

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Producción y Salud Animal



“DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UN SISTEMA CONJUGADO QUITOSANO-ENROFLOXACINO DE ADMINISTRACIÓN LOCALIZADA PARA EL TRATAMIENTO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS.”

Tesis presentada por la Bachiller:

Herrera Bejar, Simone Angela

para optar el Grado Académico de:

Maestro en Producción y Salud Animal

Asesores:

Dr. Cs. MVZ Reátegui Ordoñez, Juan

Dr. QF Nieto Montesinos, Rita

Arequipa - Perú

2019



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA ESCUELA DE POST-GRADO

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

Arequipa, 13 de Junio del 2019

Señor Doctor:
José Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado
Universidad Católica de Santa María
Presente.-

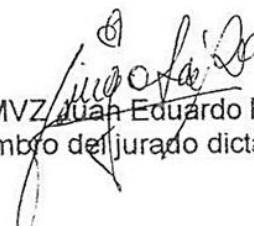
**REFERENCIA: BOLETA DE NOMBRAMIENTO DE JURADO DICTAMINADOR N° 101
EXPEDIENTE NRO. 20190000019965. BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO
ACADEMICO DE MAESTRO**

Tengo a bien dirigirme a usted, en relación al borrador de tesis presentado para optar el grado de maestro en Producción y Salud Animal, titulado: “**Determinación de actividad antimicrobiana in vitro de un sistema conjugado Quitosano - Enrofloxacino de administración localizada para el tratamiento de Endometritis Subclínica en vacas**” presentado por la Bach. Simone Ángela Herrera Béjar, a fin de hacer conocer la siguiente:

En merito a la evaluación de las observaciones del borrador en mención una vez subsanadas las observaciones procede al desarrollo del borrador final y **pase a sustentación.**

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para expresarle los sentimientos de mi mayor consideración.

Atentamente


Dr. Cs. MVZ Juan Eduardo Reátegui Ordóñez
Miembro del jurado dictaminador

DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Sr. Dr.:

José Villanueva Salas

Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM

Presente-.

De mi mayor consideración:

En atención al nombramiento como Dictaminador del Borrador de Tesis presentado por la Bachiller Simone Angela Herrera Béjar, quien pretende optar el grado Académico de Maestro en Producción y Salud Animal, debo informar que el trabajo presentado ha sido desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se han hecho las correcciones de forma y fondo correspondientes, encontrándose apto para su sustentación, por lo que doy mi dictamen aprobatorio.

Atentamente

Arequipa 14 de junio del 2019



Dr. Gonzalo Dávila del Carpio

Arequipa, 09 de junio del 2019

Sr. Dr.
JOSE VILLANUEVA SALAS
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSTGRAO
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Presente,

De mi consideración,

Es grato dirigirme a usted para dar respuesta a la revisión del Borrador de Tesis con expediente Nro. 201900000019965 presentado por la Bachiller HERRERA BEJAR, Simone Ángela, con título: "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE UN SISTEMA CONJUGADO POLIMERO – FARMACO (QUITOSANO-ENROFLOXACINO) DE ADMINISTRACION LOCALIZADA PARA EL TRATAMIENTO DE ENDOMETRITIS SUBCLINICA EN VACAS", Para Optar el grado Académico de Maestro en Producción y Salud Animal.

Lugo de la revisión del borrador de tesis, detalle de las observaciones y correcciones, se ha recibido el levantamiento de las mismas encontrándose apto para su sustentación y defensa del trabajo de investigación.

Atentamente.



Dr. Fernando Fernández Fernández.

