluated by various *in vitro* sensitization studies.

The results obtained indicate that the systems studied exhibit adequate properties for use in the design of ophthalmic administration pharmacotherapeutic systems, with greater antibacterial efficacy and extended spectrum with respect to free drugs.

Índice general

Listado de abreviaturas	xxi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS PROPUESTOS.....	3
1.1 Resistencia a los antimicrobianos.....	4
1.1.1 Principales características y mecanismos de resistencia de <i>P. aeruginosa</i>	10
1.1.2 Principales características de <i>Staphylococcus aureus</i> y mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	12
1.2 Estrategias para combatir la resistencia antimicrobiana.....	14
1.2.1 Utilización de Polielectrolitos como sistemas portadores de fármacos.....	16
1.3. Infecciones por vía tópica.....	20
2.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PROPUESTOS.....	22
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 MATERIALES.....	27
2.1.1 Polímero.....	27
2.1.2 Antimicrobianos.....	28
2.1.2.2. Ciprofloxacino.....	31
2.1.1 Microorganismos en estudio	32
2.2 METODOLOGÍAS.....	33
2.2.1 Preparación de los sistemas portadores PE:ATM.....	33
2.2.2 Caracterización físico-química de los sistemas PE:ATM	35
2.2.3 Experimentos destinados a evaluar la eficacia antimicrobiana <i>in vitro</i>	37
2.2.4 Efecto del polímero catiónico en la integridad de células microbianas: Sensibilización a agentes líticos.....	42

2.2.5 Efecto del polímero catiónico EuE en células formando <i>biofilms</i> ..	43
CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS SISTEMAS PE:ATM	
.....	49
3.1 Características generales de los sistemas EuE-VAN y EuE-CIP	49
3.2 Desplazamiento de pH por intercambio iónico	52
3.3 Estudio de estabilidad de los sistemas EuE-VAN.....	53
3.4 Liofilización de los sistemas EuE-VAN	57
3.5 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)	58
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	60
CAPÍTULO 4: MODIFICACIÓN DE LA EFICACIA DE VANCOMICINA EN LOS SISTEMAS EUE-VAN.....	
.....	65
4.1 Experimentos destinados a evaluar la eficacia antimicrobiana <i>in vitro</i>	65
4.1.1 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)	65
4.1.2 Cinética bactericida de sistemas EuE-VAN	67
4.1.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)	71
4.1.4 Microscopía de fluorescencia.....	73
4.2 Efecto del polímero catiónico en la integridad de células microbianas: Sensibilización a agentes líticos.....	76
4.3.1 Efecto del polímero catiónico en la capacidad de desarrollo de los microorganismos en diversos medios de cultivo	80
5. Conclusiones parciales.....	81
CAPÍTULO 5: EFECTO DE EUDRAGIT E EN CÉLULAS FORMANDO <i>BIOFILMS</i>.	
.....	85
5.1 Adecuación de condiciones experimentales para un desarrollo óptimo de <i>biofilms</i> de <i>P. aeruginosa</i> ,	85
5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EuE Y CIP EN LA INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i> DE <i>P. aeruginosa</i>	86

5.3 Evaluación del efecto de los sistemas en el <i>biofilm</i> maduro de <i>P. aeruginosa</i> FQ R1.....	89
6. CONCLUSIONES PARCIALES	91
CAPÍTULO 6: DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES.	95
BIBLIOGRAFÍA	105
PRESENTACIONES A CONGRESOS RELACIONADOS A LA ETAPA DE TESIS DOCTORAL.....	121

Listado de abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMH	Agar Müeller Hinton
ARG	Del inglés <i>Antibiotic Resistance Genes</i> Genes de Resistencia a Antibióticos
ATCC	Del inglés <i>American type culture collection</i> Cultivo de colección americana
ATM	Antimicrobiano
Bodipy FL VAN	Vancomycin Bodipy™ Conjugate FL
CBM	Concentración bactericida mínima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMC	Carboximetilcelulosa
CMH	Caldo Müeller Hinton
CV	Cristal Violeta
EPS	Exopolisacárido
EuE	Eudragit E100
EUE-CIP	Sistemas portadores EuE100- Ciprofloxacino
EuE-VAN	Sistemas portadores EuE100- Vancomicina
F	Fármaco
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> Administración de alimentos y medicamentos (EEUU)
FQ	Fluoroquinolonas
FT-IR	Del inglés, <i>Infrared Spectroscopy with Fourier Transform</i>

	Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier
GRAS	Del inglés <i>Substances Generally Recognized As Safe</i> Sustancias generalmente reconocidas como seguras
HGT	Del inglés <i>Horizontal gene transfer</i> Transferencia horizontal de genes
HPLC	Del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida de alta resolución
I+D	Investigación y desarrollo
ICH	Del inglés <i>International Conference of Harmonisation</i> Conferencia internacional de armonización
IF	Intensidad de fluorescencia
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
LPS	Lipopolisacarido
MDR	Del inglés <i>Multi Drug Resistant</i> Resistentes a múltiples fármacos
ME	Membrana externa
MF	Mezcla física
Nd	No determinado
OMS	Organización mundial de la salud
OVN	<i>Overnight</i>
<i>P. aeruginosa</i> FQ R1	Aislamiento clínico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Fluoroquinolonas
PBS	Del inglés <i>Phosphate-Buffered Saline</i> Solución reguladora de fosfato salino
PE	Poliectrolito

PE:ATM	Polielectrolito:Antimicrobiano
PE:F	Polielectrolito:Fármaco
PEG 400	Polietilenglicol 400
PMS	Del inglés Phenazine meta sulfate Fenazina metasulfato
PPG	Propilenglicol
RSD	Desviación estándar relativa
SCV	Del inglés <i>Small Colony Variant</i> Variante de colonia pequeña
SDS	Del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> Dodecilsulfato sódico
SF	Solución fisiológica de Cloruro de Sodio estéril 0,9 % p/v
SLM	Sistemas de Liberación Modificada
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina
VISA	Del inglés <i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad intermedia a vancomicina
VRSA	Del inglés <i>Vancomycin-resistance Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
XTT	2,3-Bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazolio-5-carboxanilida
Z	Potencial electrocinético

CAPÍTULO 1:
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
PROPUESTOS



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS PROPUESTOS

La Farmacopea Nacional Argentina define a los medicamentos como toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra. Los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) son esenciales para la prevención y tratamiento de enfermedades¹ requiriendo medicamentos seguros y eficaces. Por lo tanto, los fármacos ideales están siempre en gran demanda. El diseño de fármacos ideales requiere de métodos eficientes y exigentes de desarrollo. El proceso de medicamentos representa un desafío y requiere consideración de muchos aspectos². Para cumplir con estos desafíos, se requieren aportes de múltiples disciplinas como la química, la biología, la farmacología, entre otras.

En particular, los agentes antimicrobianos (ATM) poseen características únicas que los distinguen de otros agentes terapéuticos. Están dirigidos principalmente a microorganismos patógenos frente a los que presentan toxicidad selectiva. La infección puede ocurrir en cualquier sitio del organismo, por lo tanto, dichos agentes terapéuticos deben distribuirse ampliamente y llegar al sitio de acción en las concentraciones adecuadas. La gravedad de la enfermedad infecciosa varía según la edad y los factores de riesgo subyacentes. La elección de la terapia requiere una evaluación de riesgos para garantizar una práctica de prescripción segura y efectiva. Un conjunto de principios que respalda las buenas prácticas de prescripción, ha evolucionado específicamente para el manejo de enfermedades infecciosas. La selección del ATM adecuado se basa en el conocimiento del espectro del mismo y los patógenos responsables de esa infección. La dosis, vía de administración y la duración del tratamiento son afectados por la naturaleza del ATM y del agente infeccioso³. Además de su acción sobre los microorganismos que causan la infección, los ATM suelen afectar la flora normal de la piel y las mucosas dependiendo de la vía de administración. Esto puede resultar en una sobreinfección y ocasionalmente generar resistencia al ATM, afectando al paciente y originando un impacto epidemiológico más amplio^{4,3}.



1.1 Resistencia a los antimicrobianos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la resistencia a los agentes ATM como el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un ATM al que anteriormente era sensible. La resistencia a los ATM de uso en terapéutica es, desde hace varios años, un problema a nivel mundial que provoca seria preocupación a la OMS, organismo desde el cual permanentemente exhortan a implementar acciones a distintos niveles para contrarrestar sus efectos. La resistencia surge por la mutación del microorganismo o por la adquisición de genes de resistencia⁵. Las bacterias pueden adquirir resistencia mediante transferencia horizontal de genes (HGT). La HGT ha provocado que la resistencia se propague de especies comensales y ambientales a patógenas, como se ha demostrado para algunos genes de resistencia a antibióticos clínicamente importantes. Los autores discutieron el concepto de resistoma, proporcionando ejemplos de HGT de genes de resistencias de antibióticos clínicamente relevantes y una visión general del conocimiento actual de las contribuciones de los diversos mecanismos HGT a la propagación de la resistencia a los antibióticos⁶.

En la actualidad, cada año, aproximadamente 700 000 pacientes mueren en todo el mundo debido a la resistencia a los ATM^{7,8}. Existen muchos factores que estimulan el incremento de la resistencia a los ATM y, uno de ellos es el uso irracional de los mismos. Desafortunadamente, el uso y el abuso de los ATM han producido una expansión incesante de los microorganismos resistentes, con la consiguiente pérdida de eficacia de estos fármacos. Debido a su disponibilidad generalizada, su carácter familiar, su costo generalmente bajo y su relativa inocuidad, los ATM se encuentran entre los medicamentos que más se utilizan de forma incorrecta. La mejora de las decisiones sobre el uso de los ATM requiere en última instancia una orientación de las decisiones terapéuticas hechas por los pacientes y los prestadores de atención sanitaria. A su vez, la mayoría de los ATM utilizados en el mundo no son administrados a pacientes, sino a animales (ganado bovino y ovino, aves y peces) destinados al consumo. El uso de enormes cantidades de ATM en la producción de alimentos y su amplia liberación involuntaria en el medio ambiente a través de las aguas residuales y del agua utilizada en las explotaciones agrícolas, tiene consecuencias para la salud pública que resultan particularmente evidentes en el caso de las bacterias zoonóticas

causantes de enfermedades humanas transmitidas por los alimentos. Es especialmente preocupante, el posible paso de genes de resistencia de las bacterias de origen animal a los patógenos humanos.

Otros factores que estimulan el desarrollo de resistencia a ATM, son las propiedades fisicoquímicas y biológicas desfavorables (baja estabilidad, baja solubilidad, baja permeación, entre otras) que a su vez, conducen a una falta de eficacia de los mismos^{6,9}.

Estos factores, entre otros conducen a que los microorganismos desarrollen resistencia. La resistencia conlleva entonces, a la falta de eficacia de los ATM y a disminuir las posibilidades de tratamientos^{5,10,11}.

La resistencia exitosa de las bacterias a la acción de los ATM requiere la interrupción o la alteración de uno o más de los pasos esenciales para una acción antimicrobiana eficaz¹². Estas alteraciones o mecanismos de resistencia pueden aparecer de diversas maneras, pero el resultado final es la pérdida de eficacia antibiótica. Entre los diferentes mecanismos de resistencia a los ATM se pueden destacar tres tipos: biológica o clínica, mediada por factores ambientales y mediada por microorganismos¹².

La resistencia biológica se refiere a los cambios que determinan que la sensibilidad del microorganismo a un ATM determinado sea inferior al que se observaba con anterioridad. Cuando la sensibilidad al ATM se perdió hasta tal grado que el IFA ya no es eficaz para uso clínico se dice que el microorganismo alcanzó la resistencia clínica.

La resistencia mediada por factores ambientales se define como la que resulta directamente de las características físicas o químicas del ambiente que alteran en forma directa al agente ATM o bien alteran la respuesta fisiológica normal del microorganismo al IFA. Entre los ejemplos de factores ambientales que median la resistencia Figuran el pH, una atmósfera anaerobia, entre otros.

La resistencia mediada por microorganismos es la producida por rasgos del microorganismo codificados genéticamente y es el tipo de resistencia que prueban los métodos de sensibilidad *in vitro*. Esta a su vez, puede subdividirse en dos categorías: la resistencia intrínseca y la adquirida. La resistencia intrínseca es el resultado del



estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo. Se considera que este tipo de resistencia es una característica natural que se asocia con la mayoría de las cepas que constituyen un grupo, un género o una especie de bacteria particular. Por consiguiente, esta es una resistencia predecible de manera que una vez que se conoce la identidad del microorganismo también se conocen ciertos aspectos de su perfil de resistencia a los ATM. Algunos ejemplos de resistencia intrínseca se muestran en la tabla 1.1¹³.

Tabla 1.1 Ejemplo de resistencia intrínseca a agentes ATM

Resistencia natural	Mecanismo
De las bacterias anaerobias a los aminoglucósidos	Falta de metabolismo oxidativo para mediar la captación de aminoglucósidos.
De las bacterias Gram positivas al aztreonam	Falta de proteínas de unión a la penicilina (PBP) que se unen y sean inhibidas por este antibiótico betalactámico.
De las bacterias Gram negativas a la vancomicina	Falta de captación como resultado de la incapacidad de la vancomicina de atravesar la membrana externa.
De <i>P. aeruginosa</i> a las sulfonamidas	Falta de captación como resultado de la incapacidad de los antibióticos de alcanzar concentraciones intracelulares eficaces.
De las especies de <i>Klebsiella</i> a la ampicilina	Producción de enzimas (betalactamasas) que destruyen la ampicilina antes de que pueda llegar a las PBP.
De las bacterias aerobias al metronidazol	Incapacidad de reducir el IFA a su forma activa en anaerobiosis.
De los enterococos a los aminoglucósidos	Falta de metabolismo oxidativo suficiente para mediar la captación de aminoglucósidos.
De los enterococos a todas las Cefalosporinas	Falta de PBP que se unan y sean inhibidas por estos antibióticos betalactámicos
De los lactobacilos y de <i>Leuconostoc</i> a la vancomicina	Falta de un precursor de la pared celular como diana apropiada para permitir que la vancomicina se una e inhiba la síntesis de la pared celular.
De <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> al imipenem	Producción de betalactamasas que destruyen el imipenem antes de que pueda alcanzar los sitios de acción de las PBP.

Por el contrario, la resistencia adquirida surge como resultado de la alteración de la fisiología y la estructura de las células, a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo. Puede ser un rasgo asociado con algunas cepas de un grupo o especie de microorganismo, pero no con otras. Por consiguiente, la presencia de este tipo de resistencia en cualquier aislamiento clínico es imprevisible y esta falta de previsibilidad es la razón fundamental por la que se necesitan métodos de laboratorio para detectar la resistencia. Como todos los mecanismos de resistencia adquiridos están codificados en forma genética, los métodos de adquisición son básicamente los mismos que permiten el cambio o el intercambio de genes. Por lo tanto, la resistencia puede adquirirse por:

- ✓ Mutaciones genéticas exitosas.
- ✓ Adquisición de genes de otros microorganismos por medio de los mecanismos de transferencia génica.
- ✓ Una combinación de acontecimientos de mutación y de transferencia génica.

Independientemente de que la resistencia sea intrínseca o adquirida, las bacterias comparten vías similares para efectivizar la resistencia a los agentes ATM. Las más frecuentes son las que involucran destrucción o alteración enzimática del antibiótico, disminución de la captación o acumulación intracelular del fármaco y modificación del sitio de acción del antibiótico.

La mayoría de los microorganismos resistentes a ATM se corresponden a aislamientos clínicos de pacientes hospitalizados. En los últimos años, el problema se ha acrecentado llegando al punto de encontrar microorganismos multirresistentes a varias clases de antimicrobianos¹⁴.

Las bacterias resistentes a ATM, especialmente los patógenos “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae* species) causan infecciones severas con alta morbilidad y mortalidad. Los Centros para el control y la prevención de Enfermedades de los EE. UU¹⁵, han identificado formalmente a estos patógenos resistentes a múltiples fármacos específicos (MDR por sus siglas en inglés) como patógenos de alta prioridad, al igual que OMS. Desde 2002, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América ha expresado su preocupación en nombre de los médicos para tratar los patógenos MDR¹⁴.



La OMS ha publicado en el 2017 una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. La lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes. Esta lista es una nueva herramienta para garantizar que la I+D responda a necesidades urgentes de salud pública», señala la Dra. Marie-Paule Kieny, Subdirectora General de la OMS para Sistemas de Salud e Innovación¹⁶. La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. La lista se elaboró en colaboración con la división de enfermedades infecciosas de la Universidad de Tübingen (Alemania), mediante una técnica de análisis de decisiones de múltiples criterios desarrollada por un grupo de expertos internacionales. Los criterios para incluir patógenos en la lista fueron los siguientes: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan. La lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos se mencionan en la tabla 1.2¹⁶. Aunque es esencial aumentar la I+D, no basta para solucionar el problema. Para luchar contra la resistencia, tiene que haber también una mejor prevención de las infecciones y un uso apropiado de los antibióticos existentes en la medicina humana y veterinaria, así como un uso racional de cualquier nuevo antibiótico que se desarrolle en el futuro. La lucha contra la resistencia es constante y el descubrimiento de nuevos ATM es crítico¹⁷. A nivel mundial, la industria farmacéutica ha recortado significativamente los fondos para la investigación y la realización de estudios clínicos sobre nuevos

ATM. En consecuencia, el número de nuevos ATM en fase de desarrollo ha disminuido notablemente en el último decenio, poniendo en cuestión la disponibilidad de opciones terapéuticas eficaces en el futuro. Existen varios factores científicos y económicos que desincentivan el desarrollo de nuevos fármacos ATM:

- ✓ Los nuevos fármacos tienen un mercado reducido.
- ✓ Por lo general, los ATM se administran durante uno a diez días.
- ✓ Muchas enfermedades parasitarias, tropicales y huérfanas son poco frecuentes en el mundo desarrollado, que es la principal fuente de ingresos para los fabricantes de medicamentos.
- ✓ Problemas biológicos: la identificación de nuevas dianas para la acción de los ATM ha resultado difícil. La mayoría de los nuevos ATM son variantes químicas de otros antiguos. En consecuencia, la resistencia puede aparecer rápidamente.
- ✓ Efectos tóxicos: en general, los ATM son relativamente seguros, en comparación con otros medicamentos de uso humano. Por consiguiente, el umbral de tolerancia a los efectos tóxicos demostrados o presumibles de los nuevos IFA es bajo. El riesgo de que los nuevos compuestos sean retirados del mercado es un factor importante que desincentiva el desarrollo de nuevos IFA¹⁸.

Tabla 1.2 Lista de patógenos prioritarios de la OMS

Patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos	
Prioridad Crítica	1: <i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenémicos. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenémicos. Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos.
Prioridad Alta	2: <i>Enterococcus faecium</i> , resistente a la vancomicina. <i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina. <i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina. <i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas. <i>Salmonellae</i> , resistentes a las fluoroquinolonas. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas.
Prioridad Media	3: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin sensibilidad a la penicilina. <i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina. <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas.

Los estudios abordados en esta tesis se realizaron evaluando los sistemas portadores de Antimicrobianos frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*, especies incluidas en el mencionado listado de la OMS en prioridad crítica y alta, respectivamente.

1.1.1 Principales características y mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo (Figura 1.1) perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, que es capaz de sobrevivir en ambientes variados. Es un patógeno oportunista y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística e individuos inmunocomprometidos. Causa enfermedades en plantas y en animales, incluyendo a humanos y es la principal causa de infecciones adquiridas en pacientes hospitalizados. Está asociada a infecciones pulmonares, cómo se mencionó anteriormente, gastrointestinales, dermatitis, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, en los ojos (queratitis bacteriana), infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos en particular en pacientes con cáncer¹⁹.

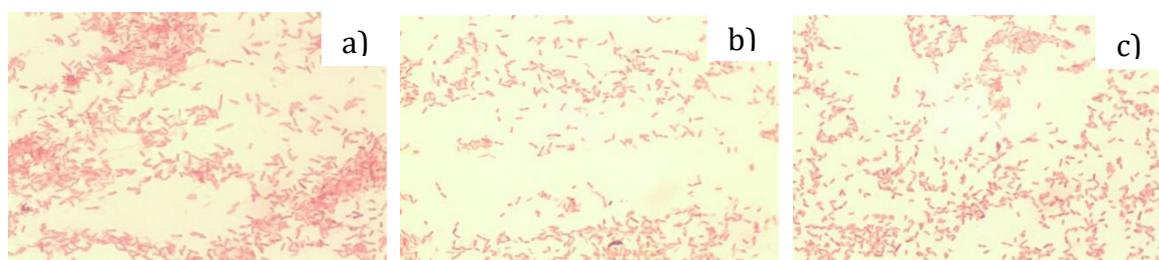


Figura 1.1 Coloración de Gram de: a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (*American type culture collection*) 27853, b) Aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Fluoroquinolonas (FQ R1), c) *Pseudomonas aeruginosa* PA014. Estas imágenes fueron tomadas con Microscopio de luz polarizada OLYMPUS BX41, 100x

La erradicación de *P. aeruginosa* se ha vuelto cada vez más difícil debido a su alta capacidad para resistir a los antibióticos^{19,20}. Las cepas de *P. aeruginosa* son conocidas por poseer altos niveles de mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos para contrarrestar los efectos de la mayoría de los antibióticos. El genoma de *P. aeruginosa* es relativamente grande en comparación con otras secuencias bacterianas y codifica una gran proporción de enzimas reguladoras importantes para el metabolismo, transporte y salida de compuestos orgánicos. Esta capacidad de codificación mejorada del genoma de *P. aeruginosa* permite una gran versatilidad metabólica y alta adaptabilidad a los cambios ambientales^{21,22}. La resistencia

intrínseca a los antibióticos de una especie bacteriana se refiere a su capacidad innata para disminuir la eficacia de un antibiótico específico a través de características estructurales o funcionales inherentes²³. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* posee un alto nivel de resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos debido a que presenta permeabilidad restringida por la membrana externa, sistemas de flujo de salida que bombean a los antibióticos hacia afuera de la célula y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, como las β -lactamasas²⁰. La mayoría de los antibióticos utilizados para tratar las infecciones causadas por *P. aeruginosa* deben penetrar la membrana celular para alcanzar el objetivo intracelular. Por ejemplo, los antibióticos de la familia de las Fluoroquinolonas como ciprofloxacino y evofloxacino interfieren con la replicación del ADN al inhibir la ADN girasa y topoisomerasa, IV^{24,20}, según la especie considerada.

La membrana externa de las bacterias Gram negativas es una bicapa asimétrica de fosfolípido y lipopolisacárido (LPS) que posee porinas que forman canales de proteína β ²⁵.

La permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* es aproximadamente de 12 a 100 veces menor que la de *E. coli*. La proteína A de membrana externa (OmpA) y la proteína F (OprF), son las porinas predominantes de *P. aeruginosa* y son las responsables de la captación inespecífica de iones y sacáridos, pero tienen baja eficiencia para la permeación de antibióticos. La mayoría de los canales OprF cerrados pueden explicar la razón por la cual la membrana externa de *P. aeruginosa* presenta baja permeabilidad en comparación a otras bacterias. Adicionalmente, la ausencia de OprF conduce a un aumento en la formación de *biofilms* a través de la regulación de alfa bis- (3'-5' ') - guanosina dimérica cíclica monofosfato (c-di-GMP), que es un importante mensajero que regula la formación de *biofilms*. Las mutaciones pueden causar una reducción en la absorción de antibióticos, modificaciones de los sitios blanco de los mismos y sobreexpresión de bombas de eflujo y enzimas inactivadoras. Todas estas mutaciones, permiten que las bacterias puedan sobrevivir en presencia de los ATM. Por ejemplo, una deficiencia de OprD (porina implicada en la absorción de antibióticos) en *P. aeruginosa* confiere un alto nivel de resistencia a los carbapenems, especialmente al imipenem. Otro mecanismo importante de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*, son las mutaciones que causan la sobreexpresión de enzimas inactivadoras de ATM. Por ejemplo, la sobreproducción



de β -lactamasas causadas por mutaciones en el gen inducible ampC (Cefalosporinasa), incrementó enormemente la resistencia a cefalosporinas. Además, la inactivación de mutaciones en el gen ampD, que codifica una N-acetil-anhidromuramilo citosólico α -alanina amidasa y actúa como un represor de la expresión de ampC, da lugar a una hiperproducción de lactamasas β en *P. aeruginosa*.

Por su parte, en muchos entornos diferentes el modo de crecimiento de las bacterias es formando *biofilms*, siendo causa de la cronicidad de muchas infecciones en humanos. *P. aeruginosa* presenta una alta capacidad de formación de *biofilms*. En ese contexto, muestran un fenotipo diferente de las bacterias planctónicas. Exhiben mayor resistencia a los ATM y evaden el sistema inmune del huésped. La resistencia es atribuida a la difusión limitada de los ATM en la matriz del *biofilm*, la inactivación por unión a componentes de la misma o modificación enzimática y la aparición de nichos en el *biofilm* con células menos sensibles²⁰.

Para el tratamiento contra *P. aeruginosa* es necesario el uso de diferentes combinaciones de antibióticos y el desarrollo de nuevos antibióticos. Se ha demostrado que los nuevos antibióticos son más eficaces para matar y tener menor frecuencia de desarrollo de resistencia en *P. aeruginosa* en comparación con los antibióticos existentes, debido a sus nuevos mecanismos de acción. El desarrollo de nuevos antibióticos es limitado. Así, la obtención de nuevos enfoques terapéuticos para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* es altamente deseable y ha ganado más atención en la última década^{19,20,24,26,27,28}.

1.1.2 Principales características de *Staphylococcus aureus* y mecanismos de resistencia a antimicrobianos

S. aureus es una bacteria Gram positiva que coloniza entre un 10-20% la población humana. Sin embargo, esta bacteria sigue siendo un agente importante causante de muchas infecciones en humanos. Es la especie más virulenta de estafilococos que se conoce. Pertenece a la familia de los *Micrococcaceae*. Es una bacteria inmóvil que no elabora esporas y produce un pigmento amarillo. Estos cocos Gram positivos pueden encontrarse aislados, en pares o formando racimos. Son agentes etiológicos de múltiples infecciones que varían en su gravedad, desde abscesos de la piel e infecciones de heridas, hasta abscesos de tejidos profundos, endocarditis, osteomielitis, síndrome de shock tóxico, neumonía, bacteriemia, sepsis,

conjuntivitis, queratitis bacteriana, entre otras^{29,30,31,32,33,34,35}. La heterogeneidad de estas enfermedades y la capacidad única de esta bacteria para desarrollar resistencia a los agentes ATM, refleja su excelente capacidad para adaptarse a una gran variedad de ambientes. El genoma de *S. aureus* reveló la existencia de muchos elementos de ADN movilizables que contienen determinantes específicos responsables de la resistencia a los ATM.

La mayoría de las cepas de *S. aureus* producen penicilinasas. En la actualidad, adquiere relevancia *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) ya que afecta tanto a pacientes hospitalizados como a pacientes ambulatorios^{36,37,38}. La resistencia a la penicilina surgió en este microorganismo en 1940 debido a la adquisición de una betalactamasa codificada en plásmidos que se diseminó rápidamente. En la actualidad, aproximadamente el 90 % de los aislamientos clínicos de *S. aureus* es resistente a este antibiótico. La resistencia a la meticilina, reportada inicialmente en 1961 y mediada por la adquisición del gen *mecA* de origen cromosómico, también se diseminó rápidamente en los hospitales del mundo y hoy ha alcanzado proporciones epidémicas en algunos países y ha tenido un impacto importante en los sistemas de salud. Es por esta razón que la vancomicina ha sido el antibiótico de primera línea en el tratamiento de infecciones graves causadas por MRSA durante más de cuatro décadas. Sin embargo, tres problemas relacionados con este ATM causan preocupación y se han convertido en objeto de diversas investigaciones a nivel mundial: i) la emergencia de cepas de estafilococo con sensibilidad disminuida a la vancomicina; ii) los reportes sobre el fracaso del tratamiento de infecciones causadas por aislamientos sensibles con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) cercanas al punto de corte establecido para este antibiótico ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), y iii) su asociación con efectos secundarios, particularmente en lo relacionado con la insuficiencia renal aguda.

El mecanismo de resistencia en las cepas de *S. aureus* de sensibilidad intermedia o con heterorresistencia a la vancomicina no involucra la adquisición de genes típicos de resistencia a la vancomicina, sino una alteración adaptativa de la fisiología celular debida a la acumulación de mutaciones en diversos genes, lo que resulta en cambios importantes de la homeostasis de la síntesis de la pared bacteriana y en una disminución de la actividad autocatalítica. Uno de los fenómenos

comúnmente observado es el incremento en el grosor de la pared bacteriana (el cual aumenta casi al doble) (Figura 1.2). Se postula que este engrosamiento contribuye a “atrapar” el ATM (por ejemplo, la vancomicina) en las capas más externas de peptidoglucano, evitando su interacción con los precursores del peptidoglucano que emergen del citoplasma y permitiendo una síntesis activa de la pared celular en presencia del antibiótico.

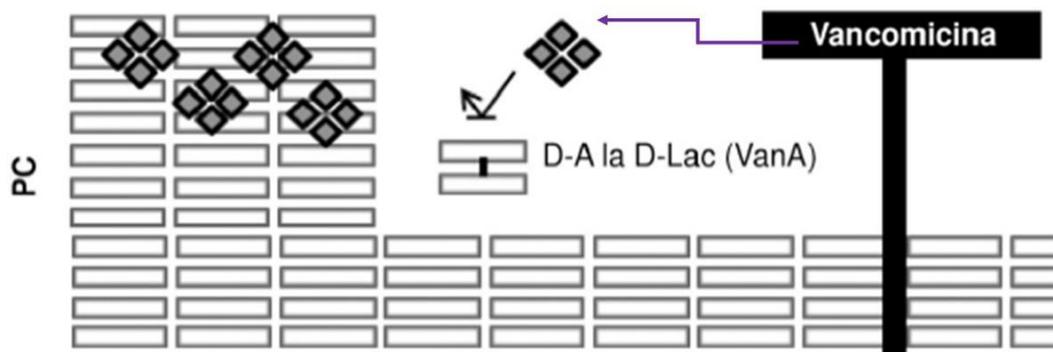


Figura 1.2 Mecanismo de resistencia de *S. aureus* a vancomicina.
Extraído de referencia ⁸¹.

1.2 Estrategias para combatir la resistencia antimicrobiana

Desafortunadamente, después de más de medio siglo, la industria farmacéutica ha desarrollado pocos agentes antibacterianos para reemplazar a aquellos que ya no son efectivos para muchos tipos de infecciones. Sin embargo, solo unos pocos agentes ATM se han comercializado en las últimas cuatro décadas y la mayoría de ellos son para el manejo de infecciones causadas por bacterias Gram positivas³⁹.

