

4. METODOLOGÍA

4.1 Equipo Utilizado

Equipo disponible en el Laboratorio de Análisis Instrumental (CI-110) y en el Laboratorio de Investigación en Nanotecnología (CI-010) de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP).

- Espectrofotómetro de UV-Visible Varian Cary 100 Conc.
- Equipo para la determinación de Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés) Microtrac Nanowave II DLS
- Lector de Absorbancia ELx800 de Biotek.

Equipo disponible en el Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería (Department of Materials Science and Engineering) de la Universidad Johns Hopkins.

- Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

4.2 Reactivos

- Alginato de sodio – $C_6H_7O_6Na$
- Alcohol polivinílico (PVA) – $(C_2H_4O)_n$
- Dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT) – $C_{20}H_{37}NaO_7S$
- Cloruro de calcio – $CaCl_2$
- Agua destilada
- Etanol grado reactivo
- Agar Mueller Hinton
- Caldo Mueller Hinton

- Caldo nutritivo
- Tween 80
- Fosfato monobásico de sodio – NaH_2PO_4
- Fosfato dibásico de sodio – Na_2HPO_4
- Cloruro de sodio – NaCl
- Ciprofloxacino – $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{FO}_3$
- Amoxicilina - $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$
- Membranas de diálisis planas, ancho 25mm, MWCO 12000 Da

Todas las sustancias y solventes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich grado reactivo y no fueron purificados para su uso. El nombre comercial del ciprofloxacino utilizado es Z-Xin®, tabletas de 500mg, preparado por los laboratorios BIOMEF. El nombre comercial de la amoxicilina utilizada es Gimlaxina®, cápsulas con 500mg preparadas por laboratorios Collins.

4.3 Procedimiento general de síntesis de nanocápsulas de alginato de calcio

4.3.1 Preparación de soluciones

Las nanocápsulas obtenidas se sintetizaron por el método de emulsificación cruzada reportado previamente por Chavanpatil, Khair y Panyam (2007), con ligeras modificaciones. Las soluciones se prepararon *de novo* para cada síntesis, especialmente para evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes. El método general a seguir fue el siguiente:

4.3.2 Procedimiento

En un vaso de precipitados de 20ml seco se emulsiona la solución de alginato de sodio acuoso al 1% con la solución de AOT al 2% durante 1 minuto en baño de hielo. Es importante mantener la agitación magnética y el baño de hielo de la solución durante todo el proceso. Pasado el minuto, se añaden 9ml de la solución de PVA al 2% y se emulsiona durante 1 minuto. Pasado el tiempo de emulsión, la solución se retira del baño de hielo y se transfiere a un matraz de bola de 25ml. Se añaden 6ml de la solución de cloruro de calcio, formándose una solución de dos fases definidas. Esta solución se mantiene en agitación magnética durante 18-24 horas para la evaporación del cloruro de metileno. Se conserva a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco.

4.4. Síntesis de nanocápsulas de alginato de calcio conteniendo antibióticos comerciales

4.4.1 Preparación de soluciones

- La tableta de antibiótico se pulveriza utilizando un mortero con pistilo y añadiendo agua destilada para facilitar su pulverización. El antibiótico se resuspende en 2-3ml de agua y se filtra al vacío utilizando un Matraz Kitasato de 50ml. Esta solución se añade al alginato de sodio al 1% en una relación 5mg de antibiótico por ml de solución. Se prepara una solución de amoxicilina y otra de ciprofloxacino.

4.4.2 Procedimiento

En un vaso de precipitados de 20ml seco se emulsiona la solución de alginato de sodio acuoso al 1%, preparado con el antibiótico, con la solución de AOT al 2% durante 1 minuto en baño de hielo. Es importante mantener la agitación magnética y el baño de hielo de la solución

durante todo el proceso. Pasado el minuto, se añaden 9ml de la solución de PVA al 2% y se emulsiona durante 1 minuto. Pasado el tiempo de emulsión, la solución se retira del baño de hielo y se transfiere a un matraz de bola de 25ml. Se añaden 6ml de la solución de cloruro de calcio, formándose una solución de dos fases definidas. Esta solución se mantiene en agitación magnética durante 18-24 horas para la evaporación del cloruro de metileno. Se conserva a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco. Se obtienen como resultado, dos soluciones: una conteniendo amoxicilina, y otra conteniendo ciprofloxacino (Chavanpatil, M. et al, 2007).

