

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de nanocápsulas poliméricas conteniendo antibióticos comerciales (amoxicilina y ciprofloxacino). Se sintetizaron a partir de un método de emulsificación cruzada, obteniendo nanocápsulas con una membrana constituida por una bicapa de AOT y un núcleo constituido por una matriz polimérica de alginato de calcio, en donde se depositó el fármaco y a través de la cual éste difunde para su liberación. Las nanocápsulas fueron caracterizadas utilizando DLS y TEM.

Para optimizar su síntesis, fue necesario incorporar el surfactante Tween 80, logrando así obtener diámetros de nanopartículas que rondaban entre los 10-20nm. A partir de ello, se determinó la influencia de la concentración de surfactante añadido en el tamaño de nanocápsula, encontrando que el tamaño de partícula puede ser controlado de esta manera y que presenta una relación inversamente proporcional entre la cantidad de surfactante añadido y el diámetro de nanopartícula.

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión en agar. Los resultados observados fueron muy gratificantes, demostrando que las nanocápsulas preparadas, que contenían 10 veces menos concentración que la de los controles (antibióticos comerciales), presentaron halos de inhibición similares. Con ello se demostró que los nanofármacos tuvieron potencialmente una mayor eficacia, pues con menor concentración del fármaco, presentaron una actividad antimicrobiana muy similar a la de los antibióticos comerciales.

Tras medir la actividad antimicrobiana en las suspensiones de nanocápsulas sin Tween 80, hicimos la misma determinación para las soluciones preparadas con el surfactante.

Encontramos que los radios de inhibición fueron similares de los de las nanocápsulas sin surfactante, indicando que el Tween 80 no tiene efecto sobre la actividad antimicrobiana de los nanofármacos. Asimismo, se concluyó que el tamaño de nanopartícula no tiene un papel importante en la actividad antimicrobiana *in vitro*, pero que la tiene en la actividad *in vivo* pues de ello depende la difusión efectiva a través de la membrana celular, lo que permite una mayor acumulación y biodisponibilidad en el sitio de acción intracelular de los antibióticos.

Se midió el pH de las soluciones antes y después de la adición del surfactante Tween 80 y se observó que el pH decrece significativamente con la presencia del surfactante en la solución. Se recomienda no descartar la posibilidad de toxicidad por el pH ácido de las soluciones en otros modelos de estudio o buscar un surfactante alternativo que tenga el mismo potencial de estabilizar estéricamente las suspensiones de nanocápsulas pero sin disminuir el pH de las mismas.

A continuación, se determinó la cinética de liberación de los diferentes tipos de soluciones en tres tipos de sistemas amortiguadores: agua, PBS y solución salina al 0.85%. Se encontró que tanto amoxicilina como ciprofloxacino disminuyen su solubilidad en el medio PBS, por lo que la cinética para este buffer no pudo determinarse de manera significativa. La amoxicilina en solución salina tampoco tuvo resultados significativos, corroborando que su solubilidad disminuye en presencia de sales.

La cinética de liberación para las suspensiones de nanocápsulas con amoxicilina y ciprofloxacino pudieron determinarse en agua, encontrando que para las nanocápsulas con amoxicilina a las 9 horas la gráfica empieza a tener un comportamiento asintótico que podría suceder porque la liberación del fármaco se consigue casi por completo, porque se alcanza

un estado de equilibrio de desorción y adsorción o por la saturación del medio. Este comportamiento se presenta para las nanocápsulas con ciprofloxacino a las 6 horas y para las nanocápsulas con ciprofloxacino en solución salina a las 4 horas. A pesar de que se obtuvieron cinéticas de liberación de orden cero para los tres casos, las ecuaciones establecidas presentaron r^2 poco representativas, por lo que no son efectivas en la descripción del comportamiento de liberación para todos los casos.

Se recomienda repetir las pruebas de liberación en PBS y en soluciones con pH más ácido para conocer el comportamiento en este tipo de medios. También es preciso mencionar que estudiar la cinética de este tipo de sistemas poliméricos es complicado por las bajas concentraciones detectables que se liberan. Es necesario estudiar las alícuotas obtenidas con otros equipos cuya sensibilidad sea mayor y detecte concentraciones muy bajas, por ejemplo con cromatografía de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Alternativamente, pueden llevarse a cabo el procedimiento utilizando más de 3 mL de solución inicial, para poder medir una mayor concentración de fármaco liberado.

Finalmente, se buscó determinar la CMI de los nanofármacos en diferentes cepas bacterianas, encontrando que para las nanocápsulas con amoxicilina la inhibición del crecimiento bacteriano se logra exclusivamente con las suspensiones estériles sin dilución. Para las cepas de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* no se observó inhibición del crecimiento bacteriano con ninguna de las suspensiones de nanocápsulas con amoxicilina. Por su parte, para las nanocápsulas con ciprofloxacino, se encontró que la inhibición bacteriana se lograba entre las diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} de la suspensión estéril original, dependiendo del tipo de cepa a la que se enfrentó. Debido a que no determinamos la concentración real de $\mu\text{g/ml}$ de

nanocápsulas en suspensión, no podemos comparar las CMI encontradas con las CMI registradas en la literatura para la amoxicilina o el ciprofloxacino. Es importante realizar esto para poder hacer la comparación pertinente. Para ello se recomienda liofilizar las muestras y pesar en g la cantidad de nanocápsulas contenidas para cada suspensión, de tal manera que pueda determinarse la concentración en g/mL de nanocápsulas

Para finalizar, solo queda mencionar que en el presente trabajo de investigación se lograron cumplir todos los objetivos generales y específicos planteados inicialmente. Aún falta llevar a cabo muchas pruebas y estudios para corroborar los resultados hasta ahora obtenidos y poder proceder a estudiar su actividad *in vivo*. Asimismo, es recomendable realizar estudios de toxicidad para descartar la posibilidad de que sean dañinos para el organismo, a pesar de ser efectivos contra el tratamiento de infecciones.