Existen en la actualidad distintas estrategias para combatir la resistencia a ATM. Una de ellas es la potenciación de compuestos conocidos. La administración de dos antibióticos o de un antibiótico con un potenciador con el objetivo de obtener un efecto sinérgico o aditivo es un ejemplo clásico de este enfoque. La aplicación más famosa del concepto de potenciadores antimicrobianos es el uso de inhibidores de la β lactamasa (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam)⁴⁰.

Otra estrategia utilizada en I+D, es el uso de péptidos antimicrobianos (AMPs) con diversas actividades que van desde antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, antiplasmodiales, antiprotistinas, insecticidas y espermicidas hasta la inmunomodulación. Aunque la mayoría de estos péptidos tienen una carga positiva neta, también se han informado péptidos antimicrobianos aniónicos. Estos

péptidos son anfifílicos y su dominio catiónico tiene la capacidad de interactuar electrostáticamente con la superficie celular bacteriana cargada negativamente, mientras que el dominio hidrofóbico interactúa con los lípidos de la membrana bacteriana. Esto da como resultado la desintegración de la membrana celular y finalmente la muerte bacteriana. Las células del ser humano son de naturaleza zwitteriónica y, por lo tanto, no interactúan bien con los AMP cargados positivamente, lo que los hace selectivamente tóxicos hacia las bacterias. Un péptido biomimético, enfuvirtide (Fuzeon) fue aprobado por la FDA (*Food and drug administration*-Estados Unidos) para la terapia de combinación contra el VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana).

Aunque muchos AMP se están sometiendo a ensayos clínicos, la toxicidad *in vivo* y la difícil escalabilidad industrial ha dificultado la aprobación para uso clínico de esta clase de agentes antimicrobianos alternativos^{17,41,42,43}.

Los bacteriófagos (fagos), son virus específicos contra bacterias presentes en casi todos los nichos ecológicos. Debido a que los fagos son los depredadores naturales de las bacterias, su uso como ATM puede parecer bastante sencillo. Sin embargo, el riesgo de desarrollo de resistencia es alto y puede haber problemas clínicos con la neutralización de los fagos por la respuesta inmune del huésped. En la actualidad han sido aprobados varios fagos para su uso farmacoterapéutico y otros están en fase de estudios pre-clínicos. Un ejemplo de fago aprobado es SalmoShield elaborado por Intralytix (compañía biotecnológica enfocada en el descubrimiento, producción y comercialización de productos a base de bacteriófagos) para infecciones por quemaduras causadas por *P. aeruginosa* y *E. coli*. Otro ejemplo aprobado es Phago elaborado por Biochimpharm para el tratamiento y profilaxis de infecciones por bacterias purulentas-inflamatorias (microorganismos múltiples)^{17,44,45,46}.

Para causar la infección, las bacterias producen moléculas extracelulares, de la superficie celular, entre otras, conocidas como factores de virulencia. La inhibición de la expresión de los factores de virulencia, que interfiere con la interacción entre la bacteria y su huésped, es otra estrategia para combatir la infección. Dado que la estrategia no apunta directamente a los procesos celulares bacterianos, se reduce la propensión a desarrollar resistencia¹⁷.



Otra estrategia ampliamente utilizada a fin de reducir la falta de eficacia de un ATM es el uso de sistemas portadores. Estos pueden transportar el IFA hacia el sitio de acción, modular la liberación, aumentar el tiempo de contacto con el sitio de acción^{47,48,49,50,51,52}. Esta estrategia ha sido extensamente estudiada para vehicular agentes ATM ya que estos sistemas administrados por vía oral permiten mantener constante la concentración plasmática de ATM sobre el valor de CIM durante un período prolongado, maximizando el efecto terapéutico y reduciendo el posible desarrollo de resistencia. Otra ventaja indudable de los sistemas portadores de liberación prolongada es la mejora en el cumplimiento del paciente al reducir la frecuencia de dosificación. Además, se disminuyen los efectos adversos y mejoran propiedades físico químicas desfavorables (baja solubilidad en agua e inestabilidad química)⁵³.

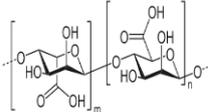
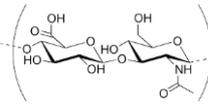
Entre los sistemas portadores de fármacos se encuentran las nanopartículas (de distintos orígenes) que han demostrado un gran potencial en los últimos años. La encapsulación de IFAs en nanopartículas, incluidas micelas, liposomas, dendrímeros, nanocápsulas, nanoesferas entre otras mejoran el índice terapéutico y reducen los efectos adversos. Por ejemplo, los liposomas pueden mejorar la biodisponibilidad, aumentar la eficacia y reducir la toxicidad. Varios medicamentos exitosos basados en liposomas han sido aprobados en Estados Unidos por la FDA, como doxorubicina liposomal (Doxil®) y anfotericina B liposomal (Ambisome®)⁵³.

1.2.1 Utilización de Polielectrolitos como sistemas portadores de fármacos.

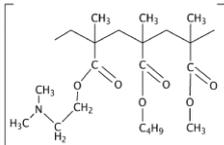
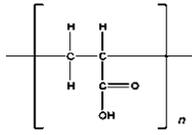
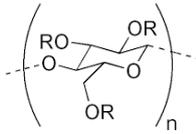
Desde hace varios años en nuestro laboratorio se trabaja en proyectos de I+D de sistemas portadores utilizando polímeros con grupos ionizables, polielectrolitos (PE), portadores de fármacos ácidos o básicos, según corresponda. Los PE son polímeros hidrofílicos que contienen grupos ionizables, los cuales al ser dispersados en un solvente polar pueden disociarse generando cadenas de polímero cargadas (macroiones) y pequeños contraiones⁵⁴. Sobre la base de la carga que generan en dispersión, los PE pueden clasificarse en aniónicos (que generan cargas negativas provistas generalmente por grupos carboxilato) y catiónicos (que generan cargas positivas generalmente provistas por grupos amino protonados)⁵⁴. En la Tabla 1.3 se describen algunos PE aprobados en terapéutica, su origen, aplicaciones y

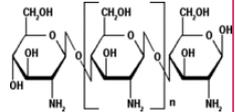
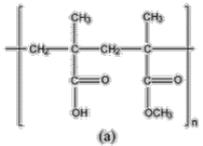
usos^{55,56,57,58}, principalmente los utilizados en nuestro grupo de investigación para el desarrollo de sistemas portadores Polielectrolito:Fármaco (PE:F). Las propiedades únicas provenientes de la interacción de los PE con contraiones orgánicos o inorgánicos se han explotado para una variedad de propósitos tales como: modulación de la liberación de fármacos (F), enmascaramiento del sabor, incremento de la compatibilidad o estabilidad acuosa, potenciación de ATM, aumento de la permeabilidad, entre otros^{59,60,61,62,63,64}.

Tabla 2.3 Principales Polielectrolitos utilizados en nuestro laboratorio para el desarrollo de sistemas portadores PE:F

PE	Características físico químicas	Aplicaciones y usos	Estructura química
Ácido algínico	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero aniónico de origen natural. - Natural, lineal, mezcla de β-(1-4)-D-ácido manosilurónico y α-(1-4)-L-ácido gulosilurónico. - Peso Molecular= 20.000 - 200.000 D. - Estabilidad térmica baja. - Viscosidad media-alta. - Soluble en medio básico, muy poco soluble en etanol, en agua se hincha pero no se disuelve. 	Utilizado en una variedad de formulaciones farmacéuticas orales y tópicas. Aglutinante y desintegrante. Como agente viscosante en suspensiones, pastas, cremas y geles y estabilizante en emulsiones aceite/agua.	
Ácido hialurónico	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero aniónico de origen natural. - Mezcla de ácido manurónico y glucurónico. - Inestable a temperaturas elevadas. - Alta viscosidad. - Soluble en agua, ligeramente soluble en mezclas de solventes orgánicos. 	Utilizado como adyuvante en SLM (Sistemas de liberación modificada) oftálmicos, mejora la absorción de IFAs y proteínas a través de la mucosa. Se encuentra aprobado para implantes de lentes intraoculares. También se ha utilizado de forma experimental	



		<p>en liberación controlada de <i>films</i> para su aplicación en cirugías y en terapia génica.</p>	
<p>Eudragit E100 (EuE)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero catiónico, sintético y lineal copolímero basado en dimetilaminoetilmetacrilato. - Soluble en fluido gástrico, acetona y etanol, insoluble en agua. - Muy poco viscoso en agua. - Peso molecular=100 000 D. 	<p>Agente formador de coberturas solubles a pH gástrico. ligante y relleno en comprimidos.</p> <p>Formador de matriz en sistemas de liberación modificada para vía oral, transdermal y rectal. En nuestro grupo de investigación se ha utilizado como vehículo de fármacos en dispersiones acuosas.</p>	
<p>Carbomer</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero aniónico, entrecruzado, sintético y de alto peso molecular. Constituido por cadenas de ácido acrílico. El grado de entrecruzamiento origina las diferentes clases de Carbomer. - En agua forma dispersiones coloidales que, al ser neutralizadas generan geles de alta viscosidad. - Hinchable en agua. 	<p>En formas farmacéuticas líquidas y semisólidas como viscosante y suspensor, para administración oftálmica, rectal y tópica en general. Emulsificante en preparaciones aceite en agua (0,1-1,0%). En comprimidos, como ligante tanto en compresión directa como en granulación húmeda (5-10 %).</p>	
<p>Carboxi-metil-celulosa (CMC)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero aniónico, derivado semisintético de celulosa. - Insoluble en acetona y etanol, dispersable en agua. - Las CMC generan dispersiones acuosas con 	<p>Agente viscosante de suspensiones y estabilizante de emulsiones, (0,25 – 6,0 %), para formulaciones orales, tópicas y parenteral. En comprimidos como</p>	

	diferente viscosidad dependiendo el grado de sustitución.	ligante - desintegrante (1,0 - 6,0 %).	
Quitosano	<ul style="list-style-type: none"> - Polímero catiónico, natural, derivado lineal de quitina. - Poco soluble en agua, insoluble en etanol. - Estable térmicamente, de moderada a baja viscosidad. 	<p>Agente de cobertura, desintegrante, formador de <i>films</i>, ligante en comprimidos, viscosante y mucoadhesivo.</p> <p>Se estudia su uso en SLM colónica, oftálmica, nasal, pulmonar y en terapia génica.</p>	
Eudragit L100 y S100	<ul style="list-style-type: none"> - Polímeros aniónicos, sintéticos y lineales. - Solubles en acetona y alcoholes. - Generan dispersiones acuosas ligeramente viscosas. 	Utilizados en el recubrimiento de comprimidos entéricos.	

Cuando se neutralizan los grupos ácidos o básicos de un PE con moléculas de carga contraria, con F básicos o ácidos respectivamente, se generan los siguientes equilibrios en un medio acuoso:

PE aniónicos (RCOOH)



PE catiónicos RN(CH₃)₂



Las ecuaciones 1.2.1 y 1.2.2 ejemplifican el fenómeno de condensación iónica, que genera una dada proporción de pares iónicos como producto de la asociación iónica entre un PE y un F de carga opuesta. Estos pares iónicos, indicados en las mencionadas ecuaciones como las especies a la derecha, son denominados sistemas PE-F.

En nuestro grupo de I+D se han desarrollado Sistemas de Liberación Modificada (SLM) constituidos por complejos PE:F en dispersión^{65,66,67,68}. Estos



productos pueden ser catalogados como sistemas de liberación “inteligentes” dado que liberan el F en respuesta a cambios en el entorno. En este sentido, el agregado de iones al sistema genera intercambios iónicos y reagrupamientos de cargas, provocando la disociación parcial de los pares iónicos (ecuación 1.2.3).



Esto nos ha permitido consolidar una plataforma tecnológica original, basada en la interacción ácido-base entre un PE y F ionizables de carga opuesta, sobre cuya base se diseñan SLM para atender situaciones farmacoterapéuticas específicas. Estos sistemas permiten mejorar la efectividad, seguridad y confiabilidad de F de reconocida utilidad terapéutica. Se ha observado que, en dispersión acuosa, la interacción entre el PE y el F genera un alto grado de condensación iónica que confiere a estos sistemas propiedades singulares que pueden aprovecharse en una variedad de aplicaciones farmacotécnicas tales como: modulación de la liberación del F, interacción con los sitios de absorción del F, aumento de la compatibilidad acuosa de F pocos solubles, aumento de la estabilidad química, potenciación de las propiedades antimicrobianas de los F vehiculizados modificando las interacciones con células procariotas y eucariotas⁶⁹.

1.3. Infecciones por vía tópica.

En particular, en este trabajo de tesis nos interesa abordar infecciones que requieren tratamientos administrados vía tópica para las cuales no existe una farmacoterapia efectiva, como es el caso de las queratitis bacterianas. La queratitis bacteriana es considerada una urgencia oftalmológica⁷⁰. Es una infección aguda de la córnea. La ineficacia de la farmacoterapia puede causar morbilidad ocular severa, cicatrices y pérdida de visión⁷¹. El objetivo de la terapia es la erradicación rápida de los agentes infecciosos en la córnea. Los agentes etiológicos más comunes que causan queratitis bacteriana son: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros. Los síntomas clínicos de la queratitis bacteriana incluyen dolor agudo, enrojecimiento, fotofobia y ulceración corneal. Las úlceras causadas por *P. aeruginosa* son las más graves, ya que son difíciles de tratar, por la marcada resistencia a ATM que presenta este agente causal³⁴.

Como se mencionó anteriormente, ningún antibiótico es efectivo contra todos los agentes que causan queratitis bacterianas y, se necesita un agente de amplio espectro para cubrir tanto los organismos Gram negativos como los Gram positivos. Actualmente, se utilizan “fortificados antimicrobianos” para aplicación tópica. Estos, se han desarrollado a fin de disponer del ATM en gotas oftálmicas cuya concentración es más alta que las gotas comercializadas o en otros casos, no existe tal formulación. Los ATM fortificados provienen de formulaciones inyectables, que han sido aprobadas cómo tales, por lo tanto, esta reformulación de uso oftálmico puede ocasionar efectos adversos, ya que no ha sido realizada para esa vía de administración^{71,70}. Algunas combinaciones que se utilizan se mencionan a continuación:

- ✓ Vancomicina (1,5-5%) + aminoglucósido (amikacina).
- ✓ Vancomicina (1,5-5%) + ceftazidima (5%)
- ✓ Vancomicina (1,5-5%) + ciprofloxacino (CIP, 0,3%).

La escasa estabilidad acuosa de los ATM utilizados es uno de los inconvenientes de su uso, además de su elevada concentración. Algunas desventajas que presentan los antimicrobianos fortificados se muestran en el esquema 1.1.



Esquema 1.1 Principales desventajas de los “fortificados antimicrobianos” utilizados en queratitis bacteriana.

El tratamiento exitoso de la queratitis requiere una adecuada concentración de antimicrobiano en el área precorneal durante un tiempo adecuado. Aunque los



colirios permiten la fácil administración por parte del paciente, generalmente tienen baja biodisponibilidad debido a la secreción de fluido lagrimal⁷¹.

En resumen, no existe en la actualidad una formulación oftálmica de amplio espectro para la administración tópica, como la que requiere el tratamiento de esta u otras patologías oftálmicas de superficie ocular.

2.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PROPUESTOS.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación evidenciaron que sistemas portadores desarrollados vehiculizando antimicrobianos Fluoroquinolónicos exhibieron potenciación de su acción bactericida frente a bacterias planctónicas, resistentes a tales antimicrobianos. Tales resultados fueron atribuidos a alteraciones en las envolturas bacterianas generadas por la interacción del polímero portador con *P. aeruginosa*, así como también con *S. aureus*, aunque en menor magnitud^{69,72}. Sobre la base de lo precedentemente expuesto, nos preguntamos si se modificaría la eficacia de vancomicina, un antimicrobiano de la familia de los glucopéptidos, cuya acción se ve limitada sólo a gérmenes Gram positivos, al ser vehiculizado en un sistema PE:F.

El **objetivo general** de este trabajo de tesis es desarrollar sistemas portadores PE:F como estrategia que permita mejorar la eficacia de los antimicrobianos ante la problemática mundial de la resistencia.

En este contexto, los **objetivos específicos** planteados son:

1-Diseñar y obtener sistemas Polielectrolito:Antimicrobiano (PE:ATM), utilizando la plataforma tecnológica PE:F en desarrollo en el grupo de investigación:

- a) Sistemas EuE-VAN: sistemas portadores constituidos por el polielectrolito catiónico Eudragit E100 (EuE) y vancomicina (VAN).
- b) Sistemas EuE-CIP: sistemas portadores constituidos por el polielectrolito catiónico Eudragit E100 (EuE) y ciprofloxacino (CIP).

2- Caracterizar a los sistemas PE:ATM, abordando diversos aspectos, según corresponda:

- a) Propiedades físico-químicas de los sistemas PE:ATM en desarrollo: pH, potencial Z (ζ), osmolaridad, etc en dispersiones acuosas,

- b) Interacción iónica PE:F (EuE-VAN) en dispersiones acuosas y estado sólido,
- c) Estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN,
- 3- Evaluar la eficacia antimicrobiana de sistemas EuE-VAN frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*, sensibles y resistentes a antimicrobianos, en estado planctónico.
- 4- Estudiar el efecto del polímero catiónico, EuE sobre suspensiones bacterianas (células planctónicas) que contribuyan a modificar la eficacia de los ATM:
 - a) Sensibilización a agentes líticos,
 - b) Capacidad de desarrollo en medios nutritivos y en medios selectivos,
 - c) Alteraciones morfológicas y estructurales.
- 5- Estudiar el efecto del polímero catiónico, EuE sobre *P. aeruginosa* formando *biofilms*.
- 6- Completar estudios de los sistemas EuE-CIP, evaluando su eficacia para inhibir la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* o producir disrupción de *biofilms* maduros.

Esta tesis doctoral se encuentra enmarcada en un proyecto de diseño y evaluación de nuevos sistemas farmacoterapéuticos destinados a la potencial aplicación en infecciones por vía tópica focalizando los estudios en el desarrollo de sistemas PE:ATM de potencial utilización para el tratamiento de infecciones tópicas para las cuales no se dispone de formulaciones adecuadas, tales como las queratitis bacterianas, para la cual actualmente se usan reformulaciones de inyectables de ATM seleccionados (“fortificados”) y se combinan al menos dos ATM para ampliar el espectro. Adicionalmente, podrían ser destinados a otras infecciones que requieran administración de ATM por vía tópica.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS



CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Polímero

Se utilizó Eudragit E 100 ® (EuE), Poli(butil metacrilato), (2,dimetilaminoetil) metacrilato, metilmetacrilato) (Alemania, Röhm Pharma Polymers, lote G030131033) en proporciones 1:2:1, copolímero catiónico a base de metacrilato de dimetilaminoetilo y ésteres metacrílicos neutros (Figura 2.1). Este polímero ha sido aprobado para uso farmacéutico, y se lo utiliza para generar *films* destinados al recubrimiento de comprimidos, enmascarar sabores y olores desagradables, proteger de la luz y de la humedad⁷³. Desde hace algunos años, se está estudiando para su utilización como portador de fármacos en sistemas de liberación modificada para distintas vías de administración^{72,74,75,76,77}.

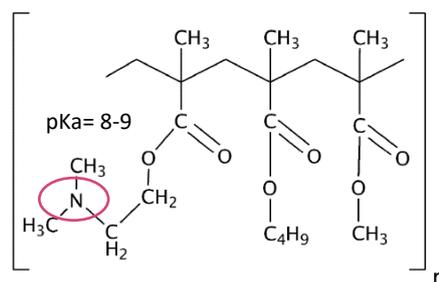


Figura 2.1. Monómero de Eudragit E100. Se destaca el grupo dimetilamino con su valor de pKa, importante para el diseño de sistemas portadores PE:F

Tabla 2.1. Características físico-químicas de Eudragit E.

Características	EuE
PM	Aproximadamente 150000 D
Número CAS	24938-16-7
Apariencia	Gránulos incoloros amarillentos, con característico olor a aminas
PKa	8,4 (grupo dimetilamina)
Punto de fusión	No funde, descompone en 303,82 °C.
Solubilidad	Soluble en fluido gástrico y soluciones ácidas pH<5, acetona, alcoholes, etil acetato. Insoluble en agua y éter de petróleo.
Estabilidad	Es un sólido estable (mínimo 36 meses ⁷³) y permanece estable como dispersión acuosa.

2.1.2 Antimicrobianos

2.1.2.1 Vancomicina

2.1.2.1.1 Estructura química

Es un antimicrobiano (ATM) de la familia de los glucopéptidos. Se obtuvo de *Streptomyces orientalis* en 1956.

La estructura química de VAN (Figura 2.2) consta de un disacárido (vancosamina y glucosa), dos unidades hidroxilclorotirosina, tres sistemas fenilglicina sustituidos, N-metil-leucina y la amida del ácido aspártico; todos estos componentes están unidos por una cadena peptídica de siete miembros. Es una molécula con varios grupos ionizables. Los más importantes se indican en la Figura 2.2 con los valores de pKa correspondientes.

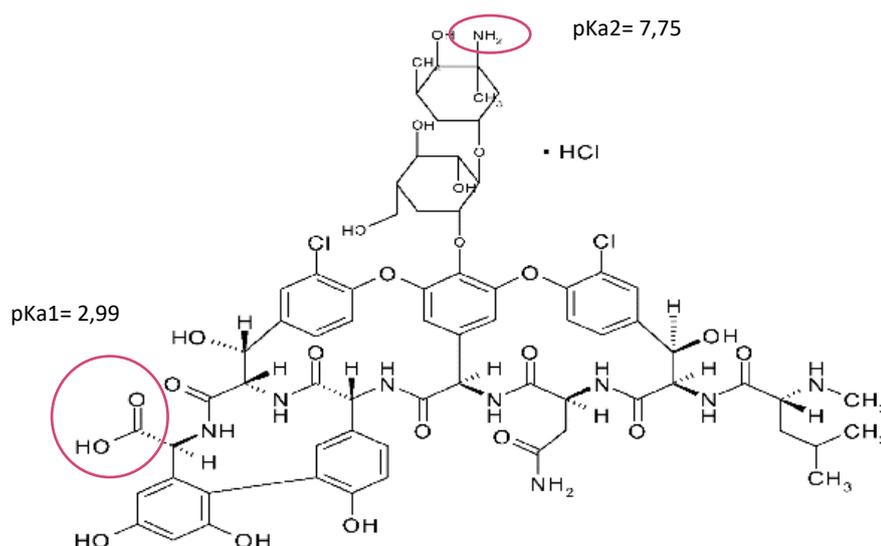


Figura 2.2. Estructura química de clorhidrato de vancomicina. Se destacan los grupos funcionales de posible interacción con polielectrolitos de carga opuesta, con sus respectivos valores de pKa.

2.1.2.1.2 Características físico químicas

De fuentes comerciales se obtiene como clorhidrato. Es un polvo blanco liofilizado que no funde, a 210°C cambia de color blanco a marrón y es fácilmente soluble en agua⁷⁸. Fue utilizada sin modificaciones para vehiculizarla en dispersiones acuosas de polímero catiónico.

2.1.2.1.3 Mecanismo de acción y resistencia bacteriana

La vancomicina inhibe la síntesis del peptidoglucano. Evita el proceso de polimerización necesario para que el complejo disacárido-pentapéptido se separe del fosfolípido de la membrana (Fig. 2.3)⁷⁹. Como consecuencia se acumula el intermediario lipídico unido a la membrana citoplasmática de la bacteria. Para inhibir la síntesis de la pared bacteriana, VAN forma complejos con las cadenas de péptidos que contienen D-alanil-D-alanina, evitando de esta forma la acción enzimática necesaria para que ocurra la polimerización. Además, altera la permeabilidad de la membrana e inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN). Desde su introducción en 1958 hasta hace unos pocos años no se habían descrito resistencias bacterianas a la vancomicina; sin embargo, su creciente utilización ha condicionado la aparición de las primeras bacterias resistentes a la misma, habiéndose demostrado su existencia en enterococos y estafilococos. La resistencia a la vancomicina, bien estudiada en enterococos, se produce como consecuencia de la síntesis de proteínas de membrana que transforman el terminal D-alanil D-alanina del pentapéptido en terminal D-alanil-D-lactato que no es reconocido por la vancomicina, impidiéndose de esta forma su unión. Estas proteínas al parecer actúan como carboxipeptidasas y, por lo tanto, producen la separación del terminal D-ala del pentapéptido, sitio de fijación de la vancomicina⁸⁰.

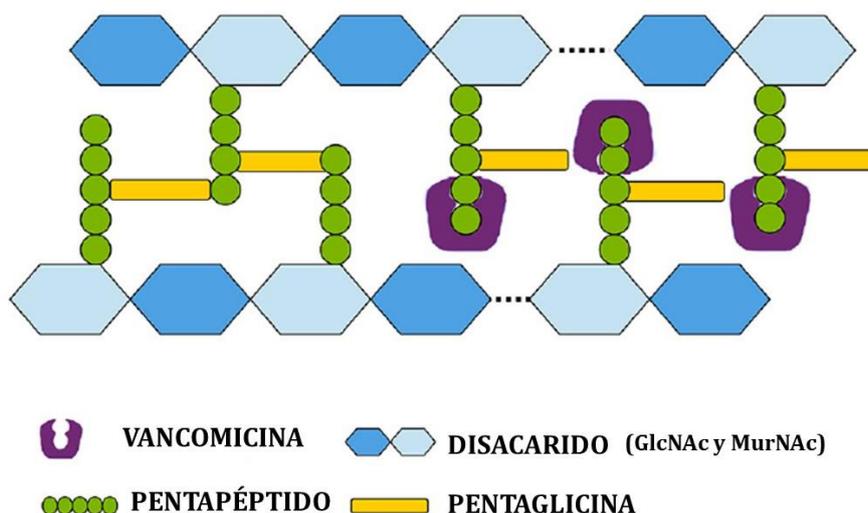


Figura 2.3. Mecanismo de acción de VAN en *S. aureus*. Al unirse a los restos C-terminal D-Ala-D-Ala del pentapéptido, VAN inhibe la formación de puente cruzado entre pentapéptido y pentaglicina. GlcNAc, N-acetilglucosamina; MurNAc, ácido N-acetilmurámico. Esquema adaptado de ref ⁷⁹.



2.1.2.1.4 Espectro antibacteriano

Activa frente a bacterias Gram positivas. Son sensibles *S. aureus*, incluso resistente a meticilina, y *S. epidermidis*. El *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) define como sensibles a los aislamientos de *S.aureus* con una CIM para vancomicina de $\leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y como no sensibles a los aislamientos que presentan una CIM $>2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Los aislamientos de *S. aureus* con una CIM de entre 4 y $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se consideran como de sensibilidad intermedia a la vancomicina (VISA) y aquellos con una CIM $\geq 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como resistentes (VRSA)⁸¹.

Está indicada para el tratamiento de infecciones graves por estafilococos y otros microorganismos Gram positivos. La VAN generalmente se recomienda para infecciones complicadas de las articulaciones y los huesos del torrente sanguíneo, de la piel, la meningitis producida por *Staphylococcus aureus* y la endocarditis^{82,83}.

Es un antibiótico de elección en infecciones graves por *S. aureus* resistente a meticilina, penicilinas isoxazólicas y cefalosporinas de primera generación.

Es también fármaco de elección en las infecciones por *S. epidermidis*, en general menos sensible a las penicilinas isoxazólicas y a la meticilina. En los pacientes alérgicos a las penicilinas, la VAN es el fármaco de elección tanto en infecciones por *S. aureus* como por *S. epidermidis*. Es también una alternativa válida en el tratamiento de la endocarditis estreptocócica, fundamentalmente por *E. faecalis*, y sobre todo en los pacientes alérgicos a las penicilinas. Además, la vancomicina está indicada en el tratamiento de la endocarditis por *Corynebacterium* y en las meningitis por *Flavobacterium meningosepticum*. En este último caso hay que considerar la necesidad de administrar la vancomicina por vía intratecal si la respuesta terapéutica a la administración intravenosa es escasa. En el tratamiento de la colitis pseudomembranosa por *C. difficile* en pacientes graves, la vancomicina debe administrarse por vía oral^{84,85,86,87,88,89}.

Otros procesos infecciosos en los que se utiliza VAN es en el tratamiento tópico para queratitis bacteriana en combinación con otros ATM. Esto se debe a su eficacia frente a Gram positivos y por esa razón, se la combina con otros ATM³⁵.

2.1.2.2. Ciprofloxacino

2.1.2.2.1 Estructura química

Es una fluoroquinolona de segunda generación aprobada en terapéutica por la FDA en 1987 para uso oral, mientras que las pomadas y soluciones oftálmicas para el tratamiento de úlceras corneales y conjuntivitis bacteriana causadas por microorganismos sensibles fueron aprobadas en 1998 y 1999, respectivamente. Es una molécula que posee grupos ionizables (Figura 2.4) que posee un sustituyente fluor en posición 6 y un sustituyente piperazinil en posición 7 del anillo quinolónico. También posee un grupo ciclopropilo en el nitrógeno 1⁶⁸. En la Figura 2.4 se muestran los valores de pKa de los grupos ionizables de la molécula.

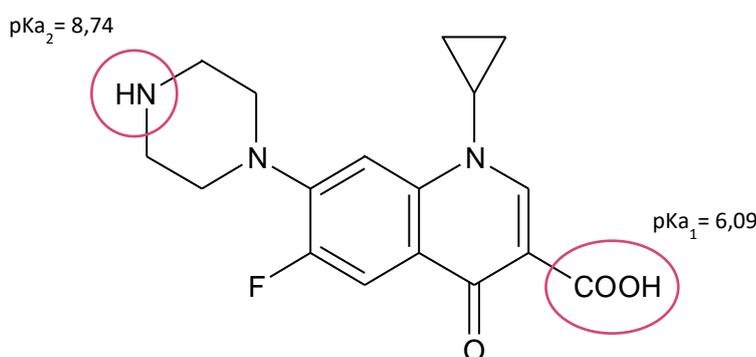


Figura 2.4. Estructura Química de CIP. Se destacan los grupos funcionales de posible interacción con polielectrolitos de carga opuesta, con sus respectivos valores de pKa.