4.5 Caracterización de los productos

La caracterización de los productos obtenidos se llevó a cabo por medio de Dispersión Dinámica de Luz, en donde se pudo analizar el tamaño promedio de nanocápsulas en suspensión y su distribución. Se obtuvieron algunas imágenes de las suspensiones utilizando Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

4.6 Determinación de actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana se llevó a cabo el método de Kirby-Bauer de difusión en agar. Las cepas, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la UDLAP, utilizadas para realizar esta prueba son:

- *Staphylococcus aureus*, bacteria grampositiva
- *Bacillus subtilis*, bacteria grampositiva
- *Proteus Mirabilis*, bacteria gramnegativa
- *Escherichia coli*, bacteria gramnegativa

Primero se prepara el agar Mueller Hinton de acuerdo a las instrucciones del reactivo. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos los discos de papel filtro previamente cortado, los hisopos, puntillas y el agar preparado. Posteriormente se preparan las placas con agar Mueller Hinton y se dejan enfriar hasta que el agar esté preparado para inoculación. Se preparan las soluciones estériles de las suspensiones de nanocápsulas. Para ello se hacen pasar a través de filtros Millipore de 0.22 micras en un medio estéril (creado con el uso de mecheros encendidos).

Las bacterias antes mencionadas se siembran por difusión en toda la placa, tratando de crear una capa uniforme sobre el medio. Los discos de papel filtro se impregnan con 10 microlitro de las soluciones estériles de nanocápsulas. Se colocan en las placas de Petri, tratando de que mantengan una separación considerable, y se etiquetan apropiadamente. Se utilizan discos de ciprofloxacino y amoxicilina comerciales como controles positivos, y la suspensión de nanocápsulas solas se utiliza como control negativo de la prueba. Al final, la distribución de la placa debe quedar lo más homogénea y óptima posible para la visualización de los halos de inhibición (ver figura 9). Una vez terminada la inoculación y posicionamiento de los discos, las placas se dejan en incubación a 37°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se mide el halo de inhibición obtenido para cada caso.

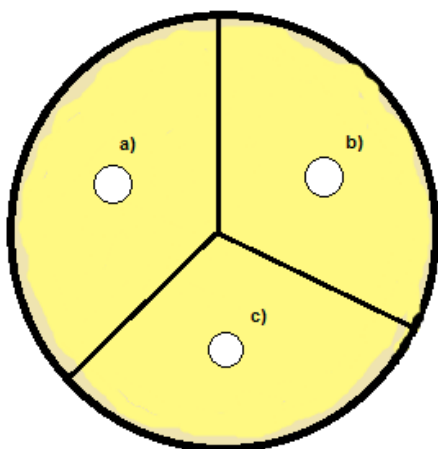


Figura 9. Esquema general para las pruebas antimicrobianas por medio del método de Difusión en agar.

a). Se coloca el disco impregnado con la solución de nanocápsulas sin fármaco. Las bacterias se representan de color amarillo. b). Se coloca el disco conteniendo el antibiótico comercial. c). Se coloca el disco impregnado con la solución de nanocápsulas conteniendo el principio activo del antibiótico. Este procedimiento se hace para cada antibiótico enfrentado a todas las bacterias.

4.7 Determinación de la influencia de la concentración del surfactante en el tamaño de nanocápsula

4.7.1. Preparación de soluciones

- Las soluciones se preparan de acuerdo a lo indicado en el punto 4.3.1 y 4.4.1 de la metodología.

4.7.2 Procedimiento

En un vaso de precipitados de 20ml seco se emulsiona la solución de alginato de sodio acuoso al 1%, preparado con el antibiótico, con la solución de AOT al 2% durante 1 minuto en baño de hielo. Es importante mantener la agitación magnética y el baño de hielo de la solución durante todo el proceso. Pasado el minuto, se añaden 9ml de la solución de PVA al 2% y se emulsiona durante 1 minuto. Pasado el tiempo de emulsión, la solución se retira del baño de hielo y se transfiere a un matraz de bola de 25ml. Se añaden 6ml de la solución de cloruro de calcio, formándose una solución de dos fases definidas. Finalmente, se añaden diferentes

cantidades de surfactante Tween 80 de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1. Esta solución se mantiene en agitación magnética durante 18-24 horas para la evaporación del cloruro de metileno. Se conserva a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco. El procedimiento se repite para cada tipo de solución (nanocápsulas sin fármaco, nanocápsulas con amoxicilina y nanocápsulas con ciprofloxacino) y para cada concentración añadida de surfactante (Tabla 1).