Jurado

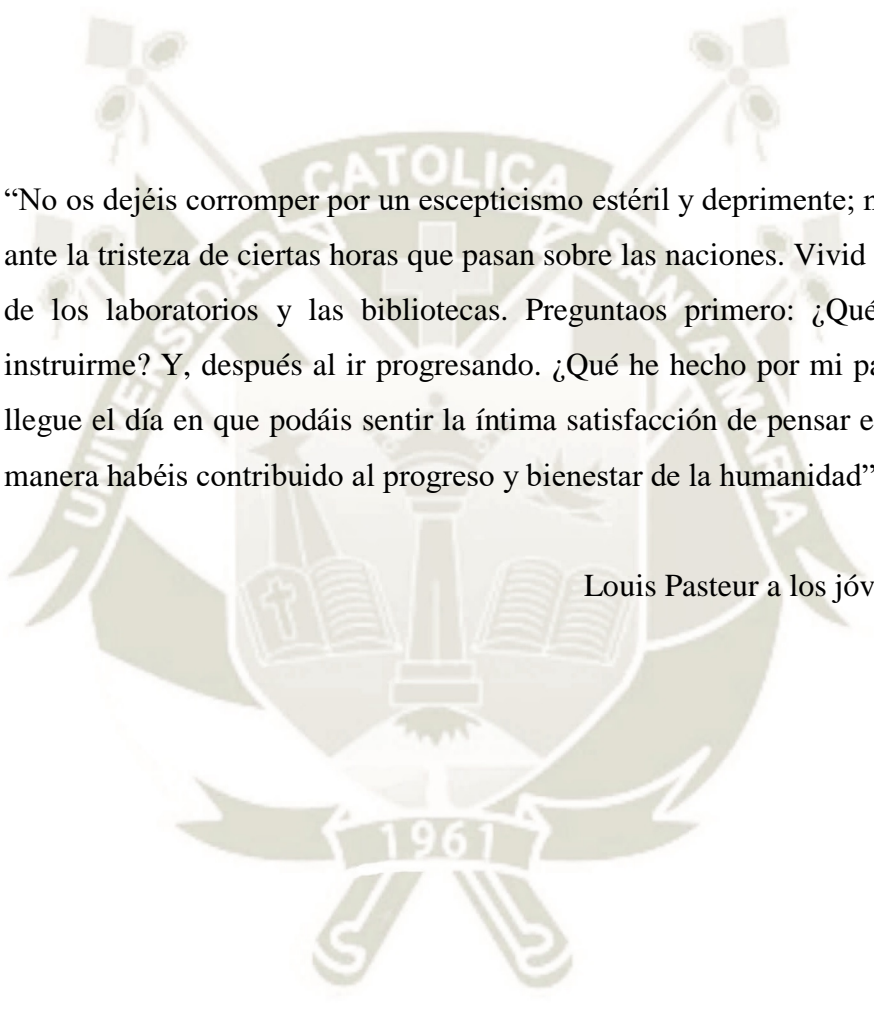
Dedico este trabajo a Dios, quien como guía estuvo presente en cada etapa de mi vida hasta el presente, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mi familia.

A mis padres, quienes me dieron apoyo, educación, consejos y mucho amor. Por ser los principales promotores de mis sueños, por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, a mi madre por estar siempre dispuesta a aconsejarme y darme palabras que me han guiado hasta ahora, a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida.

A mi compañero de vida, su apoyo incondicional a lo largo de este tiempo es la prueba de amor más sincero y puro. Te debo mil sonrisas, tú conseguiste que mis lágrimas de tristeza, se convirtiesen en lágrimas de alegría.

A todas las personas que me apoyaron en alguna parte de este proceso de aprendizaje.



“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y, después al ir progresando. ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis sentir la íntima satisfacción de pensar en que de alguna manera habéis contribuido al progreso y bienestar de la humanidad”.

Louis Pasteur a los jóvenes científicos.

Doy gracias a Dios y a la Virgen por bendecir mi vida, a mi familia, mi hogar y a mis seres queridos.

Agradezco a mis asesores de tesis Dr. Cs. MVZ Juan Reátegui Ordoñez y Dra. QF Rita Nieto Montesinos, ya que, con su constante asesoría, paciencia, dedicación y mucho apoyo se realizó este estudio. Muchas gracias por el soporte constante, los tendré siempre presentes.

Agradezco al Dr. Arnaud Beduneau, profesor asociado en Ingeniería Farmacéutica de la Universidad Franche-Comté (Francia), por su guía y paciencia constante, esenciales en el proceso de esta investigación. Al equipo de Investigación EA4267, PEPITE de la Universidad Franche-Comté (France), esos 6 meses me ayudaron en mi formación profesional y personal.

Agradezco a mi segunda familia en Francia, estarán siempre en mi corazón.

Agradezco al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María.

A todos ellos y a cada una de las personas que estuvieron alentándome, se los agradezco desde el fondo de mi alma.