2.1.2.1.2 Propiedades físico químicas

En su forma sólida se encuentra como un polvo cristalino amarillo pálido prácticamente insoluble en agua (300 mg.L⁻¹ a 20°C). Es termoresistente y estable a temperatura ambiente, funde a 255-257°C. Es fotosensible, inodoro, de sabor amargo, soluble en ácido clorhídrico diluido (0,1 N), prácticamente insoluble en etanol muy soluble en ácido acético glacial, poco soluble en cloroformo⁹⁰.

2.1.2.2.3 Mecanismo de acción y espectro antibacteriano

Ciprofloxacino presenta un efecto bactericida. Penetra en la bacteria a través de las porinas, no afectando la integridad de la pared celular. Una vez dentro de la célula, actúa inhibiendo una enzima que prepara el ácido desoxirribonucleico (ADN)



para la transcripción, la ADN-girasa o Topoisomerasa IV. Esta enzima está compuesta de cuatro subunidades (dos subunidades A y dos B) y es la responsable del enrollamiento de las cadenas de ADN; es también responsable de otras actividades necesarias para la integridad del ADN, como son la unión y separación de las cadenas que lo componen y la hidrólisis del ATP, que por lo tanto también serán alteradas⁹¹.

Con la comercialización y el uso no racional de CIP se ha observado un notable incremento de las resistencias⁸⁰, especialmente en bacilos Gram negativos^{92,93,94,95}. Esta situación obliga a considerar de forma muy rigurosa las indicaciones de este fármaco.

2.1.1 Microorganismos en estudio

Para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral se utilizaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*:

Para estudios de eficacia antimicrobiana *in vitro* se utilizaron:

- ✓ Un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas (*P. aeruginosa* FQ R1),
- ✓ Cepas de referencia, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PA014 y *S. aureus* ATCC 25923
- ✓ *P. aeruginosa* SCV (Variante de colonia pequeña, SCV, por sus siglas en inglés) con incrementada capacidad de desarrollar *biofilms*.
- ✓ Un aislamiento clínico de *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* MRSA 61.

Para estudios de selectividad frente a células procariotas y eucariotas:

- ✓ Aislamiento clínico de *C. albicans* (como modelo de célula eucariota).
- ✓ *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Se almacenaron a -20 ° C en solución fisiológica 0,9% estéril (SF) suplementado con glicerol al 10%. Cultivos frescos de *P. aeruginosa* FQ R1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se mantuvieron en agua estéril a temperatura ambiente.

2.2 METODOLOGÍAS

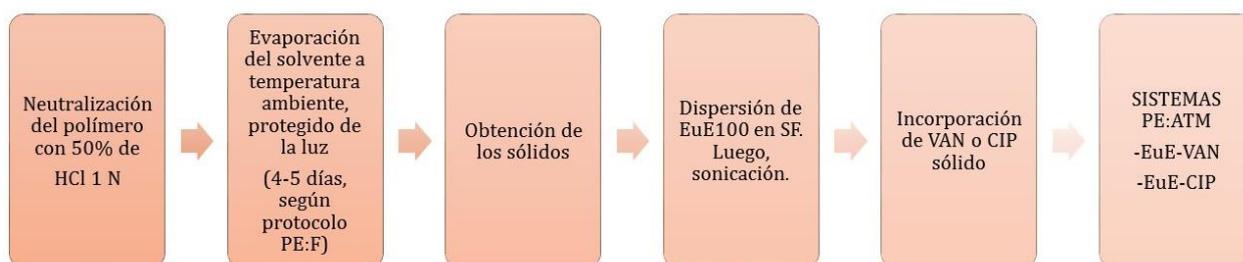
2.2.1 Preparación de los sistemas portadores PE:ATM

Los sistemas portadores PE:ATM se prepararon utilizando la plataforma tecnológica en desarrollo en nuestro laboratorio basada en la vehiculización de fármacos con grupos ionizables en dispersiones acuosas de polímeros con carga opuesta (polielectrolito).

El lote de EuE® utilizado posee $3,15 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$ de polímero, según determinación efectuada por potenciometría de barrido. La neutralización parcial de EuE con un contraión (Cl^-) permitió aumentar la compatibilidad acuosa de este polímero a $\text{pH}>5$. Las dispersiones de EuE fueron neutralizadas al 50% con HCl 1N (Anhedra, Argentina), luego se evaporó el solvente (protegido de la luz y la humedad)⁶⁹ y el sólido obtenido, EuECl se tamizó con el fin de obtener partículas homogéneas y de menor tamaño. Posteriormente, se almacenó al abrigo de la luz y la humedad, y se utilizó para preparar los sistemas portadores PE:ATM.

VAN y CIP clorhidrato (Lote 20030716), fueron utilizados sin modificaciones para vehiculizarse en dispersiones acuosas de EuE.

En el siguiente esquema se muestran las etapas de preparación teniendo en cuenta la plataforma tecnológica de nuestro grupo de investigación^{69,96,97}:



Los sistemas PE:ATM fueron preparados en distintas proporciones con el fin de ser caracterizados abordando diferentes aspectos, tal como se mencionó en el capítulo 1:

2) Caracterización físico química de los sistemas PE:ATM:

- a) Propiedades físico químicas (determinaciones de: pH, potencial ζ y osmolaridad): Para los sistemas constituidos por dispersiones acuosas de polímero neutralizado utilizados para vehiculizar VAN, se pesó EuECl para



obtener dispersiones acuosas de concentración final de 250 y 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Inicialmente, se disolvió EuECl en cantidad mínima de SF, luego, se adicionó una cantidad exactamente pesada de VAN de modo tal que la concentración final del fármaco fue 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y se completó el volumen para enrasar obteniendo sistemas EuE-Vancomicina, a los que en adelante se hará referencia como EuE-VAN.

En el caso de los sistemas EuE-CIP, se procedió de la misma manera que con EuE-VAN, utilizando cantidades de EuE y de CIP tal que las concentraciones finales en los sistemas EuE-CIP obtenidos sea: 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE, y 8 y 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CIP.

- b) Estudios en estado sólido, liofilización, desplazamiento de pH por intercambio iónico y Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT IR): Se disolvió EuE en cantidad mínima de SF. A esas dispersiones se les adicionó VAN para neutralizar un 10, 20, 30 y 40% de los equivalentes del polímero, obteniéndose sistemas traslúcidos de pH cercano a 6.
- c) Estudios de estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN: Se utilizaron los mismos sistemas descritos en el inciso (a).

3) Estudios de eficacia antimicrobiana *in vitro*:

- a) En *P. aeruginosa*: Se utilizaron los sistemas EuE tal como se describió en el inciso 2 (a).
- b) En *S. aureus*: Se preparó un stock de EuE-VAN pesando cantidades necesarias de EuE y de VAN tal que la concentración final fue: 2048 y 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, a partir del cual se efectuaron diluciones en SF suplementada con caldo Müller-Hinton 2% para evaluar un amplio rango de concentraciones de fármaco y de polímero.

5) Estudios en *biofilms* de *P. aeruginosa*: Se utilizaron los sistemas EuE-CIP preparados como se menciona en el inciso 2 (a) para complementar estudios previos en nuestro grupo de investigación⁶⁹.

2.2.2 Caracterización físico-química de los sistemas PE:ATM

2.2.2.1 Determinación de pH

Para la determinación del pH de los sistemas PE:ATM se utilizó un pHmetro Mettler Toledo, modelo Seven Multi acoplado a un electrodo TG 115-SC, destinado a la medición general de pH.

2.2.2.2 Determinación de Potencial electrocinético (ζ)

Para la medición del ζ de los sistemas PE:ATM se utilizó un aparato para la espectroscopía de correlación fotónica y microelectroforesis (estándar de transferencia de potencial Malvern Zeta DTS1235). Este sistema (zetazizer Nano software versión 5.0) mide el potencial zeta, usando la dispersión de luz electroforética, y el peso molecular, usando la dispersión de luz estática. Cada muestra se analizó por triplicado a 25°C, permitiendo que el instrumento optimice automáticamente la intensidad de la señal de cada una.

2.2.2.3 Determinación de osmolaridad

Para las determinaciones de osmolaridad de los sistemas PE:ATM se utilizó un Osmómetro Multi VAPRO Modelo 5600, utilizando como referencia una solución de NaCl al 0,9% (300 mmol.kg⁻¹). Cada muestra se analizó por triplicado (n = 3).

2.2.2.4 Determinación de viscosidad.

Se realizaron determinaciones de viscosidad en los sistemas EuE-VAN (250 y 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE, y 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VAN) utilizando como viscosantes a: propilenglicol (PPG) y polietilenglicol 400 (PEG400) al 1 y al 10% p/v con un Reometro Rheoplus MCR 301. Los estudios se realizaron utilizando una geometría cono plato (CP50-1) con un diámetro de 49,956 mm, un ángulo de cono de 1,006 y un truncamiento de 50 μM . Las mediciones en el estado estacionario se llevaron a cabo en el rango de velocidad de corte de 0,001-10.000 s⁻¹.

2.2.2.5 Desplazamiento de pH por intercambio iónico

El efecto de la adición de una sal neutra sobre el equilibrio iónico en las dispersiones de los sistemas PE:F fue evaluado mediante la titulación de EuE-VAN_{40%} (11,11 mg.mL⁻¹, siendo 40, el porcentaje de fármaco que neutraliza los equivalentes de polímero) con NaCl 0,37% p/v. Se registró el pH de la dispersión y se graficaron



estos valores en función del porcentaje de titulante (Cl⁻) agregado. El % de Cl⁻ se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Cl = \frac{\text{titulante agregado}(\text{equivalentes de Cl}) \times 100}{\text{equivalentes de EuE totales}}$$

2.2.2.6 Estabilidad química de VAN en los Sistemas EuE-VAN

Estos estudios se realizaron en colaboración con las Dras. Marcela Longui y Vanesa Sterren, en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, UNITEFA, CONICET.

Se adaptó y validó un método de cromatografía líquida de alta resolución, High Performance Liquid Chromatography (HPLC, por sus siglas en inglés)⁹⁸.

2.2.2.7.1 Validación del método analítico

Inicialmente se determinaron los parámetros: exactitud, precisión y linealidad del método, utilizando las siguientes condiciones experimentales:

- ✓ Columna: C₁₈
- ✓ Fase móvil: Buffer fosfato monobásico de amonio pH= 4, acetonitrilo (92:8)
- ✓ Flujo: 1 mL.min⁻¹
- ✓ Temperatura: 25°C
- ✓ Longitud de onda: 220 nm

También se realizaron ensayos de degradación forzada en distintas condiciones: térmico (40°C), básicas (NaOH, 0,1M), ácidas (HCl, 0,1M) y oxidativas (H₂O₂ 10 vol) con el objetivo de verificar que los productos de degradación no interfirieran con la cuantificación del F.

2.2.2.7.2 Ensayo de estabilidad

Se realizó el ensayo de estabilidad de EuE-VAN. Los sistemas se prepararon utilizando la plataforma tecnológica PE:F, tal como se menciona en el ítem 2.2.1, y luego, se colocaron en un gabinete de estabilidad con temperatura controlada a 25°C

y en heladera a 4°C. Se extrajeron muestras por triplicado a distintos tiempos. Se cuantificaron por el método validado de HPLC.

2.2.2.7 Liofilización de los sistemas EuE-VAN

Se prepararon los sistemas EuE-VAN_{10%}, EuE-VAN_{20%}, EuE-VAN_{30%} y EuE-VAN_{40%}, siguiendo la metodología mencionada anteriormente en el ítem 2.2.1, donde 10, 20, 30 y 40 % corresponden al porcentaje de equivalentes de polímero neutralizados con VAN. Adicionalmente, se evaluó el pH de los mismos. Los sistemas EuE-VAN se liofilizaron en Liofilizador Labconco Freezone 6 a una temperatura de -45°C y con alto vacío.

Por otra parte, los sistemas liofilizados fueron reconstituidos en agua estéril y se les midió el pH post reconstitución, y de manera adicional se realizó una inspección visual del aspecto físico de los mismos.

2.2.2.8 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Se tomó una alícuota de los sistemas EuE-VAN preparados y liofilizados como se indica en 2.2.2.7. Se prepararon pastillas de KBr (150 mg) con muestras al 1% (alícuota de EuE-VAN_{10,20,30} y 40 %). Las mismas se realizaron en prensa hidráulica con una fuerza de compresión de 10 toneladas). A los fines comparativos se analizaron por FT-IR muestras formadas por la mezcla física (MF) de los componentes de los sistemas portadores en evaluación, así como los de EuE y VAN por separado. Las muestras se recolectaron en un espectrómetro 360 FTIR ESP, Thermo Nicolet, Avatar y los datos fueron analizados utilizando el software OMNIC E.S.P.5.1.

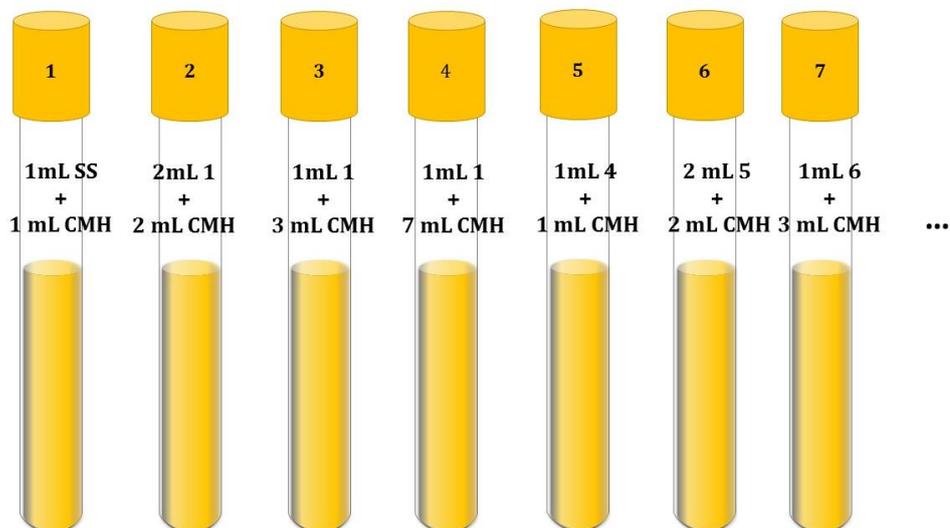
2.2.3 Experimentos destinados a evaluar la eficacia antimicrobiana *in vitro*

2.2.3.1 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)

Se realizó la determinación de CIM y CBM para vancomicina, Eudragit E y ciprofloxacino frente a cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Para la determinación de CIM se utilizó la técnica de macrodilución en caldo descripta en CLSI⁹⁹. Se utilizó Caldo Müeller Hinton (CMH, Britania, Argentina). A

partir de las soluciones stock (SS) del fármaco VAN, CIP o polímero en solución (EuE), se realizaron diluciones seriadas en CMH (factor 2) como se muestra en el siguiente esquema:



En tubos estériles se añadió 1 mL de cada dilución de ATM y 1 mL de inóculo estandarizado. La estandarización del inóculo se realizó a partir de un cultivo *overnight* (OVN) en Agar Müeller Hinton (AMH, Britania, Argentina) suspendiendo 4 o 5 colonias y ajustando la turbidez a la del estándar 0,5 en la escala de Mc Farland¹⁰⁰. El inóculo estandarizado se diluyó 1:200 en CMH para obtener aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de colonia. mL^{-1} (UFC. mL^{-1}) en cada tubo. Los tubos se incubaron 18-24 horas a 37°C. La CIM se determinó verificando la ausencia de turbidez a simple vista. Además, se incluyeron dos tubos controles, control positivo (1 mL de inóculo estandarizado + 1 mL de CMH) y control negativo (2 mL de CMH) para comprobar el proceso se realizó bajo condiciones asépticas.

Luego de la lectura de CIM, los tubos sin desarrollo bacteriano fueron procesados para determinar CBM. Con lo cual, se transfirió una alícuota con un ansa a placas con AMH y se incubaron a 37°C 18-24 h. Se consideró como valor de CBM a la menor dilución de ATM en la cual no se observó desarrollo microbiano⁹⁹.

2.2.3.2 Adecuación de condiciones experimentales para evaluar eficacia antimicrobiana

EuE precipita tras largos períodos de incubación en presencia de Caldo Müller-Hinton utilizado para diversas determinaciones de actividad antimicrobiana *in vitro*, motivo por el cual fue necesario definir otras condiciones para evaluar la eficacia antimicrobiana de los sistemas portadores en estudio.

Para ello, se determinaron las curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en SF adicionada con diversas proporciones de Caldo Müller Hinton mediante determinaciones de absorbancia a 600 nm a diferentes tiempos de incubación. Esto permitió seleccionar las condiciones adecuadas para diseñar los experimentos de cinética bactericida.

2.2.3.2. Cinéticas bactericidas de los sistemas EuE-VAN

Consiste en enfrentar un inóculo estandarizado a concentraciones fijas de ATM las cuales se incuban y a tiempos determinados se extraen alícuotas, se diluyen apropiadamente (factor 10) en SF y se siembran en placas de Agar Müller Hinton. En este caso, se evaluó la actividad antimicrobiana de EuE-VAN en: *P. aeruginosa* FQ R1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PA014 y *S. aureus* MRSA 61. A los fines comparativos, se evaluó simultáneamente la variación en el recuento de viables exhibido por suspensiones bacterianas tratadas con VAN libre en solución o con EuE.

Para la estandarización del inóculo, se utilizó un cultivo OVN en Agar Müller Hinton y se ajustó a una absorbancia entre 0,08-0,1 a una longitud de onda de 625 nm. Las concentraciones de polímero y fármaco evaluadas fueron las siguientes:

- ✓ Cepas de *P. aeruginosa*: VAN (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) , EuE (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y sus combinaciones en los sistemas EuE-VAN.
- ✓ Cepas de *S. aureus*: VAN (8,16,32 y 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), EuE (17,5 , 35, 70 y 140 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y sus combinaciones en los sistemas EuE-VAN.

Se usó un tubo de control del crecimiento bacteriano para verificar la viabilidad celular en estas condiciones experimentales.



Los cultivos se incubaron a 37°C en un baño termostatzado con agitación 40 rpm y se tomaron muestras (100 µL) periódicamente en distintos tiempos (0, 1, 3, 6 y 24 h).

A tiempo 0 se determinó el número de células viables en el tubo control, y en el resto de los tiempos estipulados se tomaron 100 µL de los diferentes tubos y se diluyeron con 900 µL de SF. Se realizaron diluciones decimales adicionales en solución fisiológica teniendo en cuenta el tiempo transcurrido y la concentración de ATM en los distintos tubos con el objetivo de obtener un número adecuado de colonias (30-300 colonias por placa).

Se inocularon 100 µL de cada dilución en placas de AMH con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Una vez alcanzado el tiempo de incubación necesario, se realizó el recuento de UFC en cada placa. Para calcular el número de colonias UFC.mL⁻¹ remanentes luego de cada tratamiento se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ}\text{UFC.mL}^{-1} = \text{recuento} \times 10 \times \text{dil}$$

dónde:

Nº UFC.mL⁻¹: el número de UFC por mililitros detectadas a un tiempo determinado luego de cada tratamiento.

10: factor para expresar en mililitros el resultado teniendo en cuenta que se siembra 100 µL en cada placa.

dil: dilución decimal realizada a la alícuota extraída de cada tratamiento, a un tiempo determinado.

Los resultados informados surgen de promediar los valores obtenidos en al menos dos experimentos realizados por duplicado en diferentes días.

2.2.3.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

A partir de un cultivo OVN de *P. aeruginosa* FQ R1 y *S. aureus* ATCC 25923 se realizó una suspensión densa en solución fisiológica de modo que la concentración final de bacterias fue 40 mg.mL⁻¹. Se utilizaron como tratamientos: EuE (250 µg.mL⁻¹), VAN (1000 µg.mL⁻¹) y EuE/VAN (250/1000 µg.mL⁻¹) para *P. aeruginosa* FQ R1 y

EuE ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y EuE/VAN ($20/8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para *S. aureus* ATCC 25923. Se utilizó un tubo control de crecimiento para verificar la viabilidad celular en esas condiciones experimentales. Las muestras se incubaron durante 3 h en un baño termostático a 37°C con agitación y se tomaron alícuotas de $500 \mu\text{L}$ a 3 h de exposición que fueron centrifugadas 2 min a 8000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* obtenido con *buffer* fosfato 50 mM pH= 7,4.

El *pellet* se lavó dos veces con *buffer* fosfato y se fijó con una mezcla de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en *buffer* de cacodilato 0,1 M (2 h a temperatura ambiente). Luego, se lavaron tres veces con *buffer* de cacodilato y se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% y luego se realizó un lavado con agua destilada durante 2 h a temperatura ambiente. Las células se deshidrataron con gradientes de acetona y se realizó la inclusión de las mismas en resina epoxi Araldite a 60°C durante 72 h. Las secciones delgadas (80-100 nm de ancho) se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Jeol Jum-7. Las muestras teñidas con acetato de uranilo en solución de acetona (2 min) y citrato de plomo (2 min) se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión LEO 906 E a un voltaje operativo de 80 kV. Las imágenes se capturaron con una cámara MegaView III.

2.2.3.4 Microscopía de Fluorescencia

Se utilizó una sonda fluorescente VANCOMYCIN, BODIPY™ Conjugate FL (Bodipy FL VAN) (TERMOFISHER, Argentina) a una concentración de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Excitación: 480-500 nm, emisión: 509-547 nm). Las suspensiones bacterianas de 1×10^8 células. mL^{-1} fueron preparadas en SF partiendo de cultivos OVN de *P. aeruginosa* FQ R1 y *S.aureus* ATCC 25923 en Agar Müeller Hinton. Estos inóculos fueron incubados en presencia de EuE-VAN/ Bodipy FL VAN ($250-999,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN no fluorescente ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN/Bodipy FL VAN ($999,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y EuE ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para *S.aureus* se utilizaron los siguientes tratamientos: EuE ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN no fluorescente ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN/Bodipy FL VAN ($1,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EuE-VAN/Bodipy FL VAN ($20-1,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), VAN/Bodipy FL VAN ($7,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y EuE-VAN/Bodipy FL VAN ($20-7,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Todas las muestras fueron incubadas a 37°C con agitación constante (40 rpm). Luego de 1 h de exposición, se tomaron alícuotas de $500 \mu\text{L}$ y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min. Los *pellets* obtenidos fueron extendidos en portaobjetos con cubreobjetos para su posterior análisis en un



microscopio Confocal-Olympus FV1200. Las imágenes fueron capturadas utilizando una lente 60X PLAPON (inmersión en aceite) con una apertura numérica de 1,42 NA y un barrido sobre la muestra utilizando un láser de 488 nm para la excitación de Bodipy FL VAN. Posteriormente, la fluorescencia fue recogida en el rango de 500-545 nm. El campo observado fue de 34,8x34,8 μm^2 aproximadamente, con una resolución de píxeles de 34 nm. El mismo láser fue utilizado para generar la imagen de transmisión (campo claro) teniendo en cuenta la selección del prisma, el polarizador y el analizador necesarios para obtener la imagen de contraste de interferencia diferencial.

2.2.4 Efecto del polímero catiónico en la integridad de células microbianas: Sensibilización a agentes líticos

Suspensiones de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 estandarizadas ($\text{Abs}_{630\text{nm}} = 0,500$) y de *Candida albicans* ($\text{Abs}_{530\text{nm}} = 0,500$), se expusieron a varias concentraciones de EuE y tiempos de contacto. Luego de 10 minutos fueron centrifugadas (8000 rpm - 2 min) y resuspendidas en soluciones de los agentes líticos (dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% y 1%, y Tritón 1%). Después de 4 min se determinó la absorbancia a 420 nm para *P. aeruginosa* y a 530 nm para *C. albicans*.

2.2.4.1 Efecto del polímero catiónico en la capacidad de desarrollo de los microorganismos en medios de cultivo nutritivos y en medios selectivos

Suspensiones de *P. aeruginosa* ATCC 27853 estandarizadas, fueron tratadas con dispersiones del polímero catiónico a concentraciones y tiempos pre-definidos, luego, fueron procesadas para recuento en placa. Se extrajeron alícuotas que, previa dilución en SF estéril, se distribuyeron con espátula de Drigalsky en placas conteniendo Agar Müeller Hinton (Britania, Argentina) y otras con un medio selectivo para este microorganismo, Agar Cetrimide (Britania, Argentina). Luego de incubar 18-24 h a 37°C se realizó recuento de UFC que desarrollaron en cada uno. Controles sin tratamiento se procesaron en paralelo.

Las suspensiones estandarizadas de *Candida albicans* que se procesaron de manera similar a *P. aeruginosa*, pero se sembraron en agar Sabouraud.

2.2.5 Efecto del polímero catiónico EuE en células formando *biofilms*.

Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Andrea Smania y la Lic. en química Antonella Colque, perteneciente a CIQUIBIC-CONICET y Departamento de Química Biológica Ranwell Caputto de Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Inicialmente, se utilizó una variante de colonia pequeña (SCV) de *P. aeruginosa*, cepa que exhibe incrementada capacidad de formación de *biofilms*. Además, se iniciaron estudios con *P. aeruginosa* FQ-R1 ya utilizada en los estudios de cinética bactericida (sección 2.2.3.2.).

Para estos estudios se utilizó la metodología descrita por O'toole y Kolter (1998) de producción de *biofilms* en policubetas, con la adecuación de condiciones experimentales requeridas para nuestros ensayos¹⁰¹.

En primer lugar, se realizó la puesta a punto de la metodología y se evaluaron distintos medios para encontrar las condiciones en las cuales se formará *biofilm*, sin que EuE precipite. Para ello, se evaluaron distintos medios de cultivos, con el fin de lograr un buen desarrollo de *biofilm*: SF+CMH 5%, SF+CMH10% y CMH. A partir de un cultivo OVN de 18-24 h de incubación de *Pseudomonas aeruginosa* SCV y *Pseudomonas aeruginosa* FQ R1 en AMH, se ajustó a una cantidad de células de 1×10^6 células.mL⁻¹ y se sembraron 100 μ L en cada pocillo. Las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 48 h. Una vez alcanzado el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con SF. Luego se añadieron 150 μ L de cristal violeta (CV) 0,1 % con el fin de teñir el *biofilm* durante 15 min. A continuación, se lavó dos veces con SF y se resuspendió el CV con etanol 96% durante 15 min. Por último, se cuantificó el colorante adherido a las células a una densidad óptica (DO) a 595 nm utilizando un lector de ELISA.

Luego, se realizaron diferentes experimentos con objetivos distintos:

a) Evaluación del efecto de EuE y CIP en la inhibición de la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* SCV y *P. aeruginosa* FQ R1. En estos estudios, se utilizaron diferentes concentraciones de EuE (125 y 1000 μ g.mL⁻¹) y de CIP (64, 128, 1024 y 2048 μ g.mL⁻¹). Se evaluaron los efectos de EuE y de CIP por separado.



b) Evaluación del efecto de EuE y CIP sobre *biofilms* maduros de *P. aeruginosa* FQ R1. En estos estudios, se utilizó EuE ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y CIP (8, 64, 128, 1024 y 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). En primer lugar, se evaluaron los efectos de EuE y de CIP por separado.

c) Evaluación del efecto del sistema portador EuE-CIP sobre *biofilms* maduros de *P. aeruginosa*. A partir de los resultados obtenidos en b) se seleccionaron CIP 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (concentración 16 veces menor a la CIM) y 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (valor de CIM de esta cepa) para preparar sistemas EuE-CIP y evaluar su efecto en *biofilms* maduros de *P. aeruginosa* FQ R1.

El efecto de EuE sobre la formación de *biofilm* (a) fue determinado mediante el ensayo de CV, cuantificando la masa de *biofilm* por absorbancia a 550 nm. Se utilizó un cultivo OVN de 18-24 h de incubación en AMH de *P. aeruginosa* SCV y de *P. aeruginosa* FQ R1, se ajustó a una cantidad de células de 1×10^6 células. mL^{-1} y se sembraron 50 μL en cada pocillo. También se agregaron, en los pocillos correspondientes los distintos tratamientos (50 μL): EuE (125 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), CIP (64, 128, 1024, 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubaron durante 48 h en estufa a 37°C. En el caso de los controles positivos se añadió 50 μL de agua mili Q estéril. Una vez alcanzado el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con SF. Luego se añadieron 150 μL de CV 0,1 % con el fin de teñir el *biofilm* durante 15 min. Se lavó dos veces con SF y se resuspendió el CV con etanol 96% durante 15 min y se cuantificó el colorante adherido a las células a una $\text{DO}_{595\text{nm}}$ utilizando un lector de ELISA, Epoch™ Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Inc.

El efecto de EuE (b) y de los sistemas EuE-CIP (c) sobre *biofilms* maduros de *P. aeruginosa* fue evaluado mediante ensayo de XTT (Sigma aldrich, Alemania) (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazolio-5-carboxanilida) y la adición de un reactivo de acoplamiento de electrones, fenazina metasulfato (Sigma aldrich, Alemania) (PMS), cuantificando a 490 nm. XTT es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo que cuando se reduce se vuelve naranja brillante (Figura 2.5). Este cambio de color se logra rompiendo el anillo de tetrazolio cuaternario cargado positivamente. En presencia de células metabólicamente activas se forma un derivado de formazan, un compuesto coloreado, soluble en agua y que se cuantifica por espectrofotometría UV-Visible^{102,103}.

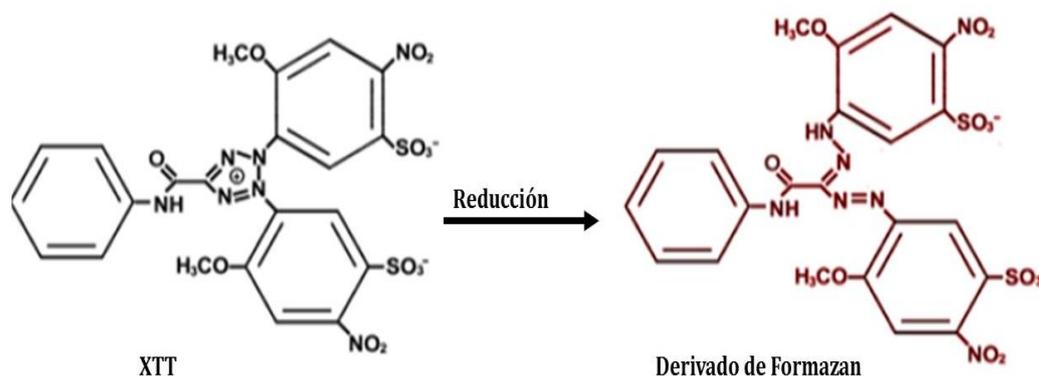


Figura 2.5. Reacción de reducción de XTT que forma el derivado de formazan (compuesto coloreado, hidrosoluble, se cuantifica por UV visible a 490 nm).