Número de síntesis	Cantidad de Tween 80 (μl)
1	0
2	30
3	60
4	90
5	110
6	130

Tabla 1. Cantidad de surfactante Tween 80 añadido para cada síntesis efectuada.

4.8 Estudio cinético de liberación de fármacos

4.8.1 Preparación de soluciones

- Para la prueba en solución salina se añaden 8.5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada, obteniendo una solución al 0.85%(p/v). Se prepararon 12 litros en total.

- Para la preparación del buffer de fosfatos se añaden 7.754g de fosfato monobásico de sodio y 14.2 g de fosfato dibásico de sodio en 1 litro de agua destilada, obteniendo una solución con pH de 7.4. Se prepararon 12 litros en total.
- La tercera solución consiste en agua destilada. Se utilizaron 12 litros en total.
- Se preparan las soluciones estériles de las suspensiones de nanocápsulas. Para ello se hacen pasar a través de filtros Millipore de 0.22 micras en un medio estéril (creado con el uso de mecheros encendidos). Se prepara una solución estéril para cada tipo de solución (nanocápsulas sin fármaco, nanocápsulas con amoxicilina y nanocápsulas con ciprofloxacino).

4.8.2 Procedimiento

4.8.2.1 Curva de calibración

Para la curva de calibración, se miden las absorbancias en el espectro UV-visible para las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de los antibióticos (ciprofloxacino y amoxicilina) en cada uno de los buffers (agua destilada, solución salina al 0.85% y buffer de fosfatos con pH 7.4).

4.8.2.2 Toma de muestras

Se coloca el buffer en un vaso de precipitados de 1 litro. Una alícuota de 3ml de la solución de nanocápsulas se coloca dentro de la membrana de diálisis. La membrana a su vez, se coloca dentro del vaso de precipitados que contiene el buffer y se prensa utilizando pinzas de plástico para no afectar la difusión de la membrana. Se cubre la superficie del vaso con aluminio para evitar desviaciones importantes por la presencia de polvo u otros agentes

externos. La temperatura debe mantenerse a 37°C. Para ello, colocamos la solución en baño maría y monitoreamos la temperatura constantemente durante la prueba. Se obtienen alícuotas del medio de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2. Este procedimiento se lleva a cabo para cada tipo de solución (nanocápsulas sin fármaco, nanocápsulas con amoxicilina y nanocápsulas con ciprofloxacino) en cada uno de los buffers.

Muestra	Hora	Hora real
1	0	9:00
2	1	10:00
3	2	11:00
4	3	12:00
5	4	13:00
6	5	14:00
7	6	15:00
8	9	18:00
9	12	21:00
10	17	2:00
11	24	9:00