Fuentes de Financiamiento:

Beca otorgada por el Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) para estudios de postgrado. Beca no reembolsable otorgada por el PNIA, obtenida en 9no puesto y adjudicada bajo el Nro. de contrato 58-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA, para la realización de estudios de la maestría en Producción y Salud Animal en la Universidad Católica de Santa María con el fin de mejorar los conocimientos y competencias de investigación en tópicos especializados de las áreas prioritarias establecidas en las Bases del Concurso relacionadas al sector agropecuario.

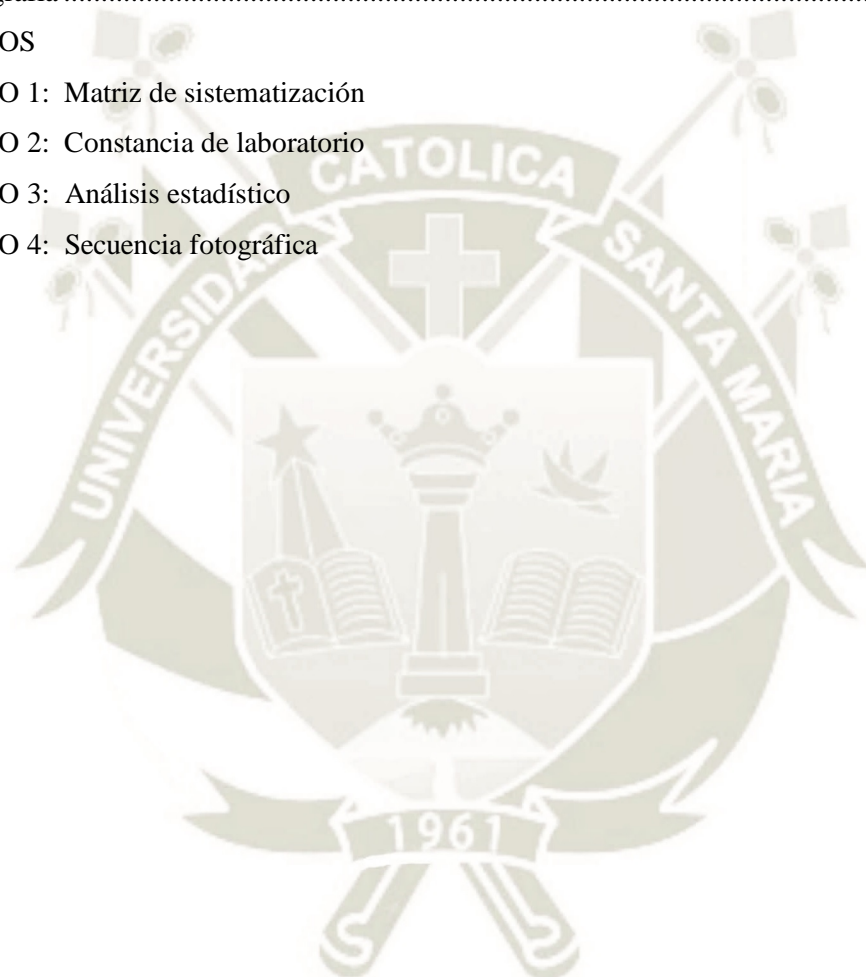
Universidad Franche-Comté (Francia)

Pasantía de septiembre del 2018 a febrero del 2019 en la ciudad de Besançon (Francia), realizada bajo la supervisión del Dr. Arnaud Beduneau, profesor asociado en Ingeniería Farmacéutica de dicha universidad y miembro del equipo de Investigación EA4267, PEPITE.