Se utilizó un cultivo OVN de 18-24 h de incubación en AMH de *P. aeruginosa* SCV y de *P. aeruginosa* FQ R1, se ajustó a una cantidad de células de 1×10^6 células.mL⁻¹ y se sembraron 100 μ L en cada pocillo y se incubaron durante 48 h en estufa a 37°C. Una vez alcanzado el período de incubación, se eliminó el sobrenadante con golpe seco y se realizaron 2 lavados con SF. Luego, se agregó 150 μ L de cada tratamiento por pocillo: EuE (125 y 1000 μ g.mL⁻¹), CIP (64, 128, 1024, 2048 μ g.mL⁻¹). En el caso de los controles en CMH, se agregaron 150 μ L de agua Mili Q estéril. En los controles negativos se agregó 150 μ L de cada tratamiento. Las placas se incubaron a 37°C 24 h. Luego del período de incubación, se eliminó el sobrenadante con golpe seco, se realizaron 2 lavados con SF. Por otro lado, se preparó la solución con XTT (Sigma Aldrich, Argentina) y PMS (Sigma Aldrich, Argentina) en *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) pH=7,4, de modo tal de obtener 200 μ g.mL⁻¹ de XTT y 20 μ g.mL⁻¹ de PMS. Posteriormente, se agregaron 150 μ L de la solución preparada anteriormente a cada pocillo y se protegió a la placa de la luz (envuelta en aluminio). Las placas se incubaron 3 h a 37°C en estufa. Finalmente, se cuantificó la absorbancia a 490 nm en lector de multiplacas.

En todos los casos se dejaron pocillos con inóculo bacteriano, sin tratamiento como control positivo y pocillos sólo con CMH (control negativo).

Los resultados se analizaron con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc). Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre los tratamientos. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

CAPÍTULO 3:
CARACTERIZACIÓN FÍSICO
QUÍMICA DE LOS SISTEMAS PE:ATM



CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS SISTEMAS PE:ATM

A partir de EuE, como polielectrolito catiónico, se prepararon los sistemas PE:ATM portadores de VAN y CIP, tal como se describió en el capítulo 2. En este capítulo, se presentan los resultados correspondientes a la caracterización físico química de sistemas PE:ATM obtenidos a partir de dispersiones acuosas del PE catiónico, EuE ® en las cuales se vehiculizó VAN (EuE-VAN) ó CIP (EuE-CIP). Los aspectos evaluados son los considerados relevantes para su potencial utilización en el diseño de nuevos sistemas farmacoterapéuticos para administración oftálmica.

Los sistemas EuE-VAN fueron diseñados, preparados y caracterizados totalmente en el marco de esta tesis. Por su parte, los sistemas EuE-CIP fueron preparados y caracterizados en este trabajo para complementar estudios previos⁶⁹, en particular, para evaluar su eficacia frente a *biofilms* de *P. aeruginosa*.

3.1 Características generales de los sistemas EuE-VAN y EuE-CIP

Las dispersiones acuosas de EuE cargadas con VAN y CIP son físicamente estables, y traslúcidas. Los valores de pH, potencial ζ y osmolaridad se muestran en la tabla 3.1.

Por un lado, los sistemas EuE-VAN poseen $\text{pH} > 6$ (Tabla 3.1). Estos resultados muestran una ventaja ya que, si se pensara en la utilización de los mismos en el diseño de formulaciones para la vía oftálmica, es relevante que el pH sea lo más próximo posible al del fluido lagrimal ($\text{pH} = 7,4$)¹⁰⁴. Además, VAN en solución posee un pH aproximadamente de 4, y en esas condiciones el proceso de desamidación (pérdida de estabilidad) es más rápido¹⁰⁵. Por este motivo, el pH de los sistemas EuE-VAN representa otra ventaja, ya que en estas condiciones se enlentece el proceso de desamidación de VAN y se prolonga la estabilidad de la misma.

Por otra parte, actualmente, CIP para administración oftálmica, se comercializa como solución, suspensión y ungüento. Éstos presentan una serie de incompatibilidades con la vía de administración, entre ellos pH ácido y precipitación en contacto con el fluido lagrimal, en el caso de las formulaciones líquidas¹⁰⁶. En este contexto, el pH de los sistemas EuE-CIP > 5 , presentan una ventaja respecto a los



colirios de CIP (pH aproximado de 4) que muestran incompatibilidad con la vía de administración.

Los sistemas EuE-VAN y EuE-CIP poseen un potencial electrocinético positivo mayor que los fármacos en solución. Las envolturas bacterianas poseen fundamentalmente cargas negativas, con lo cual un potencial electrocinético positivo de los sistemas, propiciaría mayor interacción de los mismos con estas envolturas¹⁰⁷. En ese sentido, estudios previos de nuestro grupo de investigación, demostraron que cultivos de *P. aeruginosa* y de *S. aureus* tratados con EuE (potencial-electrocinético positivo) mostraron cambio en signo y valor de potencial de la superficie bacteriana⁶⁹.

La osmolaridad del fluido lagrimal varía entre 280 y 293 mOsm.kg⁻¹, las soluciones con una osmolaridad inferior a 100 mOsm.kg⁻¹ o superior a 640 mOsm.kg⁻¹ pueden ocasionar irritación en el área ocular. Tanto las dispersiones EuE-VAN como las EuE-CIP fueron isosmóticas, Esta es otra propiedad deseada en el diseño de una formulación destinada a la vía oftálmica, para no generar incompatibilidades con la vía de administración¹⁰⁴.

Otro parámetro importante a considerar en el diseño de una formulación oftálmica es la viscosidad. Las formulaciones con viscosidad ligeramente alta (>20 cp) prolongan el tiempo de residencia en el tejido precorneal, mejorando la biodisponibilidad. Por el contrario, los sistemas excesivamente viscosos, pueden comprometer la comodidad ocular e incluso, impedir una instilación adecuada de la forma farmacéutica. La viscosidad ideal de una formulación oftálmica es aproximadamente 20 cp (mPa.s)¹⁰⁴. En la tabla 3.2, se muestran los valores de viscosidad obtenidos a diferentes velocidades de corte, con los valores de pH y potencial electrocinético (ζ) de los sistemas EuE-VAN con y sin el agregado de viscosantes¹⁰⁸. Los agentes viscosantes neutros (propilenglicol -PPG- y polietilenglicol 400 -PEG400-) fueron adicionados con el objetivo de otorgar viscosidad a los sistemas. Estos no generaron resultados esperados respecto a los valores de viscosidad. Adicionalmente, en algunas proporciones agregadas se modificaron los valores de pH de los sistemas originales (PEG 400 10%). Estos resultados son preliminares y requieren continuar con futuros estudios de preformulación, con el objetivo de aumentar la viscosidad para propiciar mayor tiempo de residencia de la formulación en el área ocular.

Tabla 3.1. Características físico químicas de los sistemas EuE-VAN y EuE-CIP en NaCl 0,9 % p/v.

Sistemas PE:ATM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	pH	Potencial Z (ζ)	Osmolaridad (mOsm.Kg^{-1})
EuE-VAN (250-1000)	6,7 \pm 0,1	+12,5 \pm 3,9	320
EuE-VAN (1000-1000)	6,6 \pm 0,1	+15,6 \pm 2,5	307
EuE (250)	6,8 \pm 0,2	+17,2 \pm 1,4	312
EuE (1000)	6,7 \pm 0,1	+30,7 \pm 6,1	319
VAN (1000)	4,2 \pm 0,02	+9,7 \pm 0,9	310
EuE-CIP (1000-8)	5,4 \pm 0,1	+39,0 \pm 8,4	299
EuE-CIP (1000-128)	5,4 \pm 0,1	+31,5 \pm 2,1	318
CIP (128)	4,6 \pm 0,05	+11,7 \pm 0,7	297
CIP (8)	4,4 \pm 0,1	+15,9 \pm 0,2	293

Tabla 3.2. Determinaciones de viscosidad de los sistemas EuE-VAN con PEG 400 y PPG y sin viscosantes.

Sistemas PE:ATM- Viscosantes ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)-%p/v	Viscosidad (cp) a 10 Hz	Viscosidad (cp) a 1 Hz	pH	Potencial Z (ζ)
EuE-VAN-PEG400 (250-1000-1)	0,9 \pm 0,01	12,1 \pm 0,1	5,5 \pm 0,1	28,4 \pm 1,1
EuE-VAN-PEG400 (250-1000-10)	1,09 \pm 0,2	7,7 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	41,9 \pm 0,9
EuE-VAN PEG400(1000-1000- 1%)	0,4 \pm 0,2	3,04 \pm 0,1	5,5 \pm 0,2	33,5 \pm 6,6
EuE-VAN- PEG400(1000-1000- 10%)	1,2 \pm 0,1	3,2 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2	37,5 \pm 2,1
EuE-VAN-PPG(250- 1000-1%)	1,7 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	5,4 \pm 0,01	36,9 \pm 3,04
EuE-VAN-PPG(250- 1000-10%)	4,7 \pm 0,1	55,1 \pm 0,02	4,9 \pm 0,05	29,9 \pm 1,9



EuE-VAN-PPG(1000-1000-1%)	0,9±0,2	4,9±0,1	5,4±0,2	35,8±7,2
EuE-VAN-PPG(1000-1000-10%)	2,9 ± 0,2	58,5±0,1	5,0±0,2	33,6±3,8
EuE-VAN(250-1000)	0,7±0,1	7,19±0,2	5,4±0,1	18,9±2,5
EuE-VAN(1000-1000)	1,4±0,1	4,06±0,2	5,8±0,1	20,5±1,1

3.2 Desplazamiento de pH por intercambio iónico

La titulación de la proporción de F que se encuentra asociado con el PE utilizando una sal neutra como el NaCl, es una metodología que ha sido utilizada en dispersiones PE:F⁹⁷.

Se observó un aumento de pH observado por la adición de NaCl a la dispersión de EuE-VAN_{40%} (Figura 3.2), esto se puede atribuir a la disociación de pares iónicos, con la captura de iones por parte del complejo desplazando el fármaco en su especie ionizada (VAN-COO⁻) y se explica en la ecuación 3.

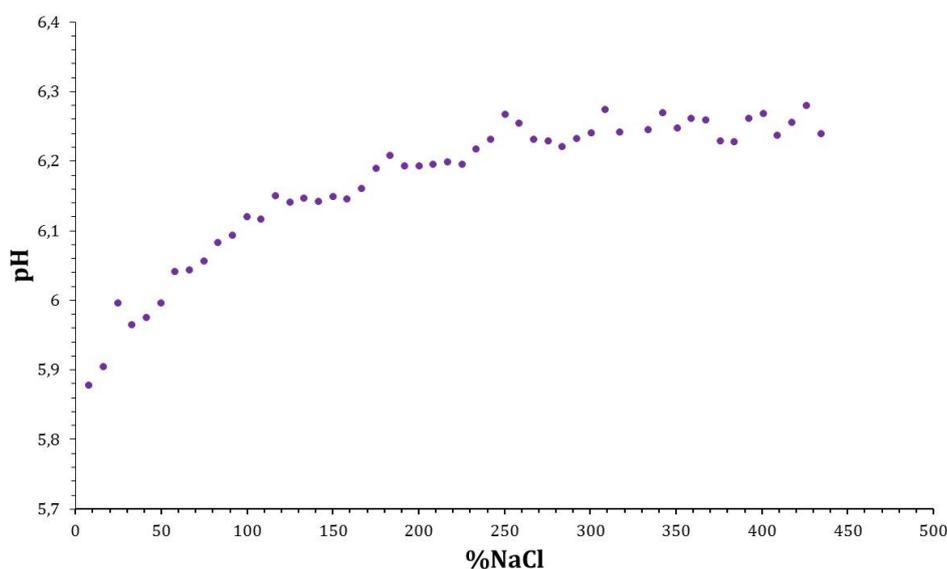


Figura 3.2 Cambio de pH de dispersiones acuosas del sistema EuE-VAN_{40%} debido al desplazamiento del F con NaCl 0,37% p/v.

Además, el desplazamiento de VAN acompañado como consecuencia del intercambio iónico está indicando la reversibilidad de la interacción PE:F, lo cual deja al fármaco libre para ejercer su acción antimicrobiana.

Ecuación 1-Plataforma tecnológica PE:F



Ecuación 2-Desplazamiento de VAN, disociación del par iónico



Ecuación 3-Aumento de pH



Cabe destacar que estas condiciones experimentales para medir el desplazamiento de pH por intercambio iónico, son probablemente diferentes a las que ocurriría en fluido lagrimal, con lo cual amerita a futuros estudios.

3.3 Estudio de estabilidad de los sistemas EuE-VAN

La calidad, seguridad y efectividad deben estar diseñadas y controladas en todas las etapas de desarrollo del medicamento. Desde la formulación y en cada etapa de la elaboración se debe garantizar un producto estable. Según la ICH (International Conference of Harmonisation), el propósito de un estudio de estabilidad es proveer evidencia de cómo la calidad de un IFA o de un producto farmacéutico varía con el tiempo, proponer el envase, las condiciones de conservación y establecer el período de vida útil durante el cual se mantienen los parámetros químicos, físicos y microbiológicos prefijados en el diseño del producto farmacéutico y determinados en la liberación del mismo¹⁰⁹.

Los estudios de estabilidad pueden considerarse como un componente integral del desarrollo de un IFA. Describe parámetros esenciales que indican la fecha de vencimiento de un medicamento. La estabilidad física y química de los IFA en las



etapas de formulación preclínica, durante el desarrollo del fármaco y el proceso de desarrollo del envasado, son los factores críticos a controlar¹¹⁰.

Uno de los principios básicos del diseño de formas farmacéuticas consiste en garantizar el mantenimiento de la integridad del fármaco durante la vida útil de la formulación. El término inestabilidad usualmente se aplica a reacciones químicas de carácter irreversible, que pueden dar como resultado entidades químicas diferentes y terapéuticamente inactivas como son los productos de degradación. Los estudios de estabilidad de IFAs inestables son considerados importantes para propiciar una administración segura y eficaz al paciente. La estabilidad de un fármaco puede definirse entonces como la capacidad del mismo para mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas¹¹¹.

El parámetro $t_{90\%}$ (tiempo de vida útil) se define como el tiempo necesario para que la concentración del principio activo de la formulación se reduzca en un 10% de la concentración inicial. Con este tiempo se calcula en cierto modo el período de eficacia de un medicamento, ya que por lo general, la mínima potencia aceptada es el 90% de la cantidad declarada, considerando que no se produzcan degradaciones físicas importantes ni que se originen productos que aumenten la toxicidad⁹⁹.

El método HPLC adaptado, implementado y validado resultó lineal ($R^2=0,992$) en el rango de concentraciones utilizadas, la recuperación media fue 99,75% y la desviación estándar relativa (RSD) fue menor al 2% en todos los niveles analizados, demostrando que el método es exacto y preciso bajo las condiciones ensayadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4.

Por otro lado, mediante estudios de degradación forzada se probó la especificidad del método en presencia de potenciales impurezas o productos de degradación que puedan generarse durante el estudio de estabilidad. Bajo todas las condiciones de estrés ensayadas (estrés térmico, ácido, básico y oxidativo), los productos de degradación presentaron un tiempo de retención menor que el característico de VAN, cuya señal se encontró bien resuelta para efectuar las determinaciones sin inconvenientes (Tabla 3.5).

Tabla 3.4 Validación del método analítico de HPLC.

Parámetro	Criterio	Valor obtenido	Criterio de aceptación
Exactitud	%Recuperación media	99,75 %	98-102%
Precisión	RSD	Para 80-100 y 120%: 1,8-0,85 y 0,98	Menor al 2%
Linealidad	R ²	0,992	Mayor a 0,99
Ecuación de la recta	$y = 31,28 x - 18,69$		

Tabla 3.5. Estudios de degradación forzada de VAN en diferentes condiciones de estrés

Condición de estrés	Concentración VAN ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Degradación	Número de productos de degradación y tiempo de retención (min)
Térmico (40°C)	28,5 ± 0,5	5	2 (1,8; 5,5)
Ácido (HCl 0,1 M)	20 ± 2	33	4 (1,8; 3,5; 6,5; 8,4)
Básico (NaOH 0,1 M)	10,6 ± 0,5	65	3 (1,8; 3,5; 8,4)
Oxidativo (H ₂ O ₂ 10 VOL)	25,0 ± 0,2	17	2 (1,8; 5,5)

La concentración de VAN en soluciones acuosas conservadas a 4°C y 25°C se redujo a menos del 90% a los 7 días y no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones de almacenamiento.

Por su parte, la concentración del ATM en los sistemas EuE-VAN permaneció por encima del 90% hasta 14 días.

La concentración de VAN en EuE-VAN, permaneció por encima del 90% luego de 10 días a 25°C y a 4°C para EuE (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)VAN y EuE (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)VAN



respectivamente. Se determinaron concentraciones ligeramente inferiores al 90% a los 14 días en ambos sistemas, condición indicada para finalizar el estudio de estabilidad. VAN libre en solución decayó al 85,48±0,05 % a 25°C y 88,99±4,61 % a 4°C con solo 7 días. Los resultados se muestran en la tabla 3.6 y en la Figura 3.1.

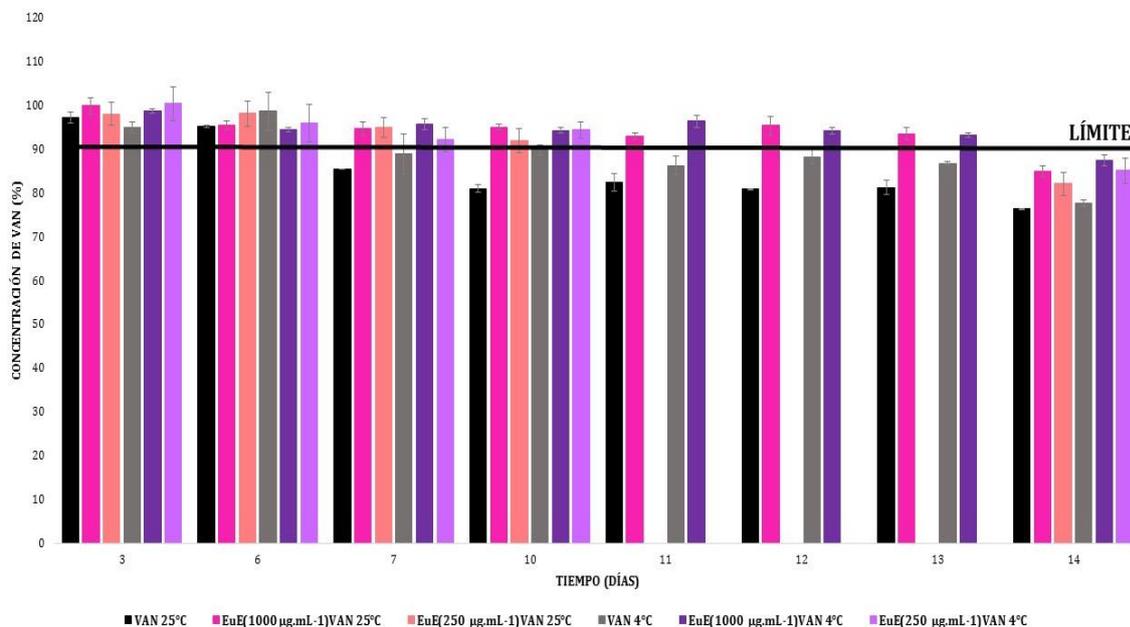


Figura 3.1 Concentración de VAN (%) en EuE-VAN y VAN en solución a 4°C y a 25°C hasta 14 días.

Tabla 3.6. Estudio de estabilidad de los sistemas EuE-VAN a 4°C y a 25°C hasta 14 días. Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía y post test de Dunn`s múltiple (p>0,5)

T (días)	Muestras					
	25 °C			4° C		
	VAN (1000 µg.mL ⁻¹ (pH= 4,17)	EuE-VAN 250-1000 µg.mL ⁻¹ (pH= 6.71)	EuE-VAN 1000-1000 µg.mL ⁻¹ (pH= 6.58)	VAN (1000 µg.mL ⁻¹ ¹ (pH= 4,17)	EuE-VAN 250-1000 µg.mL ⁻¹ ¹ (pH= 6.71)	EuE-VAN 1000-1000 µg.mL ⁻¹ (pH= 6.58)
0	100	100	100	100	100	100
3	97,2±1,2	98±2,7	99,9±1,9	92,9±2,2	100,4±3,9	98,8±0,5
6	95,3±0,3	98,1±2,8	95,5±0,9	98,6±4,4	95,9±4,2	94,4±0,5
7	85,5±0,1	94,9±2,3	94,7±1,6	88,9±4,6	92,2±2,8	95,8±1,2
10	81±0,9	92±2,8	95±0,6	89,9±1,2	94,4±1,9	94,4±0,7
11	82,3±2	n.d	93±0,8	86,3±2,1	n.d	96,5±1,4
12	80,9±01	n.d	95,4±2,1	88,3±1,7	n.d	94,2±0,7
13	81,2±1,6	n.d	93,6±1,4	86,8±0,4	n.d	93,3±0,5
14	76,4±0,1	82,2±2,6	85±1,3	77,7±0,8	85,1±2,9	87,5±1,3

Por bibliografía^{105,112}, se conoce que el proceso de degradación de VAN es la desamidación, ocurriendo a pH mayores a 2 y menores a 10. La desamidación de VAN en soluciones y formulaciones acuosas resulta en una inestabilidad considerable, por la formación de un producto de degradación que es un zwitterion, poco soluble en agua (imida cíclica intermedia). Por su parte, la reacción de desamidación es notablemente sensible al estado iónico de la molécula. El estado iónico de la VAN puede influir en la conformación de la molécula y, por lo tanto, afectar su reactividad. A pH= 4 la conformación compacta de VAN resulta en la rápida formación de imida cíclica intermedia, en tanto que a pH=9 la conformación expandida de la molécula produce la imida cíclica intermedia de forma más lenta¹¹². Se sabe que el pH de máxima estabilidad de VAN es aproximadamente, pH=5,5¹⁰⁵. Esto permite explicar el aumento de estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN, ya que poseen un pH aproximado a 6, que se acerca a la conformación de VAN expandida, y consecuentemente a la producción de imida cíclica intermedia más lenta que a pH=4.

Adicionalmente, tal como se menciona en el ítem 1.3 del capítulo 1, los fortificados antimicrobianos presentan problemas de inestabilidad acuosa; estudios de estabilidad de VAN observan concentraciones por debajo del 90% luego de 7 días a 25°C¹¹³. Hay antecedentes en nuestro grupo de investigación, de aumento de estabilidad de fármacos por estar vehiculizados en sistemas PE:F, en particular de polímeros aniónicos (Carbomer) vehiculizando azitromicina y procaína¹¹⁴. El aumento de estabilidad fue atribuido a la interacción ácido-base entre el polielectrolito y el grupo básico del fármaco. Dicha interacción produce una alta proporción de pares iónicos en los que las moléculas del fármaco permanecen asociadas al polímero¹¹⁴. Por lo tanto, estos antecedentes también podrían contribuir a explicar el aumento de estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN (sistemas PE:F).

La estabilidad ampliada de VAN en EuE-VAN a temperatura ambiente aseguraría su eficacia durante el período de tratamiento.

3.4 Liofilización de los sistemas EuE-VAN

Los sistemas EuE-VAN liofilizados se reconstituyen rápidamente en agua estéril con leve agitación manual, sin cambios aparentes luego de 7 días (soluciones traslucidas). Además, se determinaron los valores de pH pre y post proceso de liofilización los cuales se mantuvieron sin cambios (Tabla 3.3). Estos resultados son



prometedores ya que, como se mencionó en el capítulo 1, VAN presenta problemas de inestabilidad acuosa, y el proceso de liofilización constituye una posible solución.

Tabla 3.3. Determinaciones de pH de sistemas EuE-VAN antes y después del proceso de liofilización. Los sistemas EuE-VAN se reconstituyeron con agua estéril.

Sistemas PE:ATM	pH pre liofilización	pH post liofilización
EuE-VAN _{10%} (4000-1770 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,8 \pm 0,1	5,9 \pm 0,2
EuE-VAN _{20%} (4000-3540 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,5 \pm 0,2	5,6 \pm 0,3
EuE-VAN _{30%} (4000-5318 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,3 \pm 0,2	5,5 \pm 0,2
EuE-VAN _{40%} (4000-7091 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,1 \pm 0,01	5,2 \pm 0,1

3.5 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Con el fin de investigar la presencia de interacciones no covalentes (iónicas, puente hidrógeno) entre EuE y VAN se llevaron a cabo los espectros infrarrojo de los componentes puros (EuE y VAN), de la mezcla física (MF) y de una de las dispersiones (EuE-VAN_{40%}), Figura 3.1. La hipótesis de la formación de interacciones no covalentes en los sistemas PE:ATM se fundamenta en la estructura química del polímero y del fármaco y en antecedentes previos correspondientes a sistemas portadores PE:F^{67,69,97,115}.

EuE es una polibase fuerte que actúa como aceptora de protones. El pKa promedio del monómero básico es 8,4. VAN, presenta un grupo ácido carboxílico (pKa de 2,99) además de numerosos grupos funcionales.

Los espectros muestran un perfil de bandas correspondientes a los grupos funcionales presentes en cada una de las estructuras analizadas. Se destacan para EuE la banda a 3400 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace N-H y a 1700-1600 cm^{-1} la vibración de flexión N-H de los grupos NR_3H^+ , a 1450 cm^{-1} y a 1060 cm^{-1} el estiramiento C=O y C-O-C respectivamente, correspondientes a los grupos éster.

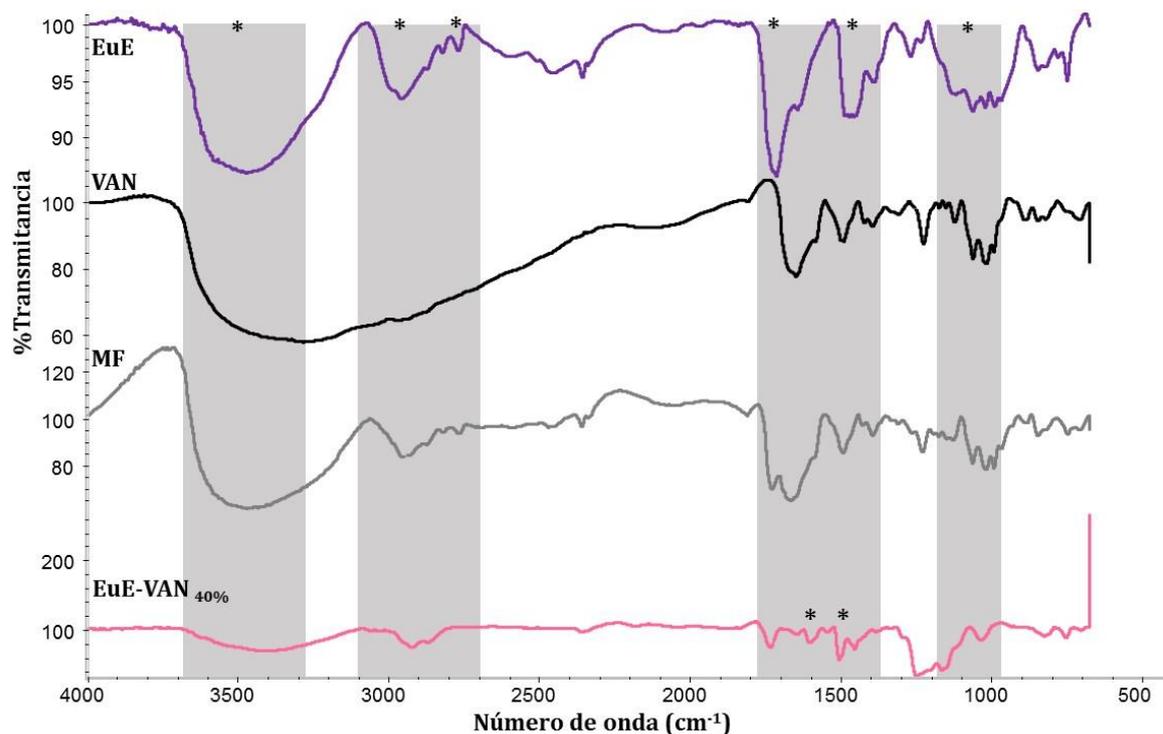


Figura 3.1. Espectroscopía infrarrojo con Transformada de Fourier (FT IR) de los sistemas EuE-VAN_{40%}, VAN, EuE y de la Mezcla física. Las bandas señadas en el grafico corresponden al estiramiento C-H del grupo dimetilamino de EuE (2770 y 2816 cm^{-1}), al grupo C=O del ester de EuE a 1713 cm^{-1} , estiramiento del -COOH a 1700 cm^{-1} , amidas características en VAN a 1400 cm^{-1} y estiramiento de C-O presentes en VAN a 1060 cm^{-1} .

Para VAN, se observa la banda a 3290 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión O-H y N-H superpuestas de los grupos ácido y amino, además de la vibración de estiramiento C=O a 1650 cm^{-1} y a 1125 cm^{-1} del enlace C-O-C, la banda a 1650-1500 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión N-H de los grupos amino presentes. En ambos espectros, se observan las correspondientes bandas de vibración de estiramiento C-H entre 2900 -3300 cm^{-1} de la cadena alifática.

Al comparar los espectros de los componentes puros con los correspondientes a la MF y a EuE-VAN_{40%}, se observan algunas diferencias significativas en la intensidad relativa y en la frecuencia de vibración de algunas de las bandas. Entre las cuales, es importante destacar una menor intensidad relativa entre la banda correspondiente a la vibración de tensión N-H del grupo amonio presente en EuE y O-H de los grupos ácido presentes en VAN (banda ancha a aproximadamente 3300 cm^{-1}) y las bandas correspondientes a la vibración de estiramiento C-H (2816 cm^{-1} y 2770 cm^{-1}) en el espectro de EuE-VAN_{40%} respecto a MF.



Por otra parte, en el espectro de EuE-VAN_{40%} se observa un desplazamiento en la banda de vibración correspondiente al enlace C=O de los grupos éster de EuE, de 1713 cm⁻¹ a 1650 cm⁻¹ y con menor intensidad relativa.

Además, las bandas de vibración características de amida secundaria, presentes en VAN alrededor de 1400 cm⁻¹, en el espectro de EuE-VAN_{40%} son poco visibles, mientras que se observan sin variaciones en el correspondiente a la MF. Del mismo modo, la banda de vibración C-O a 1060 cm⁻¹ presente en el espectro de VAN, se observa sin cambios en el espectro de la MF.