Tabla 2. Número de muestra y hora a la que se toma la alícuota del medio

4.9 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

4.9.2 Procedimiento

Utilizando una placa de ELISA, se agregan 160µl de caldo Mueller Hinton y 20µl de cada tipo de solución de nanocápsulas esteril, de acuerdo a lo establecido en la Tabla 3. Finalmente, se agregan 5µl de los cultivos de bacterias ajustados al estándar 1 McFarland, en el orden establecido en la Tabla 3. Es importante añadir los controles como se establece en esta tabla. El caldo Mueller Hinton funge como el control negativo y los cultivos de bacterias sin adición de nanocápsulas son el control positivo. A partir de las soluciones estériles se hacen diluciones hasta 10^{-4} para cada tipo de solución utilizando agua destilada como solvente. Las absorbancias obtenidas para las soluciones de nanocápsulas deben ser restadas de las absorbancias obtenidas experimentalmente para el resto de los pozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCA <i>Proteus</i>	NCA 10^{-1} <i>Proteus</i>	NCA 10^{-2} <i>Proteus</i>	NCA 10^{-3} <i>Proteus</i>	NCA 10^{-4} <i>Proteus</i>	NCA <i>Bacillus</i>	NCA 10^{-1} <i>Bacillus</i>	NCA 10^{-2} <i>Bacillus</i>	NCA 10^{-3} <i>Bacillus</i>	NCA 10^{-4} <i>Bacillus</i>	NCA+A 10^{-4} <i>S aureus</i>	NCA+A 10^{-4} <i>E.coli</i>
B	NCA <i>S aureus</i>	NCA 10^{-1} <i>S aureus</i>	NCA 10^{-2} <i>S aureus</i>	NCA 10^{-3} <i>S aureus</i>	NCA 10^{-4} <i>S aureus</i>	NCA <i>E.coli</i>	NCA 10^{-1} <i>E.coli</i>	NCA 10^{-2} <i>E.coli</i>	NCA 10^{-3} <i>E.coli</i>	NCA 10^{-4} <i>E.coli</i>	NCA+A 10^{-3} <i>S aureus</i>	NCA+A 10^{-3} <i>E.coli</i>
C	NCA +C <i>Proteus</i>	NCA +C 10^{-1} <i>Proteus</i>	NCA +C 10^{-2} <i>Proteus</i>	NCA +C 10^{-3} <i>Proteus</i>	NCA +C 10^{-4} <i>Proteus</i>	NCA +C <i>Bacillus</i>	NCA +C 10^{-1} <i>Bacillus</i>	NCA +C 10^{-2} <i>Bacillus</i>	NCA +C 10^{-3} <i>Bacillus</i>	NCA +C 10^{-4} <i>Bacillus</i>	NCA+A 10^{-2} <i>S aureus</i>	NCA+A 10^{-2} <i>E.coli</i>
D	NCA +C <i>S aureus</i>	NCA +C 10^{-1} <i>S aureus</i>	NCA +C 10^{-2} <i>S aureus</i>	NCA +C 10^{-3} <i>S aureus</i>	NCA +C 10^{-4} <i>S aureus</i>	NCA +C <i>E.coli</i>	NCA +C 10^{-1} <i>E.coli</i>	NCA +C 10^{-2} <i>E.coli</i>	NCA +C 10^{-3} <i>E.coli</i>	NCA +C 10^{-4} <i>E.coli</i>	NCA+A 10^{-1} <i>S aureus</i>	NCA+A 10^{-1} <i>E.coli</i>

E	NCA+A <i>Proteus</i>	NCA+A 10 ⁻¹ <i>Proteus</i>	NCA+A 10 ⁻² <i>Proteus</i>	NCA+A 10 ⁻³ <i>Proteus</i>	NCA+A 10 ⁻⁴ <i>Proteus</i>	NCA+A <i>Bacillus</i>	NCA+A 10 ⁻¹ <i>Bacillus</i>	NCA+A 10 ⁻² <i>Bacillus</i>	NCA+A 10 ⁻³ <i>Bacillus</i>	NCA+A 10 ⁻⁴ <i>Bacillus</i>	NCA+A <i>S aureus</i>	NCA+A <i>E.coli</i>
F	NCA 10 ⁻¹	NCA 10 ⁻²	NCA 10 ⁻³	NCA 10 ⁻⁴	NCA+A 10 ⁻¹	NCA+A 10 ⁻²	NCA+A 10 ⁻³	NCA+A 10 ⁻⁴				
G	NCA +C 10 ⁻¹	NCA +C 10 ⁻²	NCA +C 10 ⁻³	NCA +C 10 ⁻⁴								
H	Caldo Mueller Hinton	NCA	NCA+A	NCA+C		<i>Proteus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>S aureus</i>	<i>E.coli</i>			

Tabla 3. Esquema general para realizar las pruebas de concentración mínima inhibitoria en placa de ELISA.

La tabla representa una placa Elisa, mostrando el orden en el que se llenan los pozos y las sustancias con las que se llenan. Se agregan en los pozos indicados 20µl de nanocápsulas sin antibiótico (NCA), nanocápsulas con amoxicilina (NCA+A) y nanocápsulas con ciprofloxacino (NCA+C).