ÍNDICE GENERAL

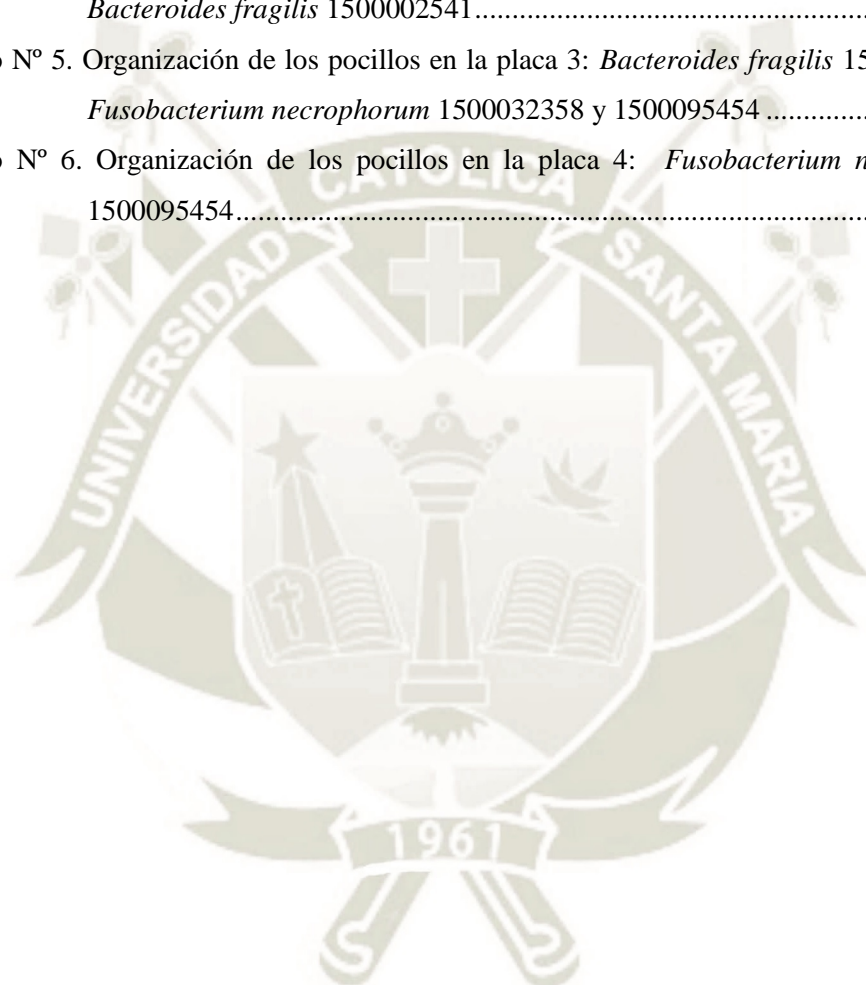
| | |
|---|----|
| Resumen | |
| Abstract | |
| I. Introducción | 1 |
| Hipótesis | 2 |
| Objetivos | 3 |
| CAPITULO I: MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1. El puerperio | 5 |
| 1.1. Involución uterina | 5 |
| 1.2. Regeneración del endometrio | 6 |
| 1.3. Reanudación de los ciclos estruales | 6 |
| 1.4. Contaminación bacteriana | 6 |
| 1.5. Bacterias contaminantes del útero | 7 |
| 1.6. Mecanismos de defensa uterina | 8 |
| 2. Endometritis | 8 |
| 2.1. Patogenia | 8 |
| 2.2. Etiología | 9 |
| 2.3. Clasificación | 9 |
| 3. Endometritis subclínica | 9 |
| 3.1. Diagnóstico de la endometritis subclínica | 10 |
| 3.2. Citología endometrial | 10 |
| 4. Importancia de la Endometritis subclínica | 11 |
| 5. Enrofloxacina | 13 |
| 6. Nanotecnología | 14 |
| 6.1. Nanomedicina | 14 |
| 6.2. Sistemas vectorizados de fármacos | 15 |
| 6.3. Terapia basada en polímeros | 15 |
| 6.4. Conjugado polímero-fármaco | 15 |
| 6.4.1. Conjugado quitosano - fármaco | 16 |
| 7. Pruebas <i>in vitro</i> para la evaluación del sistema conjugado polímero- fármaco | 17 |
| 7.1. Actividad antibacteriana | 17 |
| CAPÍTULO II: METODOLOGÍA | 18 |
| 1. Materiales | 19 |
| 2. Métodos | 20 |
| CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 1. Desarrollo del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” | 30 |

| | |
|---|----|
| 2. Optimización del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” | 31 |
| 3. Determinación del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” | 34 |
| 4. Implementación de la prueba de susceptibilidad bacteriana <i>in vitro</i> al sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” | 35 |
| Conclusiones | 43 |
| Recomendaciones..... | 44 |
| Bibliografía | 45 |
| ANEXOS | |
| ANEXO 1: Matriz de sistematización | |
| ANEXO 2: Constancia de laboratorio | |
| ANEXO 3: Análisis estadístico | |
| ANEXO 4: Secuencia fotográfica | |