Si bien mediante esa metodología no es posible asegurar el tipo de interacción que puede establecerse entre el polímero y el fármaco, los resultados permiten predecir la existencia de algún tipo de interacción iónica (puente hidrógeno) sólo presentes en las dispersiones EuE-VAN y no así en las MF. Además, un análisis semejante llevado a cabo con otros sistemas portadores de EuE desarrollados en nuestro grupo de investigación, con fármacos de estructura química más sencilla que VAN, permitió arribar a conclusiones semejantes^{69,96,97,115}.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

La evaluación de los sistemas PE:ATM mediante las diferentes técnicas permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- ✓ Las dispersiones acuosas EuE-VAN y EuE-CIP son de fácil obtención, traslúcidas, con un pH cercano a la neutralidad, potencial electrocinético positivo y osmolaridad compatible con la vía oftálmica. Estas características físico químicas, hacen a estos sistemas propicios para el diseño de una formulación oftálmica (compatibilidad con la vía de administración) como preparación extemporánea porque se reconstituyen fácilmente y no presentan cambios en las propiedades físico químicas evaluadas.
- ✓ Si bien mediante FT IR no es posible asegurar el tipo de interacción que puede establecerse entre el polímero y el fármaco, los resultados permiten predecir la existencia de algún tipo de interacción iónica (puente hidrógeno) sólo presentes en las dispersiones EuE-VAN y no así en las MF. Además, un análisis semejante llevado a cabo con otros sistemas portadores de EuE desarrollados

en nuestro grupo de investigación, con fármacos de estructura química más sencilla que VAN, permitió arribar a conclusiones semejantes. Además, el aumento de pH por el agregado de una sal neutra (NaCl) al sistema EuE-VAN_{40%} podría dar indicios de la reversibilidad en la interacción entre el PE y el F (interacción iónica). Estudios adicionales podrán aportar claridad a este aspecto, pero escapa a los objetivos de esta tesis.

- ✓ El sistema EuE-VAN es más estable que VAN en solución bajo las condiciones evaluadas. La utilización de los sistemas EuE-VAN en el diseño de una formulación oftálmica disminuiría complicaciones y cuidados por parte del paciente ya que es estable a temperatura ambiente durante el período de tratamiento, y su eficacia no se encuentra alterada.

CAPÍTULO 4:
MODIFICACIÓN DE LA EFICACIA
DE VANCOMICINA EN LOS SISTEMAS
EuE-VAN



CAPÍTULO 4: MODIFICACIÓN DE LA EFICACIA DE VANCOMICINA EN LOS SISTEMAS EUE-VAN

Este capítulo está destinado al estudio de la influencia del polímero catiónico en los sistemas EuE-VAN sobre la eficacia antimicrobiana de VAN

4.1 Experimentos destinados a evaluar la eficacia antimicrobiana *in vitro*

4.1.1 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)

La CIM es la primera determinación que se realiza al evaluar la susceptibilidad de los microorganismos frente a un agente antimicrobiano. Se define como, la menor concentración de ATM necesaria para impedir el crecimiento visualmente discernible de una suspensión bacteriana en condiciones estandarizadas de densidad bacteriana, medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación⁹⁹. Complementariamente, se realiza la determinación de la CBM, la cual se define como la concentración mínima de un ATM necesario para lograr una reducción del 99,9% en las unidades formadoras de colonias viables de una suspensión bacteriana⁹⁹.

Para evaluar la eficacia de los sistemas PE:F, en esta tesis doctoral se utilizaron aislamientos clínicos, *P. aeruginosa* FQ R1 y *S. aureus* MRSA 61 y cepas de referencia, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PA01, como se indicó en el capítulo 2. Los agentes etiológicos seleccionados son frecuentes en infecciones oftálmicas, entre otras, y presentan resistencia a diversos ATM disponibles. Inicialmente, se caracterizaron respecto a la sensibilidad a VAN mediante la determinación de los valores de CIM y CBM. Los resultados se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1. CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) y CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de VAN y EuE frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*

*Observación: el valor es estimado debido a que el polímero precipita en altas concentraciones y prolongada incubación en medio de cultivo

Microorganismo	Vancomicina		EuE
	CIM	CBM	CIM*
<i>P. aeruginosa</i> FQ R1	1000	>4000	8000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4000	>4000	>8000
<i>P. aeruginosa</i> PA014	1000	>4000	>8000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	32	2048
<i>S. aureus</i> MRSA 61	2	Nd	Nd

El elevado valor de CIM de VAN frente a *P. aeruginosa* se corresponde con que las características estructurales de esta especie impiden a VAN acceder al sitio blanco de acción²⁰, razón por lo cual, VAN no está indicado para infecciones producidas por *P. aeruginosa*. Tal como se menciona en el capítulo 1, el espectro de VAN se limita a bacterias Gram positivas. Complementariamente, se muestran los valores de CIM y CBM para VAN y EuE usados en este estudio frente a un aislamiento clínico y una cepa estándar de laboratorio de *S. aureus*. En relación a los valores de CIM obtenidos para las cepas de *S. aureus*^{81,99}, se consideran sensibles a VAN (CIM < 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Otro fenómeno importante a considerar en *S. aureus* es la tolerancia a la acción de determinados antimicrobianos, particularmente a antibióticos betalactámicos y glucopéptidos¹¹⁶. La tolerancia a los antimicrobianos es definida como la capacidad de las bacterias para mostrarse sensible a la CIM del ATM, pero tiene mayor capacidad para sobrevivir en presencia del mismo, es decir, no sufre la acción bactericida (CBM) habitual. En consecuencia, una vez tolerante a la VAN, la bacteria podría permanecer viable en presencia del antimicrobiano *in vivo*, lo que conlleva un aumento en la CIM. Posteriormente, podría aumentar aún más sus niveles de resistencia y promover el crecimiento en el sitio de infección. Por lo tanto, la aparición de tolerancia podría considerarse uno de los primeros pasos en el desarrollo de las cepas VISA¹¹⁷. Respecto de a la CBM de *S. aureus* ATCC 25923, la relación CBM/CIM es 16. Cuando esta relación es \geq a 32 se habla de tolerancia a VAN¹¹⁶.

4.1.2 Cinética bactericida de sistemas EuE-VAN

4.1.2.1 Adecuación de condiciones experimentales para evaluar eficacia antimicrobiana.

Tal como se mencionó en el capítulo 2, EuE precipita tras largos períodos de incubación en Caldo Müller Hinton utilizado para diversas determinaciones de actividad antimicrobiana *in vitro*, motivo por el cual fue necesario definir otras condiciones para evaluar la eficacia antimicrobiana de los sistemas portadores en estudio.

En la Figura 4.1 se muestra la curva de *P. aeruginosa* FQ-R1 en: SF y SF suplementada con 2% de Caldo Müller Hinton (CMH) (SF+CMH 2%).

Se observó un mejor crecimiento de *P. aeruginosa* FQ-R1 en SF+CMH 2%, mientras permanece sin cambios en ausencia de medio de cultivo (SF) tal como se observa en la Figura 4.1. A mayores porcentajes de CMH agregado, el crecimiento fue inicialmente favorable, pero, luego de algunas horas de incubación se observó precipitación del polímero. Por lo expuesto, se seleccionó SF con 2% de CMH para efectuar los estudios de eficacia antimicrobiana de los sistemas preparados con EuE y VAN.

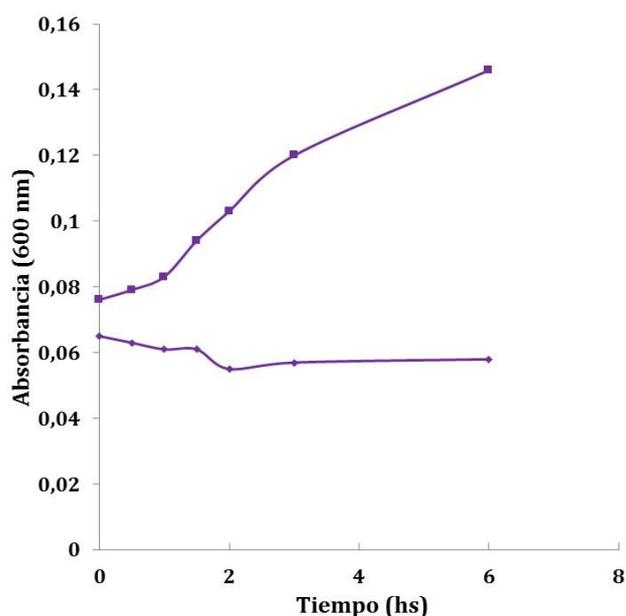


Figura 4.1 Crecimiento de *P. aeruginosa* FQ R1 en diversas condiciones: -

◆-SF; -■- SF adicionado con CMH al 2%



Experimentos comparativos de cinética bactericida de EuE-VAN utilizando cultivos de *P. aeruginosa* en diferente estado fisiológico (16-18 h de desarrollo vs otro reactivado en medio fresco durante 3-4 h) mostraron mayor eficacia del sistema portador en el último caso. Tal como se reporta en bibliografía, VAN ejerce su acción antimicrobiana cuando las bacterias están dividiéndose, y para ello sintetizan peptidoglucano. Esa sería la razón por la cual se observaron diferencias entre las 2 condiciones fisiológicas de los cultivos evaluados.

Las Figuras 4.2 y 4.3 se muestran las curvas de muerte para cepas de *P. aeruginosa* y *S.aureus* MRSA 61 respectivamente. En las tres cepas evaluadas de *P. aeruginosa* (Figura 4.2), los sistemas EuE-VAN evaluados, exhiben acción bactericida (reducción de > 3 log en recuento de viables) desde 1 h de exposición y se incrementa con el tiempo, produciendo erradicación bacteriana a las 24 h de exposición. VAN (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), exhibe un efecto tiempo dependiente pero no logra erradicación bacteriana a las 24 h de exposición en las tres cepas de *P. aeruginosa* estudiadas. Por su parte, cultivos tratados solo con EuE en las concentraciones evaluadas provoca una cierta injuria en las primeras horas de exposición, con distinta disminución en el recuento bacteriano, según la cepa, pero se recuperan completamente al prolongar el tiempo de exposición (24 h).

Con lo antes mencionado, se observó una potenciación de VAN en los sistemas EuE-VAN evaluados frente a *P. aeruginosa* FQ R1, y *P. aeruginosa* PA014 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 4.2 a, b y c respectivamente); VAN en la concentración evaluada (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), no exhibe acción bactericida frente a las cepas evaluadas de *P. aeruginosa*.

Vancomicina es un antimicrobiano de espectro restringido fundamentalmente a bacterias Gram positivas, tal como se mencionó en el capítulo 2, siendo de uso controlado.

La evaluación de los sistemas EuE-VAN frente a *S. aureus* MRSA 61 también evidencian potenciación, respecto al fármaco libre. La Figura 4.3 muestra la eficacia de EuE-VAN frente a MRSA 61, erradicando el inóculo en todo el rango de concentraciones evaluadas (8 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) luego de 24 h, mientras que VAN requiere concentraciones $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (16 x CIM) para erradicar (Figura 4.3 c y d). EuE genera

limitada reducción del recuento de MRSA 61 con paulatina recuperación tiempo-dependiente.

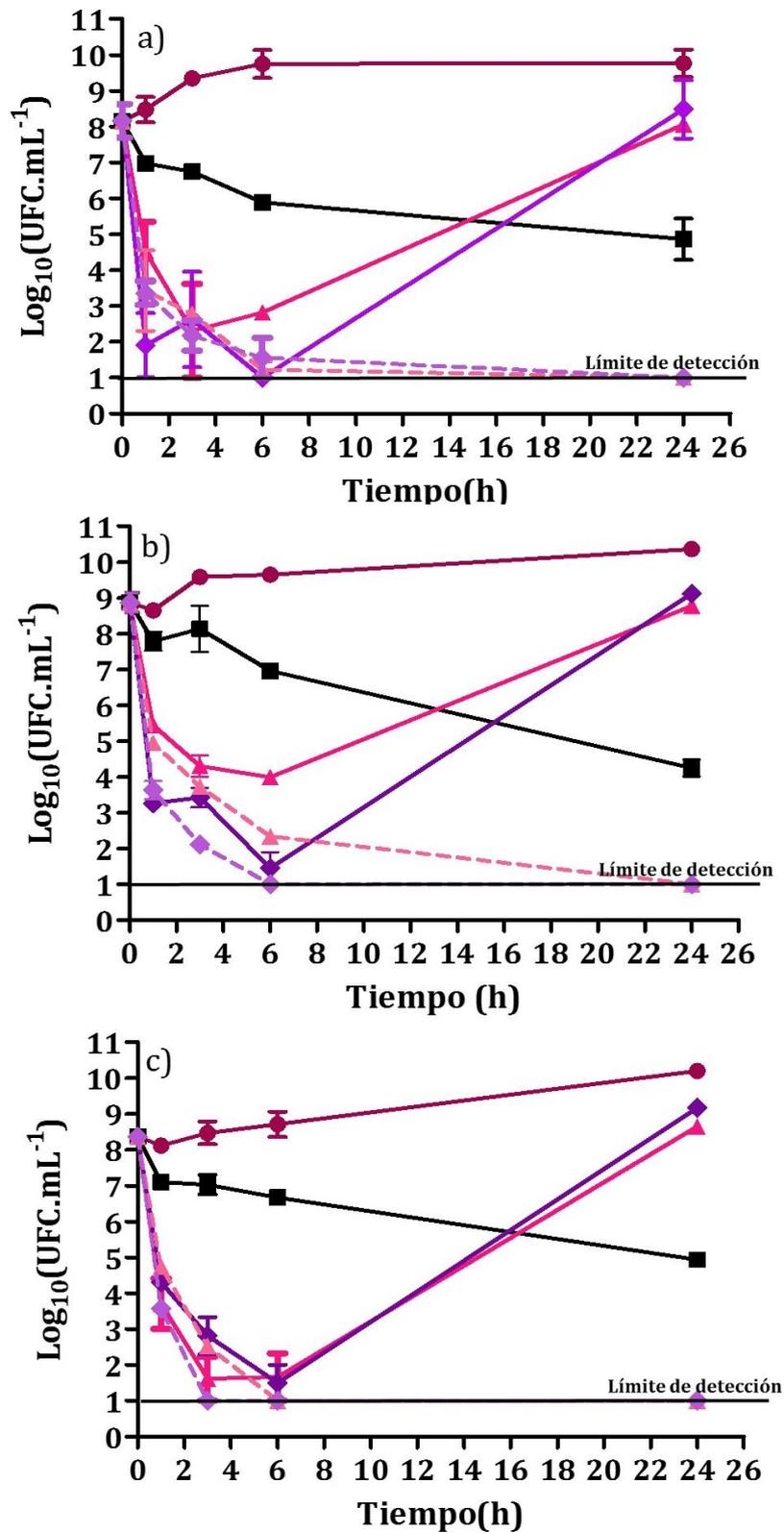


Figura 4.2 Cinética de muerte de: a) *P.aeruginosa* FQ R1 b) *P.aeruginosa* PA014 y c) *P.aeruginosa* ATCC 27853, expuestas a: ■VAN (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ▲EuE (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ◆EuE (2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), --▲- EuE-VAN (250/1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), --◆- EuE-VAN (2000/1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y ●Control sin tratar.

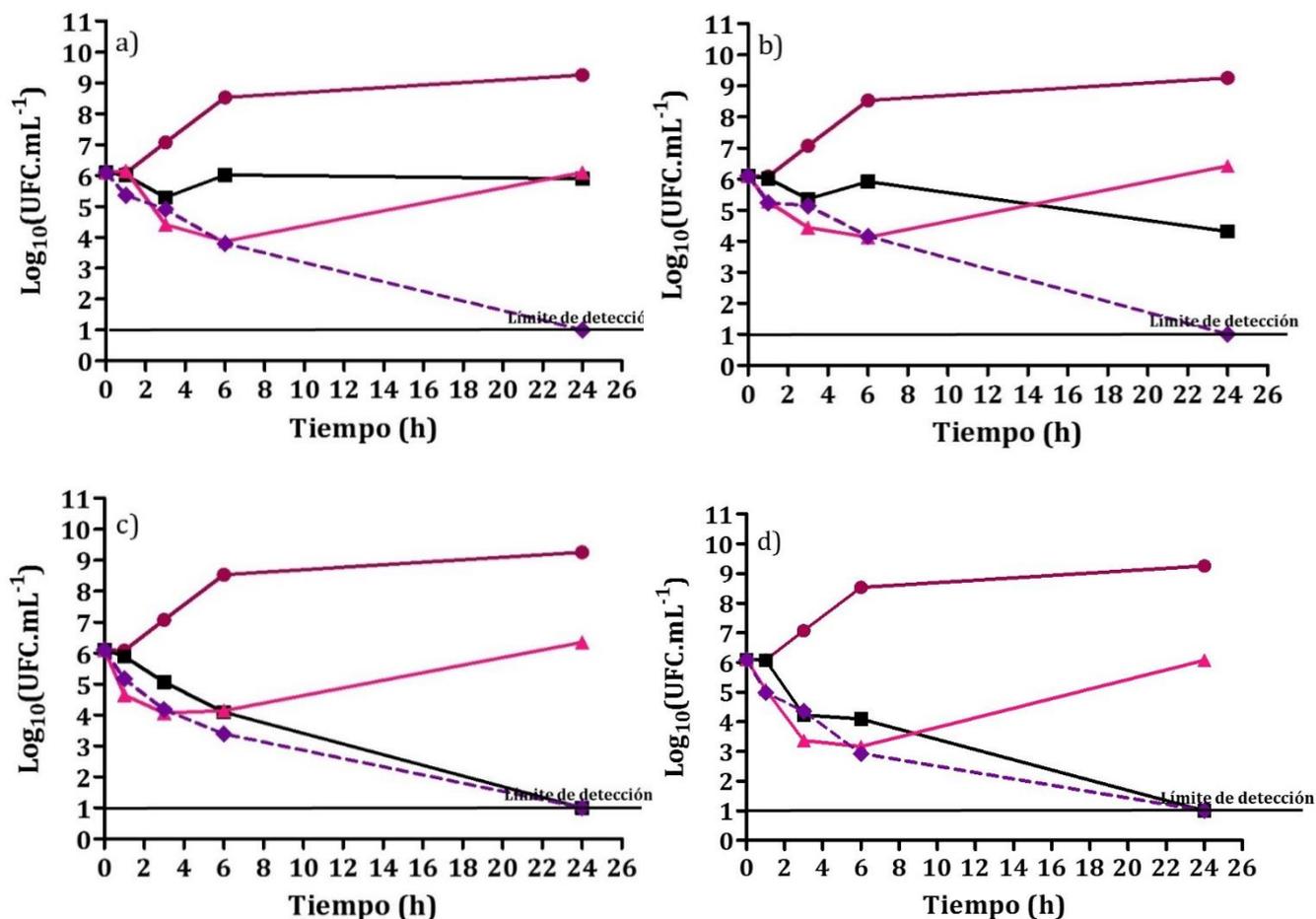


Figura 4.3. Cinética de muerte de *S. aureus* MRSA 61 frente a VAN desde --♦--EuE-VAN y ■VAN en solución en SF+CMH 2%: (a) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VAN (4 x CIM) y 17,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE, (b) 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VAN (8 x CIM) y 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE, (c) 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VAN (16 x CIM) y 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE y (d) 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VAN (32 x CIM) y 140 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EuE

Se han utilizado sistemas portadores con el objetivo de aumentar la potencia antimicrobiana, y en particular, constituidos por polímeros catiónicos¹¹⁸. Hanumant Singh Rathore et al. diseñaron y caracterizaron *films* de quitosano con ciprofloxacino y observaron un aumento en la eficacia antimicrobiana respecto a CIP en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*¹¹⁹. En el trabajo desarrollado por Nouri y colaboradores¹²⁰, desarrollaron nanocompuestos de quitosano y evaluaron su eficacia antimicrobiana en cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. cereus*. En todos los casos se observó un aumento en la eficacia antimicrobiana, explicada por la interacción electrostática entre el grupo amino catiónico presente en el polímero catiónico con los ácidos teicoicos presentes en la pared celular de los Gram positivos (*S. aureus* y *B. cereus*) y con los LPS presentes en los Gram negativos (*E. coli* y *P. aeruginosa*).

Otra estrategia reportada en bibliografía para ampliar el espectro de glucopéptidos en Gram negativos, es la utilización de liposomas fusogénicos. En particular, un estudio muestra la capacidad de los liposomas de interactuar y fusionarse con la membrana externa que poseen los Gram negativos (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii*, etc) y liberar a VAN en el espacio periplásmico de la célula bacteriana permitiendo así que realice su acción bactericida¹²¹.

Por lo expuesto, la vehiculización de VAN en un sistema portador utilizando el polímero catiónico EuE está contribuyendo a la eficacia del antimicrobiano potenciando la acción frente a cocos Gram positivos y generando acción bactericida frente a Gram negativos, aspecto que permite ampliar el espectro de acción del mismo.

4.1.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM) un haz de electrones atraviesa un corte ultradelgado de la muestra produciendo una imagen bidimensional. Este tipo de microscopía permite observar la ultraestructura de las células, es por eso que se la utiliza frecuentemente en áreas como microbiología y biología celular, entre otras¹²².

La Figura 4.8 a presenta las microfotografías TEM de un cultivo de *P. aeruginosa* FQ R1 de células tratadas con EuE-VAN (250/1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), se evidencian alteraciones en la forma, baja densidad intracitoplasmática, cambios en la ultraestructura celular e irregularidades en la pared celular. Estas variaciones podrían afectar la funcionalidad de la membrana celular bacteriana.

Por otra parte, la Figura 4.8b muestra las células luego de ser tratadas con EuE, si bien se observan una capa difusa al exterior de las células, la morfología celular y la membrana celular permanecen inalteradas.

Sin embargo, cultivos tratados con VAN (Figura 4.8 c) no exhiben diferencias con los controles sin tratamiento (Figura 4.8 d). Evidencian apariencia normal de las células, alta densidad citoplasmática, membrana celular inalterada y morfología celular conservada.

La Figura 4.9 a presenta las microfotografías de TEM de un cultivo de *S. aureus* ATCC 25923 tratados con EuE-VAN (20/8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ; se evidencian alteraciones

morfológicas, baja densidad intracitoplasmática, cambios en la ultraestructura celular e irregularidades en la pared bacteriana. Esta zona difusa (capa externa) puede deberse a la interacción del polímero con la pared bacteriana.

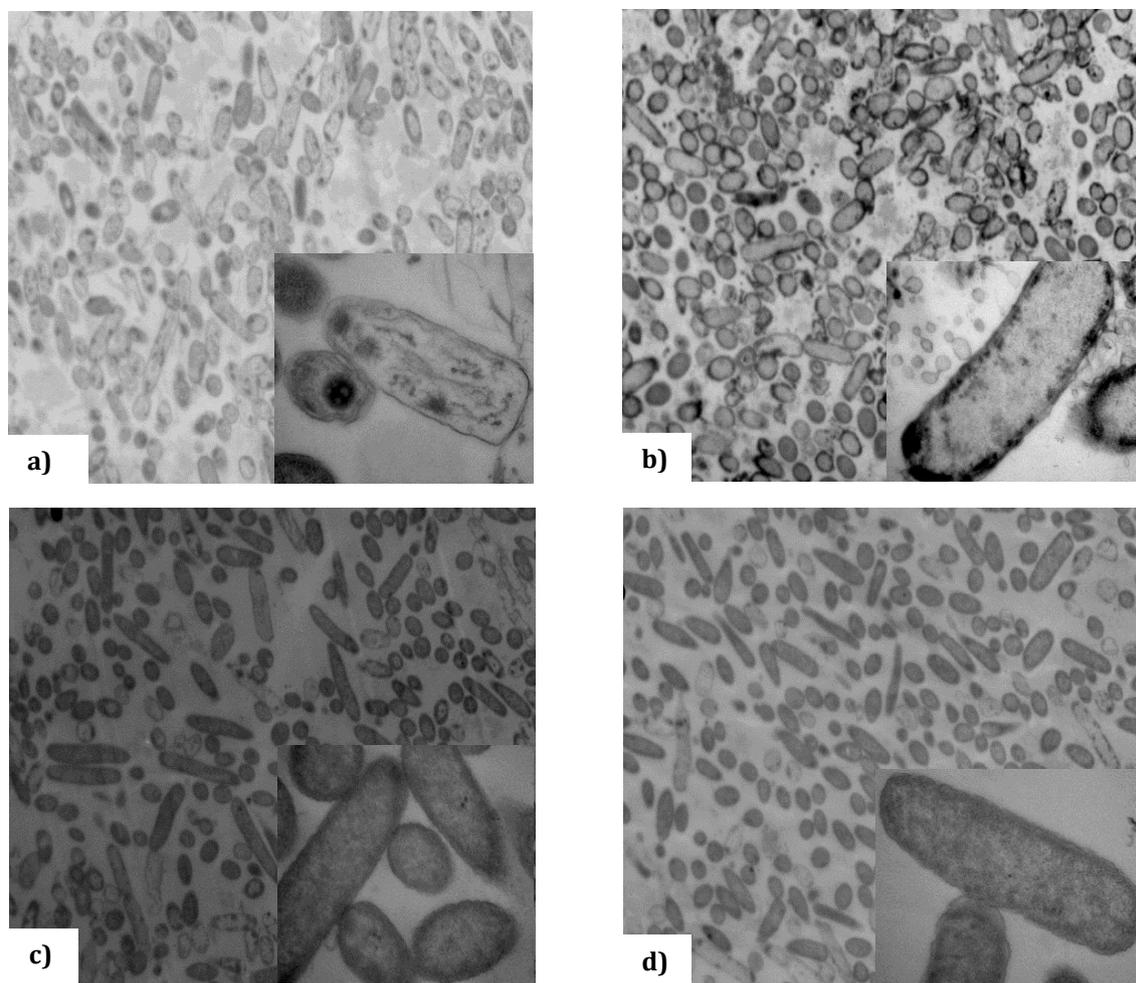


Figura 4.8. Microfotografías de transmisión electrónica de *P. aeruginosa* FQ R1 evidenciando pérdida de morfología y apariencia normal de las células luego de 3 h de incubación a 37°C con: a) EuE-VAN (250/1000 µg.mL⁻¹), b)EuE (250 µg.mL⁻¹), c)VAN (1000 µg.mL⁻¹), y d)Control sin tratar. Las microfotografías fueron obtenidas a 4646 x (panorámica) y 46460 x (ampliada).

Por otra parte, la Figura 4.9 b muestra los cultivos luego de ser tratadas con EuE (20 µg.mL⁻¹), aunque se observa una capa externa difusa y ligeros cambios en la electrodensidad citoplasmática celular, la morfología celular y la membrana celular permanecen inalteradas. Sin embargo, en las células expuestas a VAN (Figura 4.9 c) la morfología es similar a la del control sin tratamiento (Figura 4.9 d). En el Control sin tratamiento, las células muestran una apariencia y morfología normal, una membrana

intacta, alta densidad citoplasmática y células en estado de división celular. Las alteraciones morfológicas se evidencian en todos los casos a 46460x.

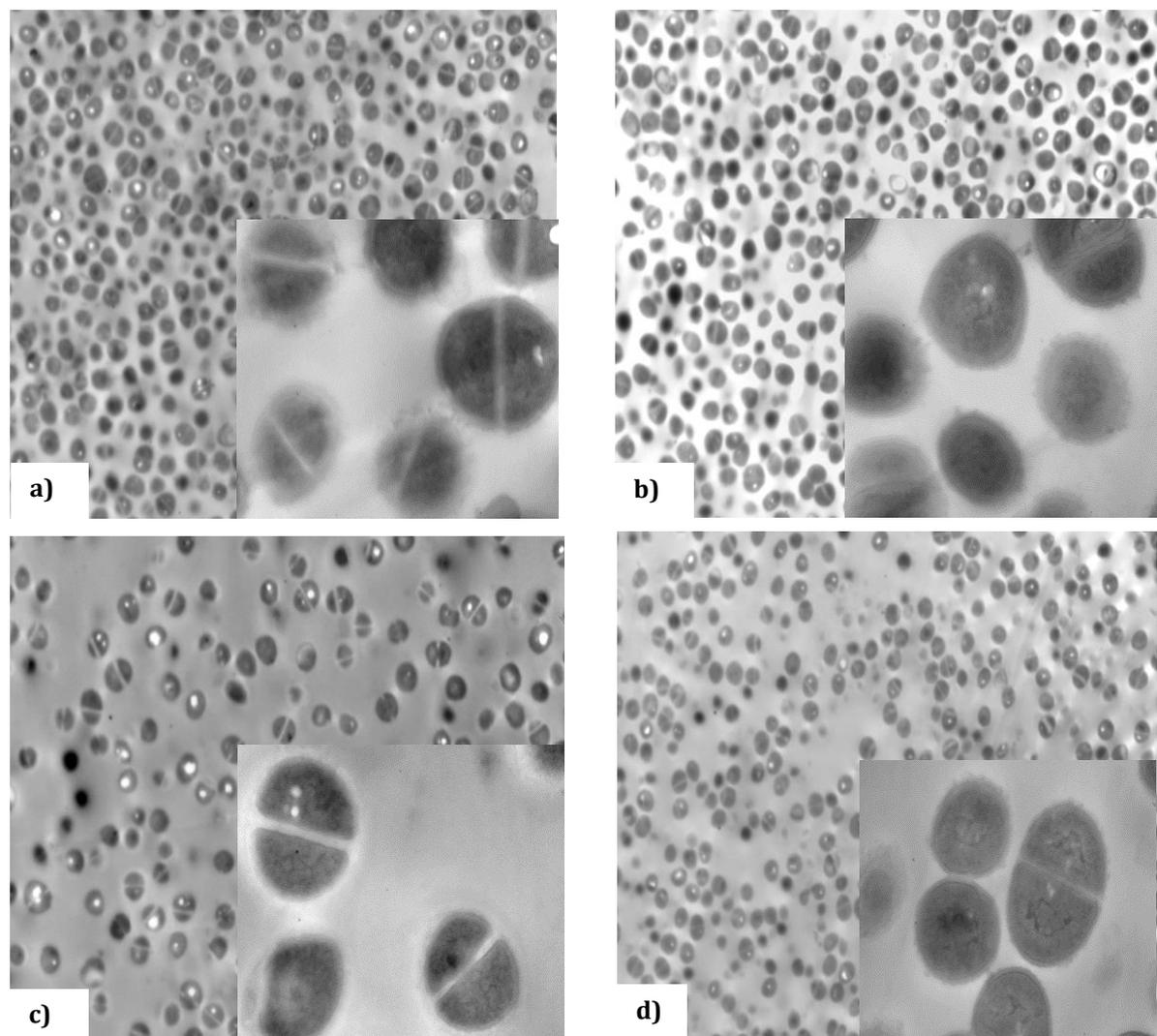


Figura 4.9. Microfotografías de transmisión electrónica de *S. aureus* ATCC 25923 evidenciando pérdida de morfología y apariencia normal de las células luego de 3 h de incubación a 37°C con: a) EuE-VAN (20/8 µg.mL⁻¹), b)EuE (20 µg.mL⁻¹), c)VAN (8 µg.mL⁻¹) y d)Control sin tratar. Las microfotografías fueron obtenidas a 4646 x (panorámica) y 46460 x (ampliada).

4.1.4 Microscopía de fluorescencia

En las Figura 4.10 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas con un microscopio Confocal-Olympus FV1200 de cultivos de *P. aeruginosa* FQ R1. En los cultivos tratados con EuE-VAN/Bodipy FL VAN (Figura 4.10 e) se observan bacterias fluorescentes. Estos resultados permiten verificar la hipótesis de que EuE propicia el ingreso de VAN a la capa de mureína de *P. aeruginosa* para ejercer su acción. Esto es posibilitado por las alteraciones a nivel de membrana externa generadas por el

polímero catiónico (visualizadas por TEM), propiciando la llegada de VAN a su sitio de acción (síntesis de mureína) en *P. aeruginosa*, sitio al cual no puede acceder este antimicrobiano por el gran tamaño de su molécula y el impedimento que representa la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

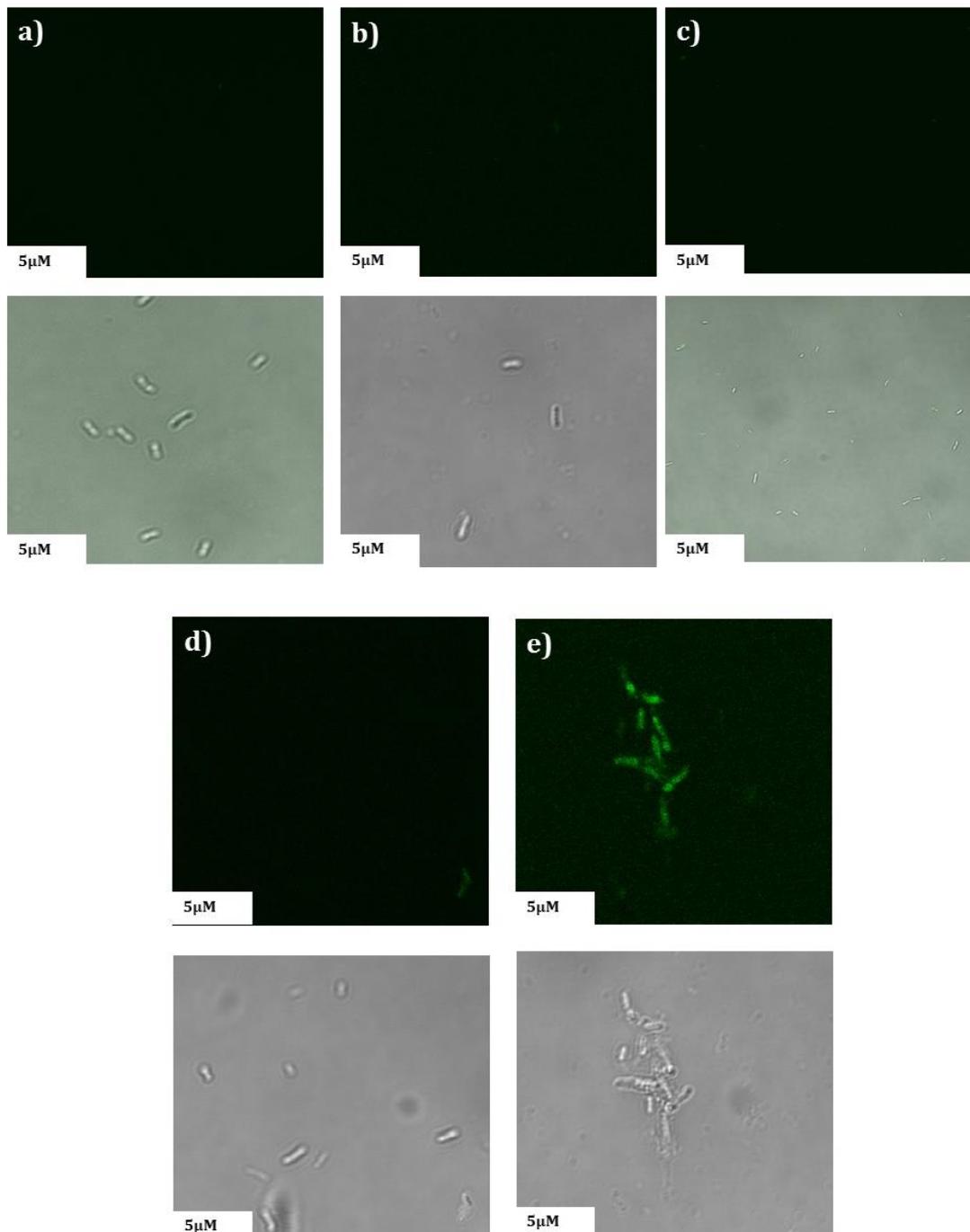


Figura 4.10. Microscopía de Fluorescencia (arriba) y de transmisión óptica o campo claro (abajo) de *Pseudomonas aeruginosa* FQ R1 expuesta a: a) Control sin tratar; b) EuE (250 μg.mL⁻¹); c) VAN no fluorescente (1000 μg.mL⁻¹); d) VAN/Bodipy FL VAN (999,9/0,1 μg.mL⁻¹) y e) EuE-VAN/Bodipy FL VAN (250-999,9/0,1 μg.mL⁻¹), obtenidas con el microscopio Confocal-Olympus FV1200 y procesadas con Fiji image J.

Con el objetivo de explicar y justificar la potenciación de VAN en EuE-VAN frente a *S. aureus* se utilizó la microscopía de fluorescencia. Por un lado, se obtuvieron imágenes a través del microscopio confocal, que se muestran en la Figura 4.11, y por otro, con el programa Fiji *image J*, se cuantificó la intensidad de fluorescencia (IF) de cada imagen. Luego, se graficó el promedio de las IF de las dos imágenes en función de los distintos tratamientos (Figura 4.12). Se observa una mayor IF en los cultivos EuE-VAN/Bodipy FL VAN respecto a VAN/Bodipy FL VAN en las concentraciones evaluadas, tal como se muestra en la Figura 4.12. El gráfico representa el promedio de la IF por célula de dos imágenes con el mismo tratamiento (Figura 4.12). A su vez, se observan menos células por campo en los cultivos tratados con EuE-VAN/Bodipy FL en comparación con Bodipy FL VAN (Figura 4.11).

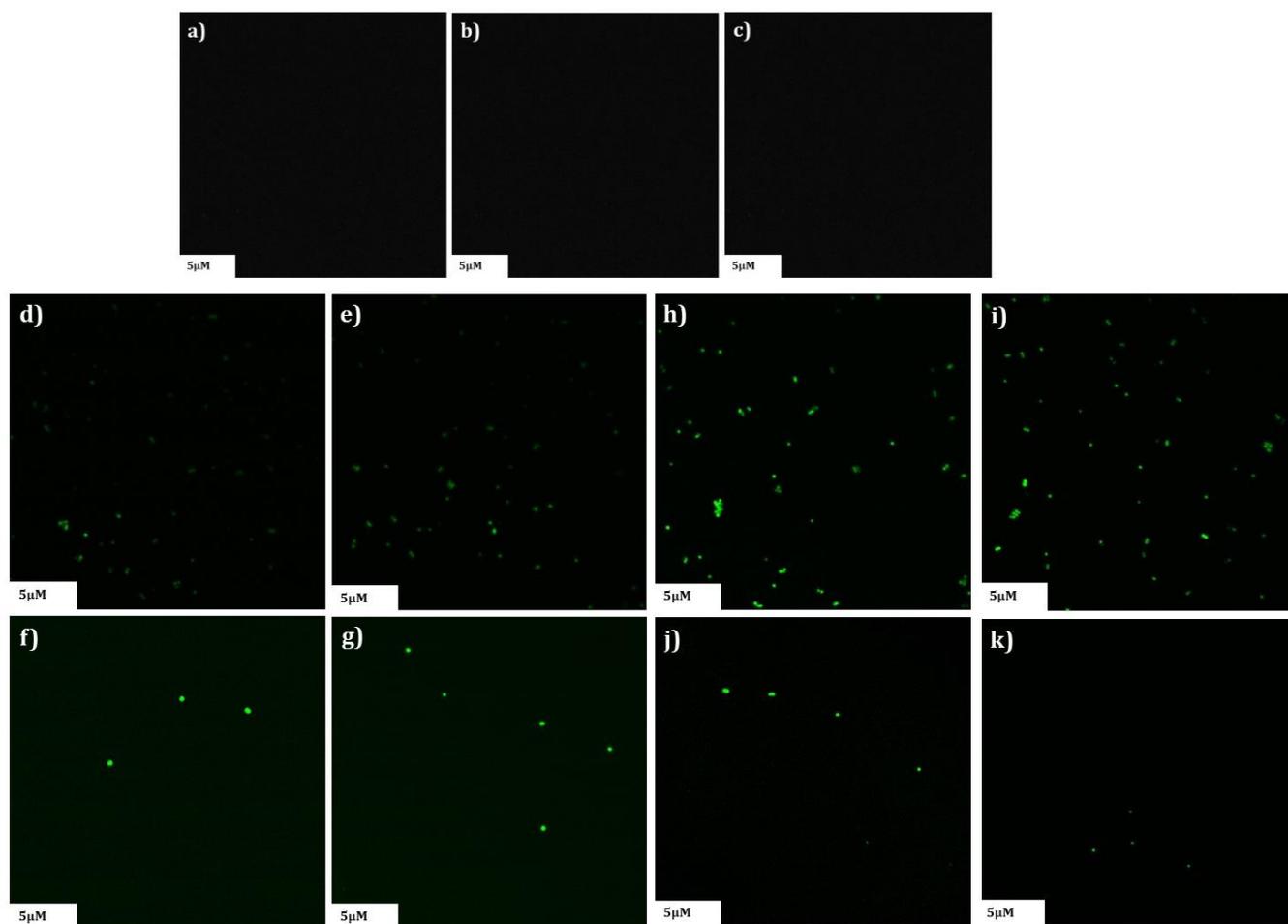


Figura 4.11. Imágenes de Fluorescencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tratadas con: a) Control sin tratar; b) EuE ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$); c) VAN no fluorescente ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$); d y e) VAN/Bodipy FL VAN ($1,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y f y g) EuE-VAN/Bodipy FL VAN ($20-1,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), h e i) VAN/Bodipy FL VAN ($7,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y j y k) EuE-VAN/Bodipy FL VAN ($20-7,9/0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtenidas con el microscopio Confocal-Olympus FV1200 y procesados con Fiji image J.

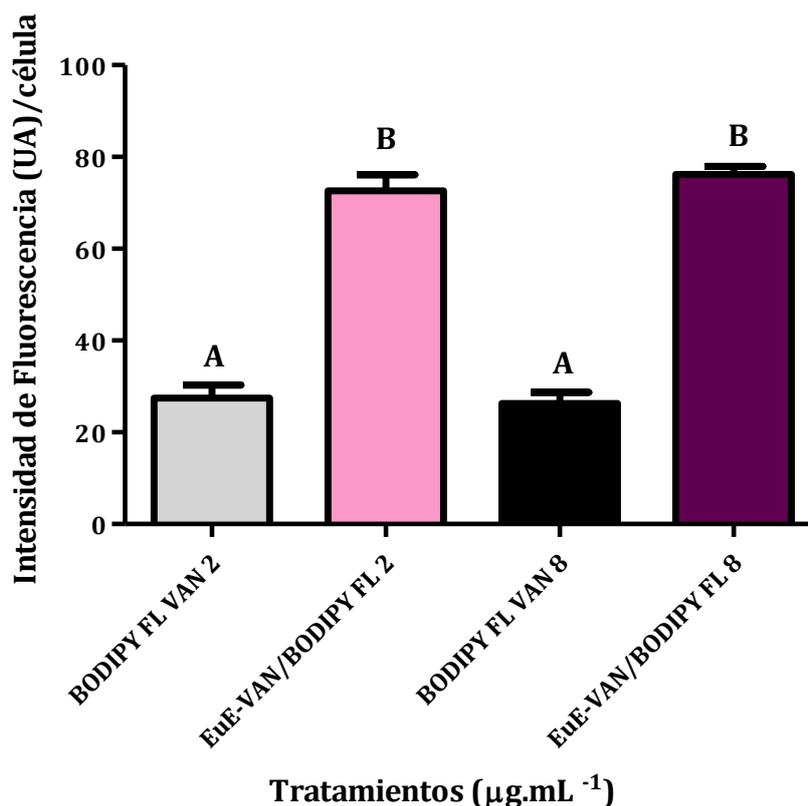


Figura 4.12. Intensidad de fluorescencia/célula (UA) promedio en función de los tratamientos \pm su error estándar ($n=2$): VAN 2 (promedio de las IF de las imágenes 4.11 d y e), EuE-VAN 2 (promedio de las IF de las imágenes 4.11 f y g), VAN 8 (promedio de las IF de las imágenes 4.11 h e i), y EuE-VAN 8 (promedio de las IF de las imágenes 4.11 j y k). Se utilizó el test estadístico ANOVA de una vía con $p<0,05$ y Test de Tukey para comparar las diferencias entre los tratamientos. Diferentes letras mayúsculas por encima de las barras indican diferencias

4.2 Efecto del polímero catiónico en la integridad de células microbianas: Sensibilización a agentes líticos.

Las bacterias Gram negativas son resistentes a un gran número de agentes nocivos como resultado de la eficiente función de barrera de su membrana externa (ME). La ME es impermeable a macromoléculas y sólo permite la difusión limitada de sustancias hidrofóbicas a través de su superficie cubierta con LPS^{19,23,20,25}. Además, carece de glicerofosfolípidos y, por tanto, de canales efectivos para la difusión hidrofóbica. La ME de estas bacterias es también resistente a los detergentes neutros y aniónicos. Pequeños compuestos hidrofílicos difunden por la ME a través de porinas llenas de agua, pero el tamaño estrecho de las mismas restringe la difusión²⁵. Como muchos agentes nocivos, por ejemplo, ATM, son hidrofóbicos o compuestos hidrofílicos relativamente grandes, la penetración a través de la ME es muy escasa.

Los LPS son la base molecular de la integridad de la ME. Son polianiones debido al gran número de cargas negativas que poseen el lípido A y el núcleo interior¹⁰⁷. Moléculas adyacentes de LPS polianiónicos se mantienen unidas electrostáticamente por cationes bivalentes, Mg²⁺, Ca²⁺, formando una estructura estable tipo “techo de tejas” en la superficie de la ME. En consecuencia, la ME es una barrera eficaz, siendo los sitios de unión a cationes del LPS esenciales para la integridad de la misma.
123,107,124,125.

Se ha descrito en bibliografía^{118,119,126} que la naturaleza catiónica de macromoléculas tales como polielectrolitos, proteínas, etc, es un factor que contribuye a la interacción con la superficie bacteriana cargada negativamente, alterando la funcionalidad del microorganismo ya que desplazan los iones positivos como calcio y magnesio y se unen a los fosfolípidos de la membrana, alterando la permeabilidad de la misma. La unión entre ambos puede neutralizar e incluso cambiar el signo en el potencial electrocinético de las bacterias¹²⁶.

Dado la naturaleza catiónica de EuE, cuyas dispersiones acuosas exhiben potencial zeta positivo, como se describió en el capítulo 3, es de esperar que la interacción con la célula bacteriana esté favorecida, como se ha descrito con otros polímeros catiónicos^{118,120,126}. En esta sección se muestra la sensibilización a la acción lítica de dos detergentes: SDS (aniónico) y Tritón x-100 (neutro), exhibida por EuE frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

La exposición de *P. aeruginosa* a los agentes líticos evaluados provoca ligera reducción en la absorbancia de las suspensiones control. La absorbancia se reduce aún más si previamente se las expone a EuE 150 µg.mL⁻¹ (Figura 4.13).

Además, se observa que la sensibilización a agentes líticos es dependiente de la concentración de EuE y también de la concentración de agente lítico iónico usado (Figura 4.14).

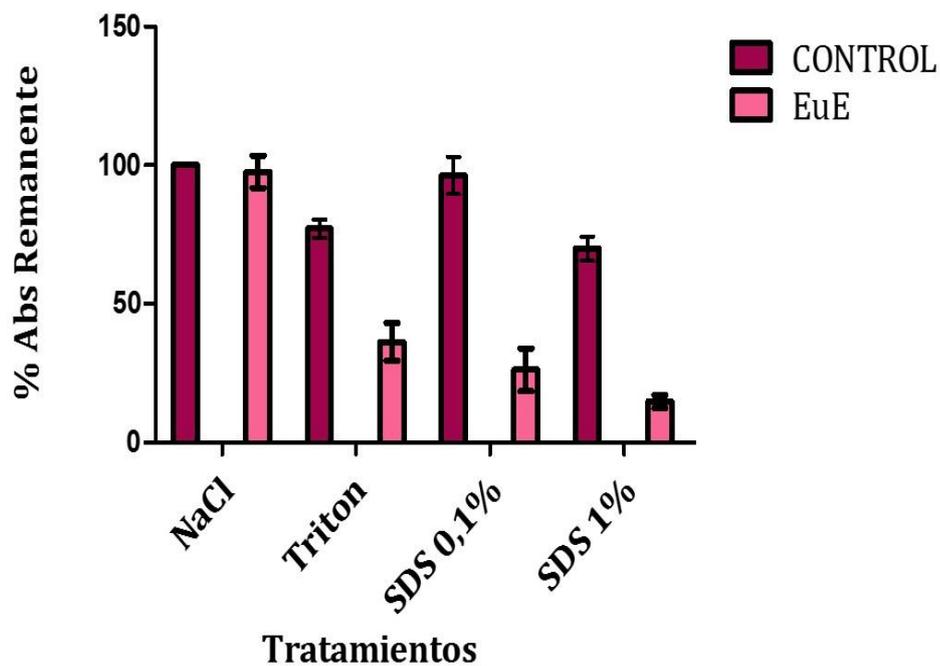


Figura 4.13 Efecto de EuE (150µg.mL⁻¹) con 10 minutos de exposición, 4 minutos con Tritón y SDS.

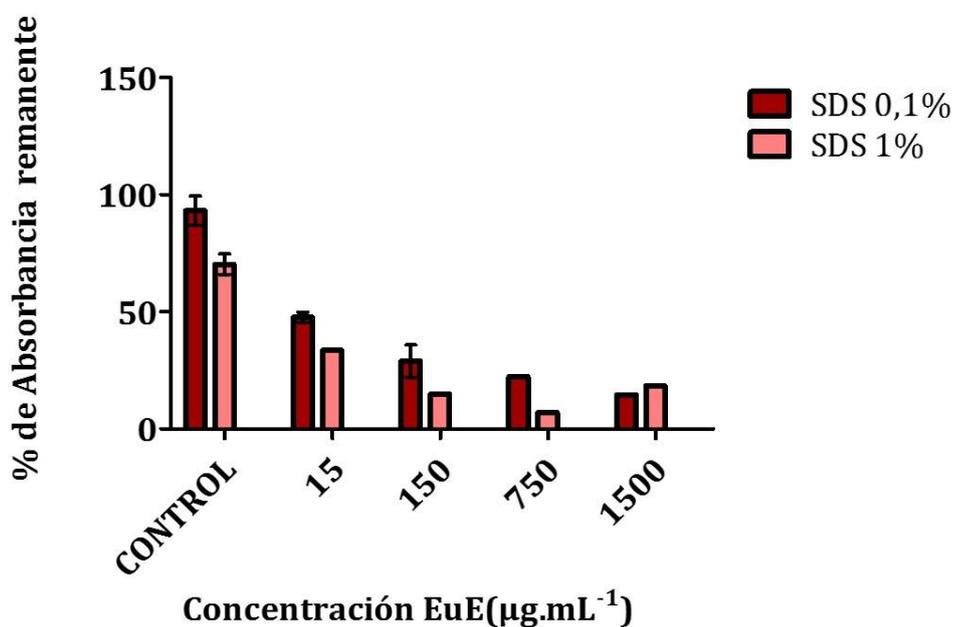


Figura 4.14 Sensibilización a SDS con previa exposición a EuE en distintas concentraciones

El efecto de sensibilización no depende del tiempo de exposición al polímero (Figura 4.15).

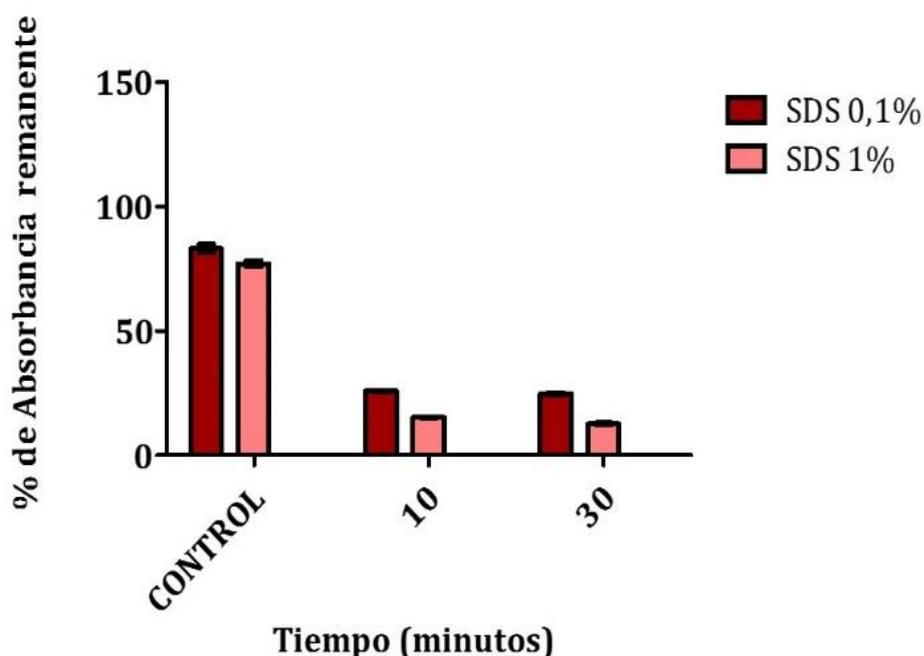


Figura 4.15 Sensibilización de EuE ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a distintos tiempos de exposición.

Frente a *C. albicans* no se produce sensibilización a agentes líticos en las concentraciones de EuE evaluadas (Figura 4.16). Esto es indicativo de acción selectiva del polímero frente a la célula procariota.

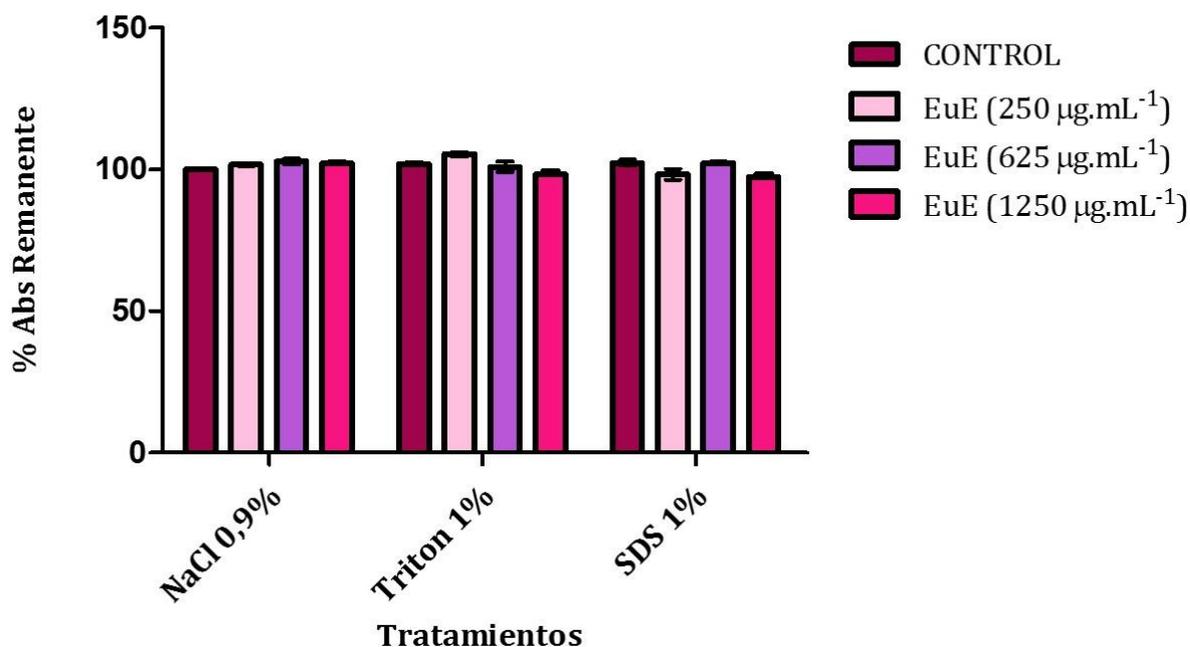


Figura 4.16 Sensibilización a diferentes agentes líticos: SDS 1%, Tritón 1%, y NaCl 0,9 % con distintas concentraciones de EuE (250 , 625 y $1250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a *C. albicans*.



4.3.1 Efecto del polímero catiónico en la capacidad de desarrollo de los microorganismos en diversos medios de cultivo

Se observó que por acción del polímero se produce reducción en el recuento bacteriano en las condiciones experimentales evaluadas con diferencias estadísticamente significativas respecto del control en AMH y en Agar Cetrimide (Tabla 4.2). Por el contrario, el tratamiento con EuE afecta en menor proporción el recuento en el medio nutritivo (Agar Müeller Hinton) pero hay marcada reducción ($p < 0,05$) en el medio selectivo (Agar Cetrimide). Este medio contiene un compuesto de amonio cuaternario frente al cual el control de *P. aeruginosa* desarrolla normalmente mientras la suspensión expuesta a EuE exhibe menor recuento. Esto indicaría que el polímero posiblemente dañe la envoltura de la bacteria de modo que las hace más susceptibles a un agente al que normalmente resiste (cetrimide).

Por su parte, no se observó variación en el recuento de *C. albicans* en Agar Sabouraud luego de la breve exposición a EuE (Tabla 4.3). Por lo expuesto, el polímero catiónico no exhibe acción antifúngica mientras que sí altera parte del cultivo bacteriano, en las condiciones experimentales evaluadas.

Tabla 4.2 Porcentaje de variación en el recuento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 luego de la exposición a EuE ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en distintos medios (Agar Müeller Hinton y Agar Cetrimide). Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía y post test de Bonferroni's múltiple ($p < 0,05$)

Tratamiento	Agar Müeller Hinton	Agar Cetrimide
Control (%)	100,0±0,5	98,5±1,6
EuE $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (%)	70,6±2,3	39,5±0,7

Tabla 4.3 Porcentaje de variación en el recuento de *C. albicans* luego de la exposición a EuE ($1250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en Agar Sabouraud.

Tratamiento	Agar Sabouraud
Control (%)	100,0±7,3
EuE $1250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (%)	98,1±3,7

5. Conclusiones parciales

Efectos de los sistemas EuE-VAN en *P. aeruginosa*:

- ✓ Se observó una potenciación de VAN en los sistemas EuE-VAN, en todas las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas.
- ✓ VAN en la concentración evaluada, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no produce erradicación del inóculo.
- ✓ EuE en las concentraciones evaluadas, evidenció una acción bactericida inicial, pero a 24 h de exposición se observa una recuperación completa del inóculo. Por lo tanto, no es antimicrobiano en sí mismo. A través de TEM se observó que, si bien EuE produce alteraciones en las envolturas de *P. aeruginosa* FQ R1, son reversibles con el tiempo (cinética bactericida).
- ✓ Mediante TEM se observó que los sistemas EuE-VAN producen alteraciones en la pared celular, cambios en la ultraestructura y densidad citoplasmática.
- ✓ A través del uso de Microscopía de Fluorescencia se observaron células fluorescentes, es decir que VAN llega al sitio de acción (capa de mureína) de *P. aeruginosa* FQ R1 cuando esta vehiculizada en EuE-VAN.
- ✓ EuE produce sensibilización a agentes líticos selectiva (Célula bacteriana vs *C. albicans*) y sensibilización frente a compuestos cuaternarios presentes en medios selectivos para *P. aeruginosa*.

Efectos de los sistemas EuE-VAN en *S. aureus*:

- ✓ Los sistemas EuE-VAN potencian la acción de VAN frente a *S. aureus*, ya que se observó erradicación más rápida y a menor concentración de ATM.
- ✓ A través de TEM se observan cambios morfológicos importantes, a diferencia de los cultivos tratados con VAN, que evidencia forma similar al Control sin tratar.
- ✓ Mediante microscopía de fluorescencia se evidenció mayor intensidad de fluorescencia (mayor ingreso de VAN a la capa de mureína favorecido por las interacciones de EuE con las envolturas bacterianas). La elevada fluorescencia que exhiben los cultivos tanto de *P. aeruginosa* como de *S. aureus* expuestos a EuE-VAN evidencian el acceso del fármaco a su sitio de acción en la pared bacteriana, condición que se alcanza por todos los efectos generados por EuE sobre la célula bacteriana, descritos en esta tesis y en otra previa, tales como:



cambios en potencial electrocinético superficial, despolarización de membrana citoplasmática, sensibilización a agentes líticos y alteraciones morfológicas. En resumen, tales alteraciones fisiológicas y morfológicas observadas tanto en *P. aeruginosa* como en *S. aureus*, propician que VAN alcance el sitio blanco, inhiba la síntesis de peptidoglucano y genere erradicación de los cultivos bacterianos en condiciones de tiempo y concentraciones en los cuales el fármaco libre no puede hacerlo.

Como conclusión general de este capítulo, se arribó a que los sistemas EuE-VAN amplían el espectro de acción de VAN (eficacia bactericida frente a *P. aeruginosa*) y potencian la acción de la misma frente a *S. aureus*.