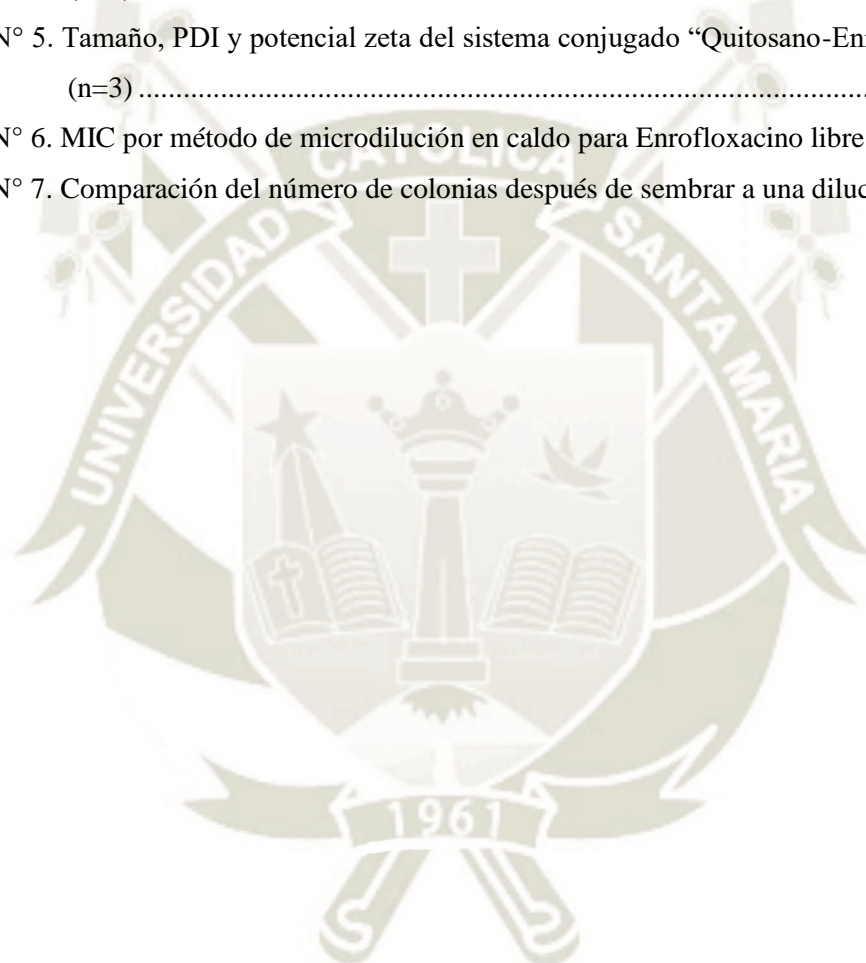
ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro N° 1. Efectos de la E.S. sobre la reproducción del vacuno lechero ³⁶ | 12 |
| Cuadro N° 2. Concentraciones de la mezcla física* para la curva de calibración. | 24 |
| Cuadro N° 3. Organización de los pocillos en la placa 1: <i>Trueperella pyogenes</i> CIP103129 y <i>Trueperella pyogenes</i> 15081229..... | 26 |
| Cuadro N° 4. Organización de los pocillos en la placa 2: <i>Trueperella pyogenes</i> 15081225 y <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541..... | 26 |
| Cuadro N° 5. Organización de los pocillos en la placa 3: <i>Bacteroides fragilis</i> 1500009287 y <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 y 1500095454 | 27 |
| Cuadro N° 6. Organización de los pocillos en la placa 4: <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500095454..... | 27 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla N° 1. Porcentaje de fármaco conjugado. | 31 |
| Tabla N° 2. Comparación de métodos de cuantificación de Enrofloxacin (n=2) | 32 |
| Tabla N° 3. Impacto de distintas concentraciones de EDC y NHS sobre la conjugación de Enrofloxacin* (n=2)..... | 33 |
| Tabla N° 4. Cuantificación directa de Enrofloxacin en la formulación final por fluorescencia (n=3) | 34 |
| Tabla N° 5. Tamaño, PDI y potencial zeta del sistema conjugado “Quitosano-Enrofloxacin” (n=3) | 35 |
| Tabla N° 6. MIC por método de microdilución en caldo para Enrofloxacin libre | 37 |
| Tabla N° 7. Comparación del número de colonias después de sembrar a una dilución a 10^{-6} | 41 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura N° 1: Procesos durante la involución uterina ¹³ | 5 |
| Figura N° 2: Estudios citológicos de endometrio bovino teñidos con Wright-Giemsa modificado, observados con microscopio óptico; A) 10X, B) 40X (las flechas señalan las células polimorfonucleares). | 11 |
| Figura N° 3: Diagrama de formulación del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” | 21 |
| Figura N° 4. Enrofloxacino, quitosano y tampón MES. | 69 |
| Figura N° 6. Glicina. | 69 |
| Figura N° 5. NHS y EDC. | 69 |
| Figura N° 7. Solución quitosano (2.5 mg/mL en HCl 0.1N), enrofloxacino (0.5mg/mL) y tampón MES. | 70 |
| Figura N° 8. Solución incrementada a pH 5.0 con NaOH 0.1N. | 70 |
| Figura N° 9. Diálisis 12hrs. | 70 |
| Figura N° 10. Diálisis 48 hrs. | 70 |
| Figura N° 11. Proceso de filtrado de la formulación en membrana de acetato de celulosa de 0.20 µm | 71 |
| Figura N° 12. Materiales para filtrar y eliminar contaminantes del conjugado Quitosano-Enrofloxacino. | 71 |
| Figura N° 13. Materiales en la cámara de flujo laminar. | 72 |
| Figura N° 14. Identificación de las muestras en tubos falcon. | 72 |
| Figura N° 15. Mezcla del caldo MH con las muestras y controles en tubos falcon. | 72 |
| Figura N° 16. Inoculación de las placas de poliestireno de 96 pocillos. | 73 |
| Figura N° 17. Inoculación de las placas de poliestireno de 96 pocillos. | 73 |
| Figura N° 18. Preparación del inóculo bacteriano. | 73 |
| Figura N° 19. Preparación del inóculo bacteriano. | 73 |
| Figura N° 20. Preparación del inóculo bacteriano. | 73 |
| Figura N° 21. Placas de poliestireno de 96 pocillos inoculadas. | 74 |