CAPÍTULO 5:
EFECTO DE EUDRAGIT E EN
CÉLULAS FORMANDO *BIOFILMS*



CAPÍTULO 5: EFECTO DE EUDRAGIT E EN CÉLULAS FORMANDO *BIOFILMS*.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista humano relevante con capacidad para formar *biofilms* en superficies abióticas, incluidos implantes, catéteres urinarios y lentes de contacto. Los *biofilms* de *P. aeruginosa* es una matriz de sustancias poliméricas que contienen exopolisacáridos (EPS), proteínas y ADN extracelular. Estas sustancias desarrollan una multitud de mecanismos para restringir la entrada de fármacos antimicrobianos para alcanzar el nivel celular y matar las células encerradas debajo de la matriz del *biofilm*, lo que da lugar a la resistencia bacteriana contra numerosos antibióticos convencionales^{127,128,129}. Estos mecanismos incluyen interacción electrostática, enzimas degradantes, bombas de eflujo, metabolismo reducido a través de capas de células bacterianas y mutaciones intrínsecas. Junto con la formación de *biofilms*, también se sabe que la producción de varias toxinas y otros factores de virulencia contribuyen significativamente a la patogénesis de *P. aeruginosa*. Las bacterias en los *biofilms* desarrollan tolerancia antimicrobiana y evaden las defensas del huésped. Su importancia clínica radica en que pueden conducir a la muerte de pacientes que sufren inmunosupresión, fibrosis quística, cáncer y quemaduras o heridas traumáticas. Es imperativo desarrollar alternativas que erradiquen las biopelículas maduras, fuentes importantes de persistencia bacteriana^{130,131,132,133}.

En este capítulo se muestran los resultados de los efectos que produce el polímero catiónico (EuE) en células formando *biofilms*, en particular de *P. aeruginosa*.

5.1 Adecuación de condiciones experimentales para un desarrollo óptimo de *biofilms* de *P. aeruginosa*,

Tal como se mencionó en el capítulo 2, EuE precipita tras largos períodos de incubación en presencia de CMH. Por otra parte, la producción de EPS es influida por la calidad nutricional del medioambiente¹²⁸. En este contexto, se realizaron estos estudios con el fin de utilizar un medio nutritivo para que el *biofilm* se forme y EuE no precipite.

Estos estudios permitieron arribar que *P. aeruginosa* tanto SCV como FQ R1, desarrolla un *biofilm* adecuado en los medios CMH y SF suplementada con un 10% de CMH, como se muestra en la Figura 5.1.

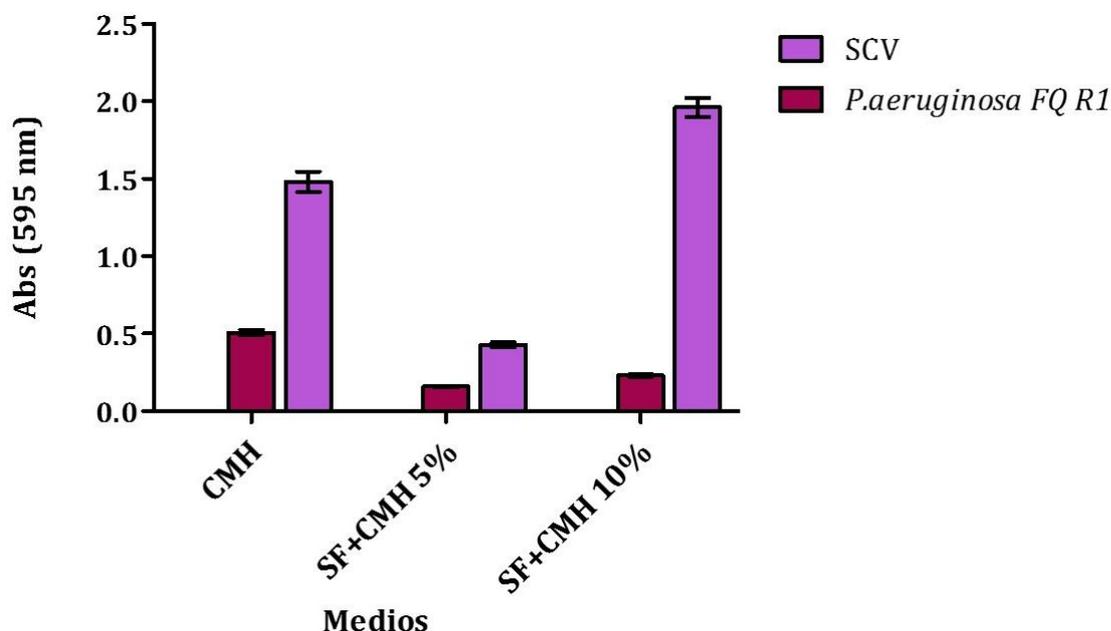


Figura 5.1. Efecto de la variación de nutrientes en la producción de *biofilms* de *P.aeruginosa* FQ R1 y *P. aeruginosa* SCV: Caldo Müller Hinton (CMH), Solución fisiológica suplementada con CMH al 5% (SF+CMH 5%), Solución fisiológica suplementada con CMH al 10% (SF+CMH 10%) con 48 h de incubación a 37°C.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó SF+CMH 10% para la evaluación del efecto de los tratamientos en la formación del *biofilms*, ya que las células bacterianas son inoculadas junto con los tratamientos, y de esta manera evitamos la precipitación de EuE. Por el contrario, para la evaluación del efecto de los tratamientos en el *biofilms* maduro, se seleccionó CMH. En este caso, recordemos que los tratamientos se incorporan una vez formado el *biofilm* maduro, es decir no hay riesgo de precipitación de EuE, tal como se describió en el capítulo 2, sección 2.2.5.

5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EuE Y CIP EN LA INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE *BIOFILMS* DE *P. aeruginosa*

La Figura 5.2 representa la absorbancia del CV adherido al *biofilm* expresada como, porcentaje de crecimiento del *biofilm*, en función de distintas concentraciones de EuE.

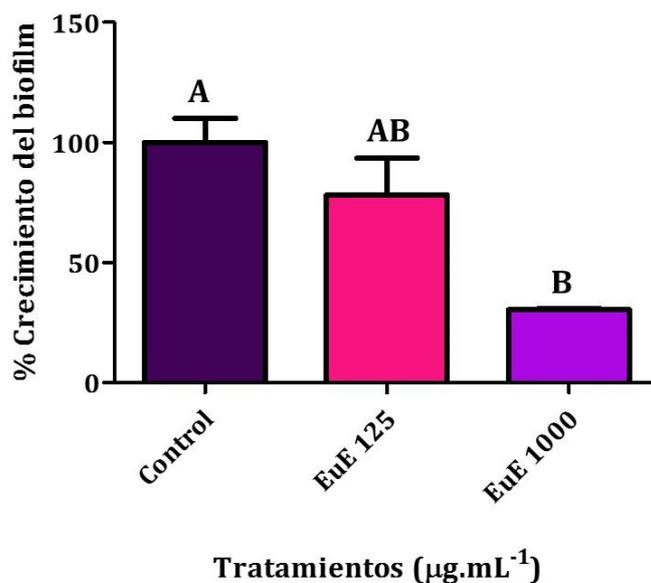


Figura 5.2. Efecto inhibitor de EuE sobre la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* SCV. Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía y post test de Dunn's multiple ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas.

En *P. aeruginosa* SCV se observó que EuE con $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reduce la formación de *biofilms* con diferencias estadísticamente significativas respecto del control, aproximadamente un 70% (Figura 5.2).

A partir de estos resultados, con el objetivo de caracterizar a *P. aeruginosa* SCV, se determinó la CIM de ciprofloxacino. Los valores determinados se muestran en la tabla 5.1. El valor de CIM fue $< 0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, es decir es sensible a este ATM, con lo cual resulta de interés continuar los estudios con una cepa resistente a ciprofloxacino, tal como es *P. aeruginosa* FQ R1.

Tabla 5.1. Susceptibilidad *in vitro* a ciprofloxacino de cepas de *P. aeruginosa*.

Microorganismos	Ciprofloxacino (CIP)
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5
<i>P. aeruginosa</i> SCV	<0,5
<i>P. aeruginosa</i> PA014	<0,25
<i>P. aeruginosa</i> FQ R1	128

En la Figura 5.3 se muestra el efecto de EuE sobre la formación del *biofilms* de *P. aeruginosa* FQ R1. En las concentraciones evaluadas se observó una disminución de la formación del *biofilm* con diferencias estadísticamente significativas respecto del control. EuE exhibe un efecto concentración dependiente para inhibir la adherencia de *P. aeruginosa* y la formación del *biofilms* siendo más marcado con 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

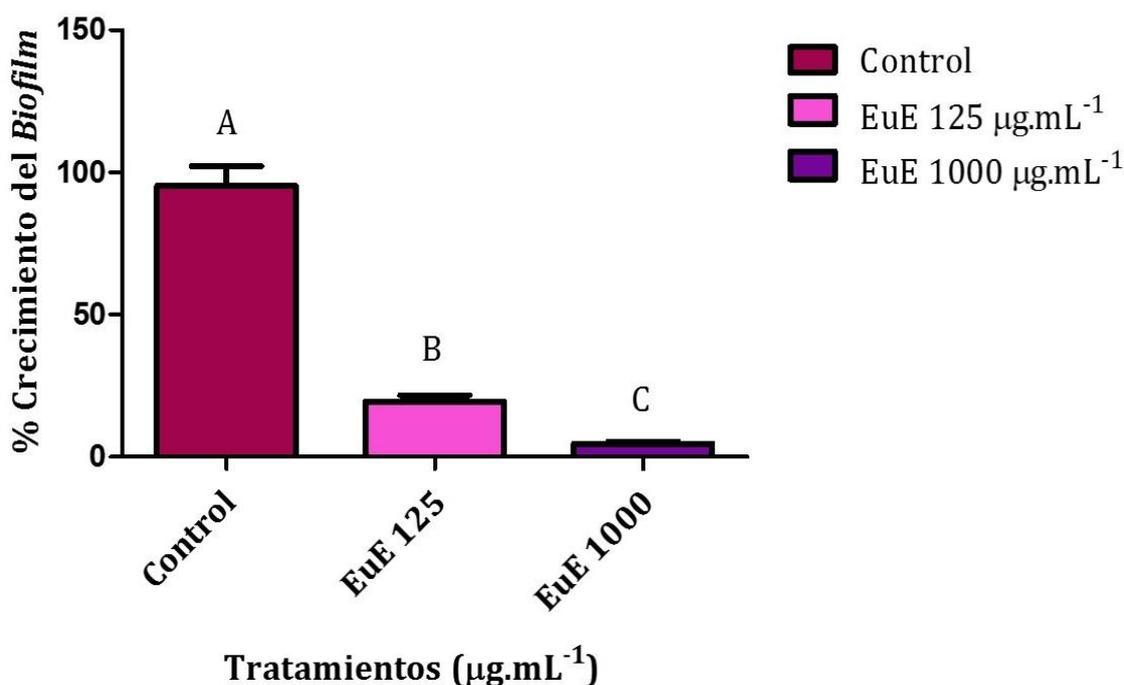


Figura 5.3. Efecto inhibitor de EuE. sobre la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* FQ R1. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis y las diferencias entre concentraciones se analizaron mediante el test Dunn's multiple.(IC:95%). Diferentes letras mayúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas.

Para determinar el efecto de CIP en la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* FQ R1, se evaluó un amplio rango de concentraciones (64, 128, 1024 y 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), superiores e inferiores al valor de CIM (Tabla 5.1), de modo tal, de encontrar una combinación adecuada para ser vehiculizada por EuE e inhibir la formación del *biofilm*.

En la Figura 5.4 se muestra el efecto de ciprofloxacino sobre la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa* FQ R1. En todo el intervalo de concentraciones evaluadas CIP inhibe considerablemente la formación del *biofilms* de esta cepa, con lo cual no resultó de interés evaluar el efecto de los sistemas EuE-CIP en esta etapa.

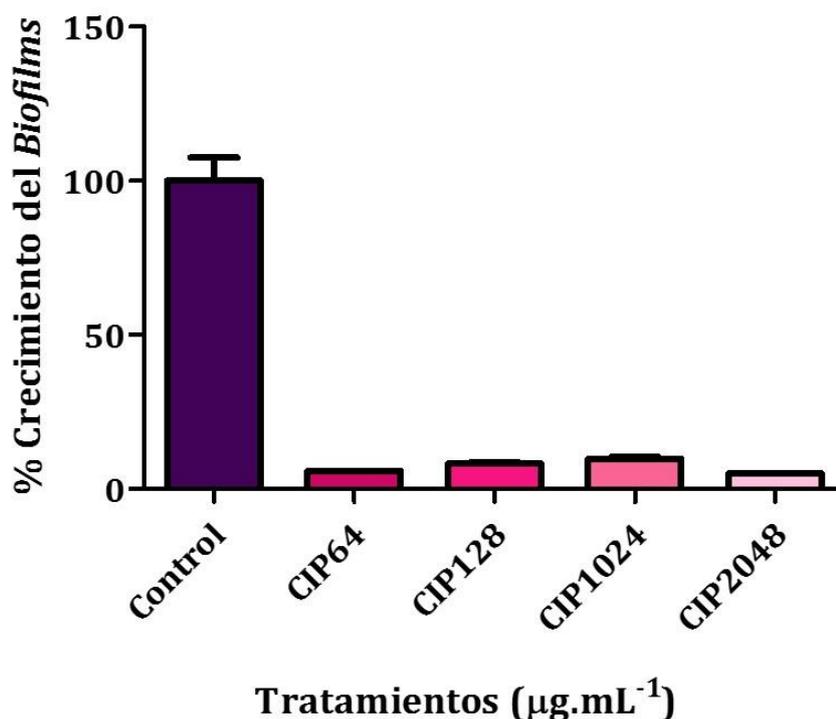


Figura 5.4. Efecto inhibitor de ciprofloxacino sobre la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* FQ R1.

5.3 Evaluación del efecto de los sistemas en el *biofilm* maduro de *P. aeruginosa* FQ R1.

Tal como se indicó en el capítulo 2 (ítem 2.2.5) el efecto de los sistemas EuE-CIP fue evaluado por un método indirecto para cuantificar viabilidad celular, mediante la reducción de XTT. Las sales de tetrazolio se han utilizado ampliamente como reactivos de detección durante muchos años en biología celular y molecular¹⁰².

En primer lugar, se evaluaron los efectos de EuE y de CIP por separado en *P. aeruginosa* FQ R1. A partir de esos resultados, se eligieron dos concentraciones de CIP, teniendo en cuenta el valor CIM de esta cepa (valor de CIM=128 µg.mL⁻¹ y 16 veces menor a la CIM=8 µg.mL⁻¹).

Tanto EuE (Figura 5.5) como CIP (Figura 5.6) mostraron una reducción parcial de la viabilidad celular. En el caso de CIP, esta reducción es dependiente de la concentración. Sin embargo, el efecto aumentó cuando los *biofilms* maduros se trataron con EuE-CIP (Figura 5.7). El sistema logra una reducción de



aproximadamente el 90% de la viabilidad bacteriana. CIP, alcanza el mismo efecto con una concentración 16 veces mayor que en el sistema EuE-CIP.

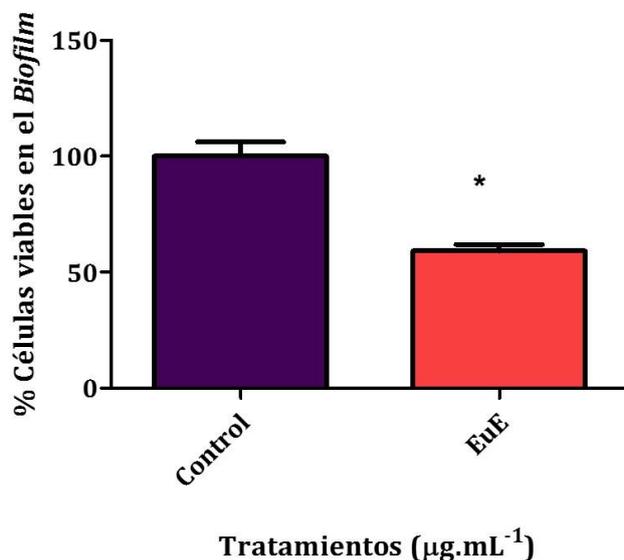


Figura 5.5. Efecto de EuE ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre el *biofilm* maduro de *P. aeruginosa* FQ R1. Los resultados se analizaron con t test ($p < 0,05$). * por encima de la barra indica diferencias estadísticamente significativas.

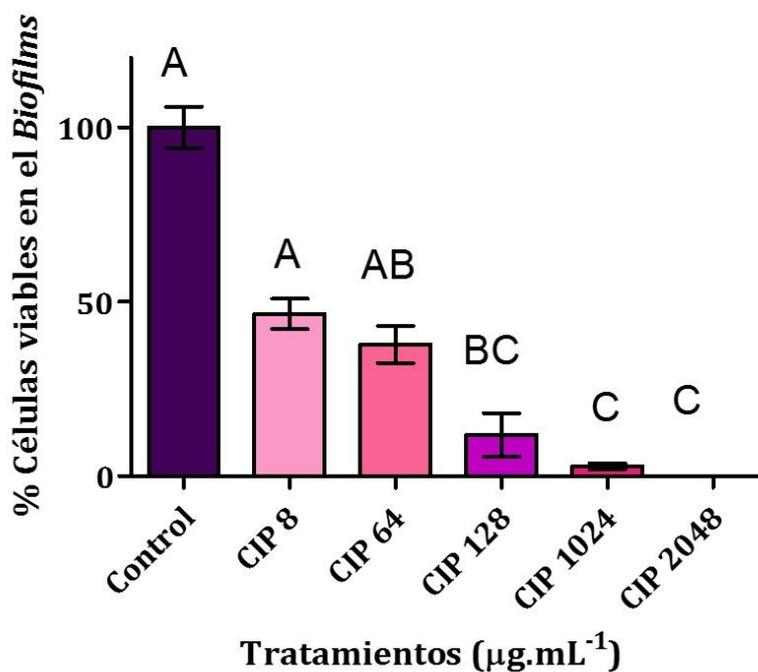


Figura 5.6. Efecto de distintas concentraciones de CIP sobre el *biofilm* maduro de *P. aeruginosa* FQ R1. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía y post test de Dunn's múltiple. Diferentes letras mayúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas.

El efecto del polímero se agrega al del antimicrobiano, lo que lleva a una reducción de 16 veces en la concentración de CIP requerida para lograr aproximadamente el 90% de reducción de la viabilidad bacteriana en el *biofilm* maduro.

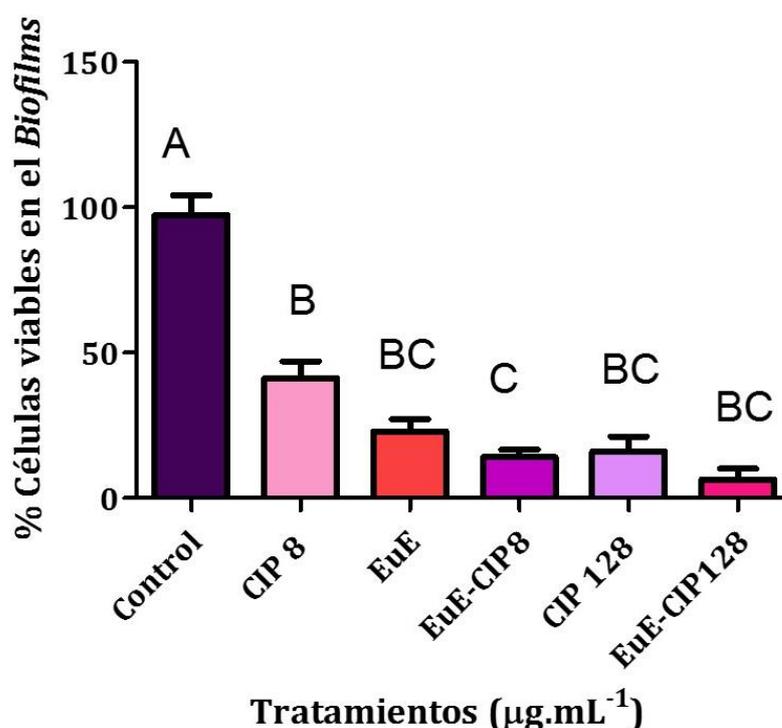


Figura 5.7. Efecto de: CIP (8 µg.mL⁻¹), EuE (1000 µg.mL⁻¹), EuE-CIP (1000/8 µg.mL⁻¹), CIP (128 µg.mL⁻¹) y EuE-CIP (1000/128 µg.mL⁻¹) sobre el *biofilm* maduro de *P. aeruginosa* FQ R1. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía y post test de Dunn's múltiple. Diferentes letras mayúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6. CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Eudragit E inhibe parcialmente la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa*. Este efecto es dependiente de la concentración.
- ✓ Las cargas positivas del polímero propiciarían cierta interacción con la matriz del *biofilm*, compuesta principalmente por alginatos, exponiendo a las células bacterianas y ejerciendo algún efecto sobre su metabolismo y viabilidad.

El efecto exhibido por EuE, solo o combinado con CIP frente a *P. aeruginosa* en *biofilms* es coincidente con lo descrito en bibliografía para otros polímeros catiónicos tales como quitosano. Según lo reportado en bibliografía^{118,126}, quitosano, con su estructura policatiónica aportada por los grupos amino de ese polímero,



interacciona electrostáticamente con los LPS de la membrana externa de Gram negativos, y aumenta la eficacia antimicrobiana en células en estado planctónico. Además, se ha observado en otros trabajos su eficacia frente a *biofilms* de *P. aeruginosa*¹³⁴, por la interacción con los alginatos de la matriz del *biofilm*¹³⁵.

Estos resultados avalan la potencial utilización de EuE, en concentraciones no tóxicas para células eucariotas, como vehículo para el diseño de sistemas portadores de antimicrobianos que potencien la eficacia de los mismos y constituyan una alternativa más eficaz frente al desarrollo de *biofilms* de *P. aeruginosa*, además de su efecto sobre las células planctónicas.

CAPÍTULO 6:
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES
GENERALES



CAPÍTULO 6: DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES.

La resistencia a los ATM representa un importante problema de salud pública en todo el mundo¹³⁶. El desarrollo de resistencia conduce a la falta de eficacia de los mismos y a disminuir las posibilidades de tratamiento. El Plan de Acción Global para la resistencia a antimicrobianos de la OMS incluye entre los 5 lineamientos principales: estimular investigaciones sobre nuevas alternativas de tratamiento antimicrobiano. Además, la OMS estableció una lista de bacterias prioritarias con resistencia a múltiples ATM que demandan investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. *P. aeruginosa*, se encuentra incluida en este listado como prioridad crítica, entre otras bacterias Gram negativas¹³⁷. Presenta resistencia a una variedad de antibióticos, incluidos aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos. La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a múltiples ATM se debe principalmente a que presenta una baja permeabilidad de la membrana externa¹³⁸.

Existen diversas estrategias para enfrentar esta problemática actual. El desarrollo de sistemas portadores de ATM constituye una herramienta de utilidad para optimizar la eficacia de los IFA disponibles, modificando diversas propiedades físico químicas, biofarmacéuticas y biológicas de los mismos.

En este trabajo de tesis se revelaron nuevas potencialidades del uso de EuE como material portador, no estudiados previamente, a diferencia de otros polímeros catiónicos como quitosano. El uso de este polímero catiónico, EuE, para vehicular vancomicina (glicopéptido) y ciprofloxacino (fluoroquinolona) condujo a la obtención de sistemas PE:ATM con propiedades físico químicas y biofarmacéuticas *in vitro* diferentes, que modifican la eficacia antimicrobiana de los IFAs que ejercen su acción mediante distintos mecanismos.

En primer lugar, tanto EuE-VAN como EuE-CIP se dispersan rápidamente y exhiben valores de pH cercanos a la neutralidad. El aumento de pH de los sistemas evaluados en relación a los ATM en solución, representa un aspecto interesante si se considerara en la potencial utilización de estos sistemas portadores como en el diseño de nuevas formulaciones para la utilización de infecciones oftálmicas, por ejemplo, queratitis bacterianas, ya que ningún agente disponible resulta efectivo tanto frente a



frente a bacterias Gram positivas como a Gram negativas que causan la queratitis, entre otras infecciones.

A tal situación se suma el surgimiento de resistencia frente a los antimicrobianos usados en esos procesos infecciosos.

Las formulaciones oftálmicas deben cumplir ciertos requisitos generales para garantizar el máximo confort en el ojo del paciente y minimizar la irritación local, lagrimeo y parpadeo. Una de las propiedades a considerar es el pH, siendo óptimo para una formulación oftálmica aproximadamente de $7,2 \pm 0,2$. Formulaciones con valores de pH alejados del óptimo pueden causar irritación extra¹⁰⁴.

Por otro lado, al evaluar los sistemas EuE-VAN, se evidenció un aumento de la estabilidad respecto a VAN en solución. Como se mostró en el capítulo 3, VAN en EuE-VAN permanece estable (con concentraciones superiores a 90%) hasta 14 días mientras que VAN en solución es estable hasta los 6 días de preparación. Existen reportes, que VAN en solución acuosa se degrada por una reacción conocida como desamidación, a través de la producción de una imida cíclica intermedia insoluble en agua¹⁰⁵. Este proceso depende del estado iónico de la molécula y de la conformación de la misma. Tal como es de esperar, el pH modifica tanto el estado iónico como la conformación de la molécula. A pH= 4 la conformación compacta de VAN resulta en la rápida formación de imida cíclica intermedia, en tanto que a pH=9 la conformación expandida de la molécula produce la imida cíclica intermedia de forma más lenta¹¹². Con lo cual, el pH presenta un papel clave en el aumento de estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN, ya que tal como se mencionó en el capítulo 3, los sistemas presentan valores de pH cercanos a 7. A estos valores de pH, VAN se degrada más lentamente que a pH=4, de acuerdo a lo mencionado previamente.

Mediante FT IR, al comparar los espectros de los componentes puros con los correspondientes a la MF y a EuE-VAN_{40%}, se observaron algunas diferencias significativas en la intensidad relativa y en la frecuencia de vibración de algunas de las bandas. Entre las cuales, es importante destacar una menor intensidad relativa entre la banda correspondiente a la vibración de tensión N-H del grupo amonio presente en EuE y O-H de los grupos ácido presentes en VAN (banda ancha a aproximadamente 3300 cm^{-1}) y las bandas correspondientes a la vibración de

estiramiento C-H (2816 cm^{-1} y 2770 cm^{-1}) en el espectro de EuE-VAN_{40%} respecto a MF.

Por otra parte, en el espectro de EuE-VAN_{40%} se observa un desplazamiento en la banda de vibración correspondiente al enlace C=O de los grupos éster de EuE, de 1713 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} y con menor intensidad relativa.

Además, las bandas de vibración características de amida secundaria, presentes en VAN alrededor de 1400 cm^{-1} , en el espectro de EuE-VAN_{40%} son poco visibles, mientras que se observan sin variaciones en el correspondiente a la MF. Del mismo modo, la banda de vibración C-O a 1060 cm^{-1} presente en el espectro de VAN, se observa sin cambios en el espectro de la MF.

Si bien mediante esa metodología no es posible asegurar el tipo de interacción que puede establecerse entre el polímero y el fármaco, los resultados permiten predecir la existencia de algún tipo de interacción iónica (puente hidrógeno) sólo presentes en las dispersiones EuE-VAN y no así en las MF. Además, un análisis semejante llevado a cabo con otros sistemas portadores de EuE desarrollados en nuestro grupo de investigación, con fármacos de estructura química más sencilla que VAN, permitió arribar a conclusiones semejantes^{69,96,97,115}.

Por su parte, por medio de experimentos de desplazamiento iónico con el agregado de una sal neutra, mostraron un aumento de pH; con lo cual, todos los estudios realizados podrían dar indicios de la reversibilidad en la interacción entre PE:F (posible interacción iónica).

En nuestro grupo de investigación hay evidencias de aumento de la estabilidad de IFAs inestables en solución al estar vehiculizado en sistemas PE:ATM¹¹⁴. Tal es el caso de azitromicina, un macrólido que presenta inestabilidad acuosa. Se evidenció un aumento de estabilidad al estar en interacción iónica con carbomer 934 (polielectrolito aniónico)¹³⁹. El aumento de estabilidad fue atribuido a la interacción ácido-base entre el polielectrolito y el grupo básico del fármaco. Dicha interacción produce una alta proporción de pares iónicos en los que las moléculas del fármaco permanecen asociadas al polímero¹¹⁴.

Por lo tanto, estos antecedentes permiten explicar el aumento de estabilidad de VAN en los sistemas EuE-VAN (sistemas PE:F). La estabilidad ampliada de VAN en



EuE-VAN a temperatura ambiente aseguraría su eficacia durante el período de tratamiento.

Los sistemas EuE-VAN poseen efecto bactericida frente a las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas en las concentraciones evaluadas, y potencian la acción bactericida de VAN frente a *S. aureus*. Este efecto bactericida por parte de los sistemas EuE-VAN frente a *P. aeruginosa* se logra con una concentración de VAN cuatro veces menor que la CBM. *P. aeruginosa* está fuera del espectro de acción de VAN. Vancomicina es un antimicrobiano de espectro restringido fundamentalmente a bacterias Gram positivas, siendo un ATM de uso controlado, indicado como alternativa ante la ineficacia de ATM de primera línea. Su mecanismo de acción es a nivel de la biosíntesis de la pared celular de bacterias en división, inhibiendo una de las etapas de síntesis de la capa de peptidoglicano⁷⁹. Se une a los precursores y altera la acción de la transglucosidasa por impedimento estérico. Las diferencias en la estructura de pared que exhiben las bacterias Gram negativas, presentando una bicapa fosfolipídica denominada membrana externa que recubre al peptidoglicano, dificultan el acceso de VAN a su sitio de acción, situación que conduce a la ineficacia de este antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas¹⁴⁰.

La mayor potenciación del efecto cuando la bacteria se encuentra en etapa muy activa de síntesis de sus componentes de pared es indicativo de que las alteraciones producidas por el polímero catiónico en la superficie de *P. aeruginosa* descritas en trabajos anteriores, aun cuando no tienen efecto bactericida en sí mismas, están propiciando el acceso de VAN a su sitio de acción, naturalmente impedida porque su gran volumen le impide atravesar la membrana externa.

Tal como se mostró en el capítulo 4, los efectos del polímero catiónico sobre las envolturas de *P. aeruginosa*, los experimentos de sensibilización de células procarionas con EuE a agentes líticos, por TEM, y por microscopía de fluorescencia, además de los antecedentes de nuestro grupo de investigación⁶⁹, posibilitan la llegada de VAN a la capa de peptidoglicano y así propician la acción antimicrobiana de este glicopéptido frente a una especie bacteriana que está fuera de su espectro de acción. La observación de células fluorescentes en los cultivos expuestos a EuE-VAN/Bodipy FL-VAN evidencia que VAN ingresa a *P. aeruginosa* FQ-R1. Las cargas positivas de EuE interaccionan con las envolturas bacterianas, alterando la estabilidad de las mismas,

permitiendo el acceso de VAN al sitio de acción descrito para este fármaco (la capa de mureína), normalmente inaccesible en bacterias Gram negativas, mientras que cultivos tratados con VAN/Bodipy FL-VAN, en ausencia de EuE, no muestran fluorescencia.