| Figura N° 22. Placas en la cámara de cultivo anaeróbico a 35°C. | 74 |
| Figura N° 23. Cepas bacterianas repicadas. | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- MIC: Concentración mínima inhibitoria
- ES: Endometritis subclínica
- PMN: Polimorfonucleados
- IPC: Intervalo parto concepción
- TEL: Tiras de esterasa leucocitaria
- CITO: Endometritis citológica
- ENR: Enrofloxacino
- NHS: N-hidroxisuccinimida
- MES: ácido 2-etanosulfónico
- EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
- TCI: Tokyo Chemical Industry
- HCl: Ácido clorhídrico
- NaOH: Hidróxido de sodio
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- PBS: Tampón fosfato salino
- MH: Mueller Hinton
- NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- kDa: kilo Dalton
- PDI: Índice de polidispersión
- HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
- UV: Ultravioleta
- UFC: Unidades formadoras de colonia
- PLGA: Poli[ácido-láctico-co-glicólico]
- PVA: Alcohol polivinílico
- PEI: Polietilamina
- SCENIHR: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.
- CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.
- EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- DEL: Días en leche.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue formular un sistema conjugado de liberación controlada entre el quitosano, biopolímero de propiedades mucoadhesivas, antiinflamatorias y antibacterianas, y el enrofloxacin, fluoroquinolona de uso veterinario de alta absorción y biodisponibilidad; y evaluar *in vitro* su actividad antibacteriana. El conjugado se obtuvo mediante una reacción entre el ácido carboxílico del enrofloxacin y los grupos amino del quitosano usando N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y N-hidroxisuccinimida, como agentes activantes. Se estudió la talla y el potencial zeta del conjugado. La cuantificación del enrofloxacin contenido en el sistema conjugado se realizó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación y emisión de 274 nm y 450 nm respectivamente. Se implementó la prueba para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del conjugado a tres bacterias (*Trueperella pyogenes*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium necrophorum*) encontradas en endometritis subclínica. El conjugado presenta una talla de 492.73 ± 74.39 nm y una carga positiva de 30 ± 5.05 , lo cual le confiere a la formulación propiedades mucoadhesivas sobre las células de endometrio que presentan carga negativa. Adicionalmente, el conjugado presenta 23.1 ± 1.95 µg de enrofloxacin por mL de formulación. Este resultado es mayor al obtenido en la prueba de microdilución en caldo Müller-Hinton que se usó para determinar la concentración mínima inhibitoria del enrofloxacin libre a las cepas mencionadas. Se está optimizando la prueba de susceptibilidad *in vitro* bacteriana; que evaluará si las proteasas bacterianas contenidas en el biofilm fragmentan el enlace amida y provocan la liberación del enrofloxacin. En resultados iniciales se observa un efecto sinérgico entre el quitosano y enrofloxacin como conjugado frente al enrofloxacin solo, además el método de conjugación no altera la acción antibacteriana del fármaco, lo que se tendrá que corroborar en posteriores estudios de campo *in vivo*.