En el caso de *S. aureus*, VAN requiere concentraciones 16 x CIM para erradicar, mientras que EuE-VAN logra erradicar con 4 x CIM. Por lo tanto, los sistemas EuE-VAN presentan efecto bactericida en un rango de concentraciones más amplio respecto a VAN libre, mostrando a su vez mayor rapidez para exhibir tal efecto frente a *S. aureus* MRSA 61.

Las envolturas bacterianas tienen fundamentalmente cargas negativas¹⁰⁷. Los sistemas EuE-VAN tienen potencial Z positivo, con lo cual posibilitaría la interacción de los mismos con estas envolturas y potenciar la acción de los antimicrobianos. Esta interacción conlleva a cambios en el potencial electrocinético de la célula bacteriana y posterior desorganización de la membrana externa de *P. aeruginosa*, como se ha observado en trabajos previos⁶⁹. Esto último surge de la observación de la sensibilización a agentes líticos exhibida por *P. aeruginosa* expuesta a EuE. La acción permeabilizadora de la membrana externa de Gram negativos ya ha sido descrita para diversos polímeros catiónicos^{118,126,141}. Cabe destacar que la acción de sensibilización a agentes líticos es selectiva para células bacterianas respecto a células eucariotas (*C. albicans*).

A su vez, trabajos previos en nuestro grupo de investigación muestran que sistemas portadores constituidos por EuE, producen despolarización de la membrana citoplasmática de *P. aeruginosa* FQ R1 y *S. aureus* al utilizar DiBAC₄ (bis-(1,3-dibutyl ácido lbarbiturico) trimethine oxonol), una sonda fluorescente con propiedades lipofílicas cargada negativamente e incapaz de atravesar membranas polarizadas de células viables. Cuando existe depleción en el potencial de membrana de la célula, la sonda entra a la misma uniéndose en su interior a proteínas cargadas positivamente, y menos específicamente a regiones hidrofóbicas, exhibiendo fluorescencia¹⁴².

Las alteraciones mediadas por EuE permiten explicar la acción bactericida que exhiben estos sistemas EuE-VAN frente a *P. aeruginosa*, mientras el fármaco libre resulta ineficaz.



Por lo expuesto, la vehiculización de VAN en un sistema portador utilizando el polímero catiónico EuE, está contribuyendo a la eficacia del antimicrobiano generando acción bactericida frente a Gram negativos, aspecto que permite incluir en el espectro de acción de este antimicrobiano otras especies bacterianas.

Al evaluar el efecto del polímero sobre *biofilms* de *P. aeruginosa* FQ R1 se evidenció que EuE reduce tanto la formación del *biofilm* como la viabilidad celular de las células que forman el *biofilm* maduro.

Además, se observó que EuE-CIP reduce la viabilidad celular del *biofilm* maduro de manera más pronunciada que CIP a la misma concentración. Es decir, CIP en solución requiere mayor concentración para alcanzar similar efecto que la requerida cuando esta vehiculizada en EuE-CIP. Nuevamente, la vehiculización de CIP en sistemas portadores PE:ATM muestra la potenciación de CIP en células formando *biofilms*. En trabajos previos, se evidenció potenciación de la acción de ciprofloxacino (Fluoroquinolona) en dispersiones acuosas de EuE frente a *P. aeruginosa* FQ R1 en estado planctónico.

La matriz del *biofilm* de *P. aeruginosa*, tal como se mencionó en el capítulo 5, contiene una alta proporción de alginatos, entre otros componentes. Las cargas positivas presentes en EuE posiblemente se encuentren interactuando con dichos componentes, causando alteraciones en la integridad de la matriz y haciendo que CIP sea más accesible al *biofilm*.

Hay estudios que reportan las propiedades antibiofilm por la estructura policatiónica de quitosano (dada por la presencia de grupos amino) interactuando electrostáticamente con los componentes de la matriz del *biofilm* (EPS de carga polianiónica) de *P. aeruginosa*¹³⁰.

Un estudio sobre eficacia antibiofilm de nanopartículas de oro cubiertas con quitosano, evidencia que el posible mecanismo de inhibición y erradicación del *biofilm* maduro de *P. aeruginosa*, se debe a la interacción electrostática entre los nanocompuestos cargados positivamente y los grupos cargados negativamente presentes en la membrana bacteriana, así como los componentes del EPS, proteínas y ADN¹³⁴.

El uso de EuE como portador de antimicrobianos es una estrategia eficaz para mejorar la eficacia de los mismos en infecciones causadas por *biofilms*, además de su efecto sobre las células planctónicas.

Adicionalmente, estudios realizados en córnea de conejo (Test de Draize modificado) evidencian que en las concentraciones utilizadas, EuE produce cambios leves, reversibles a corto tiempo luego de la exposición, avalando la potencial utilización de dispersiones de este polímero en formulaciones para vía oftálmica⁹⁶.

Estos resultados son favorables y avalan el potencial uso de estos sistemas portadores para el diseño de una formulación para vía tópica u oftálmica, y en infecciones en las que es frecuente el desarrollo de *biofilms* que exhiben mayor resistencia a la terapia antimicrobiana convencional.

Además, existen reportes de la utilización de EuE para la fabricación de nanopartículas para mejorar la biodisponibilidad de gatifloxacina para en tratamiento de infecciones oculares.

Estos antecedentes, nos permiten avalar la utilización de EuE como portador de fármacos para el diseño de formulaciones de vía de administración oftálmica¹⁴³.

Considerando todo lo expuesto, los sistemas EuE-VAN y EuE-CIP constituyen una potencial alternativa de amplio espectro para infecciones oftálmicas que no poseen tratamiento adecuado (queratitis bacteriana) en la actualidad y son de interés para continuar en el desarrollo de una formulación para vía oftálmica.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas Regulación e Institutos, Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica & Instituto Nacional de Medicamentos. *Farmacopea Argentina*. (2010).
2. Mandal, S., Moudgil, M. & Mandal, S. K. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 90–100 (2009).
3. MacGowan, A. & Macnaughton, E. Antimicrobial therapy: principles of use. *Med. (United Kingdom)* **45**, 614–621 (2017).
4. Finch, R. G. The clinical evaluation of antibacterial drugs: Guidelines of the british society for antimicrobial chemotherapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 542–547 (1990).
5. Organización Mundial de la salud. *Resistencia a los Antimicrobianos*. (2018).
6. Frieri, M., Kumar, K. & Boutin, A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Heal. J. Infect. Public Heal.* **10**, 369–378 (2016).
7. Semret, M. & Haraoui, L. P. Antimicrobial Resistance in the Tropics. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **33**, 231–245 (2019).
8. Rather, I. A., Kim, B. C., Bajpai, V. K. & Park, Y. H. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 808–812 (2017).
9. Rice, L. B. Antimicrobial Stewardship and Antimicrobial Resistance. *Med. Clin. North Am.* **102**, 805–818 (2018).
10. Morley, V. J., Woods, R. J. & Read, A. F. Bystander Selection for Antimicrobial Resistance: Implications for Patient Health. *Trends Microbiol.* 1–14 (2019). doi:10.1016/j.tim.2019.06.004
11. Friedman, N. D., Temkin, E. & Carmeli, Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 416–422 (2016).



12. Forbes, B. A. *Diagnóstico Microbiológico*. (2009).
13. Forbes, B., Sahm, D. & Weissfeld, A. *Diagnóstico microbiológico*. (2009).
14. Talbot, G. H. *et al.* The Infectious Diseases Society of America's Initiative for Development of New Antibacterial Agents. 617–636 (2020).
15. (OMS), O. mundial de la salud. *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. (2017).
16. OMS. *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. (2017).
17. Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R. & Haldar, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* **27**, 323–338 (2019).
18. OMS. *Farmacorresistencia*. (2017).
19. Bruce, 2011. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).
20. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019).
21. Fischer, S. *et al.* Intraclonal genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *Environ. Microbiol. Rep.* **8**, 227–234 (2016).
22. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
23. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
24. Athanasiou, C. I. & Kopsini, A. Systematic review of the use of time series data in the study of antimicrobial consumption and *Pseudomonas aeruginosa* resistance. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **15**, 69–73 (2018).
25. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).

26. Morand, A. & Morand, J. J. *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. *Ann. Dermatol. Venereol.* **144**, 666–675 (2017).
27. Mosuela, R. *et al.* Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* onto surfactant-laden contact lenses. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **163**, 91–99 (2018).
28. Zhou, S. *et al.* Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **127**, 214–221 (2016).
29. Tascini, C. *et al.* Procalcitonin, white blood cell count and C-reactive protein as predictors of *S. aureus* infection and mortality in infective endocarditis. *Int. J. Cardiol.* (2019). doi:10.1016/j.ijcard.2019.08.013
30. Masters, E. A. *et al.* An in vitro platform for elucidating the molecular genetics of *S. aureus* invasion of the osteocyte lacuno-canalicular network during chronic osteomyelitis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **21**, 102039 (2019).
31. Khan, S. *et al.* Identification of pathogenic factors potentially involved in *Staphylococcus aureus* keratitis using proteomics. *Exp. Eye Res.* **151**, 171–178 (2016).
32. Putra, I. *et al.* *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin impairs corneal epithelial wound healing and promotes intracellular bacterial invasion. *Exp. Eye Res.* **181**, 263–270 (2019).
33. Marino, A., Blanco, A. R., Ginestra, G., Nostro, A. & Bisignano, G. Ex vivo efficacy of gemifloxacin in experimental keratitis induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **48**, 395–400 (2016).
34. Lakhundi, S., Siddiqui, R. & Khan, N. A. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microb. Pathog.* **104**, 97–109 (2017).
35. Review, S. & Design, S. Clinical and microbiological profile of infectious keratitis is an area of Madrid, Spain. *GEF Bull. Biosci.* **1**, 1–6 (2010).
36. Hasan, R., Acharjee, M. & Noor, R. Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains



- isolated from burn wound infections. *Tzu Chi Med. J.* **28**, 49–53 (2016).
37. Uhlemann, A., Otto, M., Lowy, F. D. & Deleo, F. R. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **21**, 563–574 (2014).
 38. Williamson, D. A., Coombs, G. W. & Nimmo, G. R. Staphylococcus aureus ‘Down Under’: Contemporary epidemiology of *S. aureus* in Australia, New Zealand, and the South West Pacific. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 597–604 (2014).
 39. Belete, T. M. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Hum. Microbiome J.* **11**, 100052 (2019).
 40. Moellering, R. C. Discovering new antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 2–9 (2011).
 41. Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K. & de la Fuente-Nunez, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *J. Mol. Biol.* **431**, 3547–3567 (2019).
 42. Pinto, I. B. *et al.* Utilization of antimicrobial peptides, analogues and mimics in creating antimicrobial surfaces and bio-materials. *Biochem. Eng. J.* **150**, 107237 (2019).
 43. Nordström, R. & Malmsten, M. *Delivery systems for antimicrobial peptides. Advances in Colloid and Interface Science* **242**, (Elsevier B.V, 2017).
 44. Kakasis, A. & Panitsa, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 16–21 (2019).
 45. Hansen, M. F., Svenningsen, S. Lo, Røder, H. L., Middelboe, M. & Burmølle, M. Big Impact of the Tiny: Bacteriophage–Bacteria Interactions in Biofilms. *Trends Microbiol.* 1–14 (2019). doi:10.1016/j.tim.2019.04.006
 46. Harada, L. K. *et al.* Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.* **212–213**, 38–58 (2018).
 47. Czajkowska-Kośnik, A., Szekalska, M. & Winnicka, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacol. Reports* **71**, 156–166 (2019).

-
48. Md, S. *et al.* Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **43**, 295–310 (2018).
 49. Debele, T. A., Mekuria, S. L. & Tsai, H. C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater. Sci. Eng. C* **68**, 964–981 (2016).
 50. García-González, C. A., Alnaief, M. & Smirnova, I. Polysaccharide-based aerogels - Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1425–1438 (2011).
 51. Walter, E., Kissel, T. & Amidon, G. L. The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **20**, 33–58 (1996).
 52. Hillery, A. M. Microparticulate delivery systems: Potential drug/vaccine carriers via mucosal routes. *Pharm. Sci. Technol. Today* **1**, 69–75 (1998).
 53. Li, C. *et al.* Recent progress in drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B* (2019). doi:10.1016/j.apsb.2019.08.003
 54. Meka, V. S. *et al.* A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov. Today* **22**, 1697–1706 (2017).
 55. García, M. C. *et al.* A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 236–246 (2016).
 56. García, M. C. *et al.* Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. *Carbohydr. Polym.* **175**, 75–86 (2017).
 57. Chevalier, M. T. *et al.* Preparation, characterization and in vitro evaluation of ϵ -polylysine-loaded polymer blend microparticles for potential pancreatic cancer therapy. *J. Microencapsul.* **34**, 582–591 (2017).
 58. Palena, M. C., García, M. C., Manzo, R. H. & Jimenez-Kairuz, A. F. Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs.



- Characterization and in vitro release evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **30**, 45–53 (2015).
59. Takakura, Y. & Hashida, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **18**, 207–231 (1995).
60. Hashemzadeh, H. & Raissi, H. Understanding Loading , Diffusion and Releasing of Doxorubicin and Paclitaxel Dual Delivery in Graphene and Graphene Oxide Carriers as Highly Corresponding E-mail : hraeisi@birjand.ac.ir Abstract : The adsorption mechanism of Doxorubicin (DOX) and Pacli. *Appl. Surf. Sci.* 144220 (2019). doi:10.1016/j.apsusc.2019.144220
61. Bakonyi, M. *et al.* Application of quality by design principles in the development and evaluation of semisolid drug carrier systems for the transdermal delivery of lidocaine. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **44**, 136–145 (2018).
62. Olivera, M. E., Manzo, R. H., Alovero, F., Jimenez-Kairuz, A. F. & Ramírez-Rigo, M. V. Polyelectrolyte-drug ionic complexes as nanostructured drug carriers to design solid and liquid oral delivery systems. in *Nanostructures for Oral Medicine* 365–408 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-47720-8.00014-6
63. Bourganis, V., Karamanidou, T., Kammona, O. & Kiparissides, C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **111**, 44–60 (2017).
64. Anirudhan, T. S., Sekhar V., C. & Nair, S. S. Polyelectrolyte complexes of carboxymethyl chitosan/alginate based drug carrier for targeted and controlled release of dual drug. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **51**, 569–582 (2019).
65. Guzman, M. L., Soria, E. A., Laino, C., Manzo, R. H. & Olivera, M. E. Reduced food interaction and enhanced gastrointestinal tolerability of a new system based on risedronate complexed with Eudragit E100: Mechanistic approaches from in vitro and in vivo studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **107**, 263–272 (2016).
66. Battistini, F. D. *et al.* The role of hyaluronan as a drug carrier to enhance the bioavailability of extended release ophthalmic formulations. Hyaluronan-

- timolol ionic complexes as a model case. *Eur. J. Pharm. Sci.* **105**, 188–194 (2017).
67. Quinteros, D. A., Allemandi, D. A. & Manzo, R. H. Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit E 100. *Sci. Pharm.* **80**, 487–496 (2012).
68. Engineering, B. Thermodynamic Modeling of Activity Coefficient and Prediction of Solubility: Part 2. Semipredictive or Semiempirical Models. *Online* **95**, 798–809 (2006).
69. Romero, V. SISTEMAS PORTADORES DE ANTIMICROBIANOS. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE POLÍMEROS ANIÓNICOS Y CATIÓNICOS EN EL DESEMPEÑO Y LA EFICACIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS. (Universidad Nacional de Córdoba, 2012).
70. Heng, L. Z. & Hamilton, R. D. Ocular emergencies. *Med. (United Kingdom)* **46**, 754–759 (2018).
71. Sharma, A. & Taniguchi, J. Review: Emerging strategies for antimicrobial drug delivery to the ocular surface: Implications for infectious keratitis. *Ocul. Surf.* **15**, 670–679 (2017).
72. Romero, V. L., Pons, P., Bocco, J. L., Manzo, R. H. & Alovero, F. L. Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **334**, 102–110 (2012).
73. Confidential, C. & Information, B. GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE (GRAS) NOTIFICATION FOR BASIC METHACRYLATE. (2017).
74. Patra, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Futur. J. Pharm. Sci.* **3**, 33–45 (2017).
75. Quinteros, D. A., Tártara, L. I., Palma, S. D., Manzo, R. H. & Allemandi, D. A. Ocular delivery of flurbiprofen based on Eudragit® E-flurbiprofen complex dispersed in aqueous solution: Preparation, characterization, in vitro corneal penetration, and ocular irritation. *J. Pharm. Sci.* **103**, 3859–3868 (2014).



76. Porfiryeva, N. N. *et al.* Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **562**, 241–248 (2019).
77. Lin, X. *et al.* Understanding the mechanism of dissolution enhancement for poorly water-soluble drugs by solid dispersions containing Eudragit® E PO. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **48**, 328–337 (2018).
78. Ministerio de Salud de la Nación & Administración Nacional de Alimentos Medicamentos y Tecnología médica. Monografía de Vancomicina Clorhidrato. in 4–5 (2016).
79. Hu, Q., Peng, H. & Rao, X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
80. Flórez, J. *Farmacología Humana*. (2008).
81. Rincón, S. *et al.* Resistance to ‘last resort’ antibiotics in gram-positive cocci: The post-vancomycin era. *Biomedica* **34**, 191–208 (2014).
82. Jefferies, J. G., Aithie, J. M. S. & Spencer, S. J. Vancomycin-soaked wrapping of harvested hamstring tendons during anterior cruciate ligament reconstruction. A review of the ‘vancomycin wrap’. *Knee* **26**, 524–529 (2019).
83. Jean, S. S., Hsieh, T. C., Ning, Y. Z. & Hsueh, P. R. Role of vancomycin in the treatment of bacteraemia and meningitis caused by *Elizabethkingia meningoseptica*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**, 507–511 (2017).
84. Zhou, P. *et al.* Synergistic effect of vancomycin and L-homocarnosine alleviates *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis in rats. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 31–35 (2019).
85. Huang, D. B., Noviello, S., Balsler, B., Scaramucci, A. & Corey, G. R. A Pooled Analysis of the Safety and Efficacy of Iclaprim Versus Vancomycin for the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections in Patients With Intravenous Drug Use: Phase 3 REVIVE Studies. *Clin. Ther.* **41**, 1090–1096 (2019).

-
86. Huon, J. F. *et al.* Linezolid versus vancomycin cost in the treatment of staphylococcal pneumonia. *Médecine Mal. Infect.* 1–5 (2019). doi:10.1016/j.medmal.2019.07.012
 87. Petersiel, N. *et al.* β -lactam antibiotics vs. vancomycin for the early treatment of enterococcal bacteraemia: A retrospective cohort study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 761–766 (2019).
 88. Gentry, C. A. *et al.* Fidaxomicin versus oral vancomycin for severe *Clostridium difficile* infection: a retrospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 987–993 (2019).
 89. Flokas, M. E., Karageorgos, S. A., Detsis, M., Alevizakos, M. & Mylonakis, E. Vancomycin-resistant enterococci colonisation, risk factors and risk for infection among hospitalised paediatric patients: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 565–572 (2017).
 90. NIH. Ciprofloxacin. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764>.
 91. Lagacé-wiens, E. R. P. SECTION 7 Anti-infective Therapy 144. **47**, 3–8 (2001).
 92. Lin, W. *et al.* Low nutrient levels as drinking water conditions can reduce the fitness cost of efflux pump-mediated ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Environ. Sci. (China)* **83**, 123–132 (2019).
 93. Zhou, H. *et al.* Identification and expression analyses of new genes associated with ciprofloxacin resistance in *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Res. Int.* **125**, 108629 (2019).
 94. Kuang, D. *et al.* Emerging high-level ciprofloxacin resistance and molecular basis of resistance in *Salmonella enterica* from humans, food and animals. *Int. J. Food Microbiol.* **280**, 1–9 (2018).
 95. Hassanzadeh, S. *et al.* Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Microb. Pathog.* **111**, 71–74 (2017).
 96. Quinteros, D. A. Desarrollo de nuevas estrategias de formulación de fármacos



- mediante el acomplejamiento con polielectrolitos. (Universidad Nacional de Córdoba, 2010).
97. Guzmán, M. L. DESARROLLO Y EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA BASADOS EN POLIELECTROLITOS CATIÓNICOS COMO PORTADORES DE FÁRMACOS. (Universidad Nacional de Córdoba, 2013).
 98. Jesús Valle, M. J. de, López, F. G. & Navarro, A. S. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 835–839 (2008).
 99. Patel, J. B. *et al. Clinical and Laboratory Standards Institute.* (2015).
 100. Zapata, A. & Ramirez-Arcos, S. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. *Curr. Microbiol.* **70**, 907–909 (2015).
 101. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**, 449–461 (1998).
 102. AppliChem. Cell Proliferation Assay XTT: AppliChem - BioChemica.Chemica.Synthesis.Service. (2014).
 103. American Type Culture Collection. XTT Cell Proliferation Assay Kit by Cellular Enzymes. 6 (1988).
 104. Imperiale, J. C., Acosta, G. B. & Sosnik, A. Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. *J. Control. Release* **285**, 106–141 (2018).
 105. Antipas, A. S., Velde, D. Vander & Stella, V. J. Factors affecting the deamidation of vancomycin in aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* **109**, 261–269 (1994).
 106. Firestone, B. A., Dickason, M. A. & Tran, T. Solubility characteristics of three fluoroquinolone ophthalmic solutions in an in vitro tear model. *Int. J. Pharm.* **164**, 119–128 (1998).
 107. Dong, H., Tang, X., Zhang, Z. & Dong, C. Structural insight into lipopolysaccharide transport from the Gram-negative bacterial inner membrane to the outer

- membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1461–1467 (2017).
108. Sandri, G. *et al.* Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. *Int. J. Pharm.* **426**, 1–6 (2012).
109. Sengupta, P., Chatterjee, B. & Tekade, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *Int. J. Pharm.* **543**, 328–344 (2018).
110. Ercolano, I., Pizzorno, M. T. & Vidal, M. *ESTABILIDAD DE DROGAS Y MEDICAMENTOS*. (2009).
111. Maggio, R. M., Vignaduzzo, S. E. & Kaufman, T. S. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **49**, 57–70 (2013).
112. Antipas, A. S., Vander Velde, D. G., Jois, S. D. S., Siahaan, T. & Stella, V. J. Effect of conformation on the rate of deamidation of vancomycin in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* **89**, 742–750 (2000).
113. CLIFTON, F. & STROMAN, R. Compounded Ophthalmic Solution. **55**, 1996–1998 (1998).
114. Esteban, S. L., Manzo, R. H. & Alovero, F. L. Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties. *Int. J. Pharm.* **366**, 53–57 (2009).
115. Guzmán, M. L., Manzo, R. H. & Olivera, M. E. Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine. *Mol. Pharm.* **9**, 2424–2433 (2012).
116. Morosini, M. I. & Cantón, R. Tolerance and heteroresistance in gram-positive microorganisms. *Med. Clin. (Barc)*. **135**, 16–22 (2010).
117. Oliveira, G. A., Okada, S. S., Guenta, R. S. & Mamizuka, E. M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **37**, 239–246 (2001).
118. Muñoz-Bonilla, A. & Fernández-García, M. Polymeric materials with



- antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 281–339 (2012).
119. Rathore, H. S. *et al.* Fabrication and characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: A comparative study. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **18**, 101078 (2019).
 120. Nouri, A., Yarakı, M. T., Ghorbanpour, M., Agarwal, S. & Gupta, V. K. Enhanced Antibacterial effect of chitosan film using Montmorillonite/CuO nanocomposite. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 1219–1231 (2018).
 121. Nicolosi, D., Scalia, M., Nicolosi, V. M. & Pignatello, R. International Journal of Antimicrobial Agents Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 553–558 (2010).
 122. Stadtländer, K. Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes : Challenges and Opportunities. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.* 122–131 (2007).
 123. Cama, J., Henney, A. M. & Winterhalter, M. Breaching the Barrier: Quantifying Antibiotic Permeability across Gram-negative Bacterial Membranes. *J. Mol. Biol.* **431**, 3531–3546 (2019).
 124. Fowler, L. H. & Lee, S. Antibiotic Trends Amid Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Intensive Care Units. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* **29**, 111–118 (2017).
 125. Hooda, Y. & Moraes, T. F. Translocation of lipoproteins to the surface of gram negative bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **51**, 73–79 (2018).
 126. Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 235–244 (2001).
 127. Hošťacká, A., Čižnár, I., Slobodníková, L. & Kotulová, D. Clinical pseudomonas aeruginosa: Potential factors of pathogenicity and resistance to antimicrobials. *Folia Microbiol. (Praha)*. **51**, 633–638 (2006).
 128. Ghafoor, A., Hay, I. D. & Rehm, B. H. A. Role of exopolysaccharides in

- Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5238–5246 (2011).
129. Wu, Y. T., Tam, C., Zhu, L. S., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. J. Human Tear Fluid Reduces Culturability of Contact Lens-Associated *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms but Induces Expression of the Virulence-Associated Type III Secretion System. *Ocul. Surf.* **15**, 88–96 (2017).
130. Khan, F. *et al.* Synthesis and characterization of chitosan oligosaccharide-capped gold nanoparticles as an effective antibiofilm drug against the *Pseudomonas aeruginosa* PA01. (2019).
131. Cardoso, M. H. *et al.* A short peptide with selective anti-biofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Microb. Pathog.* **135**, 103605 (2019).
132. Yuan, Y. *et al.* Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Pathog.* **128**, 329–336 (2019).
133. Lekbach, Y. *et al.* *Salvia officinalis* extract mitigates the microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bioelectrochemistry* **128**, 193–203 (2019).
134. Khan, F. *et al.* Antibiofilm and antivirulence properties of chitosan-polypyrrole nanocomposites to *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* **128**, 363–373 (2019).
135. Zheng, Z., Huyan, Y., Li, H., Sun, S. & Xu, Y. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Sensors Actuators B. Chem.* 127065 (2019). doi:10.1016/j.snb.2019.127065
136. Niu, G. & Li, W. Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance. *Trends Biochem. Sci.* 1–12 (2019). doi:10.1016/j.tibs.2019.05.005
137. Koulenti, D. *et al.* Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: What's new in our arsenal and what's in the pipeline? *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 211–224 (2019).



138. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019).
139. Esteban, S. L. SISTEMAS POLIMÉRICOS PORTADORES DE MACRÓLIDOS. DISEÑO Y EVALUACIÓN. (Universidad Nacional de Córdoba, 2007).
140. Mo, Y., Lorenzo, M., Farghaly, S., Kaur, K. & Housman, S. T. What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **93**, 171–181 (2019).
141. Lefebvre, E., Vighetto, C., Di Martino, P., Larreta Garde, V. & Seyer, D. Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antiseptics, enzymes and EDTA: a study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **48**, 181–188 (2016).
142. MASON, D. J., ALLMAN, R., STARK, J. M. & LLOYD, D. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* **176**, 8–16 (1994).
143. Reimondez-Troitiño, S., Csaba, N., Alonso, M. J. & De La Fuente, M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **95**, 279–293 (2015).

PRESENTACIONES A CONGRESOS
RELACIONADOS A LA ETAPA DE TESIS
DOCTORAL



PRESENTACIONES A CONGRESOS RELACIONADOS A LA ETAPA DE TESIS DOCTORAL

- ✓ **“SISTEMA POLIMÉRICO PORTADOR DE VANCOMICINA EXHIBE ACCIÓN BACTERICIDA FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRESISTENTE”**. Corti M., Rosset C., Guzman L., Campagno L., Manzo, R., Olivera ME, Alovero F*. VI Congreso iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Pabellón Argentina, UNC, Córdoba, Argentina, 02 al 06 de Noviembre del 2015.

- ✓ **“NUEVO TRABAJO DE CAMPO PARA PROMOVER EL APRENDIZAJE DE LAS NORMATIVAS DEL ÁREA FARMACIA ASISTENCIAL”**. Corti M.*, García M.*, Garnero C. VI Congreso iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Pabellón Argentina, UNC, Córdoba, Argentina, 02 al 06 de Noviembre del 2015.

- ✓ **“POLÍMERO CATIONICO REDUCE LA FORMACIÓN DE *BIOFILM* Y VIABILIDAD CELULAR DE *P. aeruginosa*”**. Corti M., Colque A, Manzo R, Smania A, Alovero F*. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología, Rosario, Argentina, Septiembre del 2016.

- ✓ **“CATIONIC POLYMER INDUCES SENSITIZATION TO THE ACTION OF LYTIC AGENTS IN *Pseudomonas aeruginosa* WITHOUT AFFECTING *Candida albicans*”**. Corti M., Sanchez M, Alovero F*. 4ta Reunión internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina, 27 y 28 de Octubre del 2016.

- ✓ **“POLÍMERO CATIONICO PROPICIA EL INGRESO DE VANCOMICINA A *Pseudomonas aeruginosa* Y CONTRIBUYE A SU EFICACIA”**. Corti Melisa, Alovero Fabiana. 5º Congreso Argentino de Microscopía. La Falda. Córdoba (Mayo2018).



- ✓ **“IMPLEMENTACIÓN DE UN TRABAJO PRÁCTICO INTEGRADO ENTRE ELEMENTOS DE BROMATOLOGÍA Y ANÁLISIS FARMACÉUTICO II”.** *Corti, Melisa B.; Quiroga Ezequiel D.; Apas, Ana L.; Camacho, Nahuel; Ortega, María G; Alovero, Fabiana L.* I Jornadas Nacionales de Enseñanza de Farmacia y Bioquímica. UCC. Córdoba (Septiembre 2018) **(MENCIÓN ESPECIAL)**

- ✓ **SISTEMA PORTADOR DE VANCOMICINA CON INCREMENTADA ESTABILIDAD Y MAYOR ESPECTRO DE ACCIÓN.** *Corti, Melisa B.; Sterren Vanesa, Longhi Marcela, Alovero Fabiana.* 5º Reunión internacional de Ciencias Farmacéuticas. La Punta. San Luis (Noviembre 2018). **(PRIMER PREMIO)**

- ✓ **THE EFFICACY OF VANCOMYCIN AGAINST *Staphylococcus aureus* IS ENHANCED BY THE ACTION OF A CATIONIC POLYMER.** *Corti, Melisa B; Romero, Verónica, Alovero Fabiana.* Reunión anual de sociedades de biociencias. Mar del plata, Buenos Aires (Noviembre 2019). Trabajo pre seleccionado para premio.