Palabras clave: Quitosano, enrofloxacin, conjugado, MIC, fluorescencia.

Abstract

The aim of the present study was to formulate a conjugated controlled release system between chitosan, biopolymer of mucoadhesive, anti-inflammatory and antibacterial properties, and enrofloxacin, fluoroquinolone for veterinary use of high absorption and bioavailability; and to evaluate in vitro their antibacterial activity. The conjugate was obtained by a reaction between the carboxylic acid of enrofloxacin and the amino groups of chitosan using N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide and N-hydroxysuccinimide, as activating agents. The size and the zeta potential of the conjugate were studied. The quantification of enrofloxacin contained in the conjugate system was performed by fluorescence at an excitation and emission wavelength of 274 nm and 450 nm respectively. The implementation of the test to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the conjugate to three bacteria (*Trueperella pyogenes*, *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium necrophorum*) found in subclinical endometritis was developed. The conjugate has a size of 459.4 ± 74.39 nm and a positive charge of 30 ± 5.05 , which gives the formulation mucoadhesive properties on the endometrial cells that have a negative charge. Additionally, the conjugate presents 23.1 ± 1.95 μg of enrofloxacin per mL of formulation. This result is higher than the one obtained in the microdilution test in Müller-Hinton broth that was used to determine the minimum inhibitory concentration of free enrofloxacin to the mentioned strains. The in vitro bacterial susceptibility test is being optimized; which will evaluate whether the bacterial proteases contained in the biofilm fragment the amide bond and cause the release of enrofloxacin. In initial results, a synergistic effect is observed between chitosan and enrofloxacin as a conjugate against enrofloxacin alone, in addition the conjugation method does not alter the antibacterial action of the drug, which will have to be corroborated in subsequent field studies *in vivo*.

Key words: Chitosan, enrofloxacin, conjugate, MIC, fluorescence.

I. Introducción

Uno de los principales factores que afectan la eficiencia reproductiva del vacuno lechero es la inflamación uterina que retrasa el retorno de la vaca en sus actividades reproductivas. Las metritis y endometritis se han relacionado con retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto, el incremento del intervalo entre el parto y la primera inseminación, el aumento de días abiertos, el descenso de la tasa de concepción y preñez con aumento de la tasa de eliminación de vacas de alta valor genético y productivo, eliminadas por factores reproductivos^{1,2}.

La endometritis es la inflamación del endometrio usualmente debido a la persistencia de una infección o al retraso en la involución uterina. En ausencia de signos clínicos de endometritis, las modificaciones del endometrio uterino pueden ser definidas como endometritis subclínicas (ES) que se caracterizan por la presencia y aumento de Polimorfo Nucleares Neutrófilos (PMN) en el lumen uterino sin descargas purulentas^{3,4}.

Un estudio de Reategui *et. al* sobre la evaluación del impacto de ES en la performance reproductiva, indicó que a pesar de no haber diferencias significativas para el intervalo parto concepción (IPC) entre un grupo de vacas sanas y otro con ES, existe un deterioro en la eficiencia reproductiva de vacas enfermas. Es así que se determinó la repercusión de ES en forma negativa con consecuencias económicas en diferentes hatos lecheros; aun así, no existe un método eficaz para tratar la endometritis subclínica en vacas lecheras⁵.

Este estudio es pertinente ya que las empresas ganaderas de producción láctea requieren que sus vacas se preñen en el menor tiempo posible para lograr la mayor eficiencia reproductiva y productiva de sus hatos lecheros, por lo que, las patologías reproductivas repercuten de manera negativa sobre esa performance, una de ellas es la endometritis. Esta enfermedad en su forma clínica, afecta entre el 15 y 20 % de las vacas entre la 4th y 6th semana después del parto, mientras que la ES afecta entre el 30 y 35 % de vacas entre la 4th y 9th semana postparto^{1,6}.

Además, en el útero con ES, las bacterias forman biofilms para sobrevivir. Estas permiten el intercambio de material genético y evitan la exposición a antibióticos, lo que conduce a la resistencia a estos fármacos^{7,8}. En paralelo, la vía intrauterina, ampliamente utilizada para la administración de antibióticos en la ES, tiene un mecanismo propio de limpieza. Esto ocasiona que las formas farmacéuticas convencionales como bolos intrauterinos, geles o espumas presenten un corto tiempo de residencia intrauterina. Adicionalmente, algunos

antibióticos poseen un tiempo de vida media corto. Por lo tanto, la administración de fármacos en la ES se traduce en procedimientos repetitivos, complejos, caros y que sobretodo producen stress en las vacas. Lo que conlleva a una disminución de la producción y productividad lechera e índices reproductivos no adecuados ^{7,9,10}.

Por lo anteriormente indicado, es necesario buscar nuevas estrategias para tratar esta enfermedad, una de ellas propone formulaciones de antibióticos de liberación prolongada, estrategia ya utilizada en Medicina Humana. Estos fármacos ya encapsulados son en adelante liberados de manera independiente de factores externos y con una cinética bien establecida. Así, estas formulaciones ofrecen numerosos beneficios, los que incluyen, lograr una concentración de antibiótico estacionaria, terapéuticamente eficaz (por encima de la concentración mínima efectiva) y no toxica en el tejido a tratar. Esto, reduce consecuentemente la frecuencia de dosificación y la cantidad de fármaco administrado.

Por tal motivo, este proyecto propuso la evaluación *in vitro* de un sistema conjugado polímero-fármaco para optimizar el tratamiento de la endometritis subclínica en vacas lecheras. Por lo que se formuló un compuesto para realizar su estudio *in-vitro* en condiciones que se asemejen al útero posparto en vacas puerperales.

Si bien existe en la actualidad reportes de estas formulaciones, ninguna de estas ha sido probada en el campo de la reproducción animal para su uso en vacas lecheras. Así, este proyecto propone un sistema conjugado “Quitosano-Enrofloxacino” con propiedades mucoadhesivas y bactericidas para utilizarlo en estudios posteriores y así optimizar el tratamiento de la enfermedad antes mencionada.

Hipótesis

- Dado que el conjugado “quitosano-enrofloxacino” libera de manera sostenida el fármaco, es posible que este sistema tenga mayor actividad antibacteriana que el enrofloxacino libre en el tratamiento de ES.

Objetivos

Objetivo General:

- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del sistema conjugado “quitosano-enrofloxacino” de administración localizada para el tratamiento de endometritis subclínica en vacas.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un sistema conjugado “quitosano-enrofloxacino”.
- Comparar la concentración mínima inhibitoria del conjugado “quitosano-enrofloxacino” de administración localizada, sobre enrofloxacino libre.

El presente trabajo de investigación despliega la revisión y análisis exhaustivo de los fundamentos teóricos y problema en estudio, descripción de las estrategias metodológicas en la ejecución de la investigación, los resultados y discusión de la determinación de actividad antimicrobiana *in vitro* de un sistema conjugado quitosano-enrofloxacino de administración localizada para el tratamiento de endometritis subclínica en vacas, conclusiones y recomendaciones considerando una serie de actividades que involucran la evaluación *in vitro*. A manera de anexos se despliega el proyecto completo de investigación, las matrices de sistematización, constancia de laboratorio, análisis estadístico y secuencia fotográfica.



**CAPITULO I:
MARCO TEÓRICO**

1. El puerperio

Es un proceso fisiológico de modificaciones que ocurren en el útero inmediatamente luego del parto hasta la completa involución uterina y la restauración de la capacidad reproductiva ^{11,12,13}.

Esta restauración del aparato reproductor comprende: Involución uterina completa, regeneración del tejido endometrial, el retorno a la ciclicidad ovárica y eliminación de la contaminación bacteriana presente en el útero (Figura 1)¹³.

1.1. Involución uterina

La recuperación del tamaño y el funcionamiento del útero después del parto se denominan involución uterina. Depende de contracciones miométriales, eliminación de la infección bacteriana y de la regeneración del endometrio ¹³.

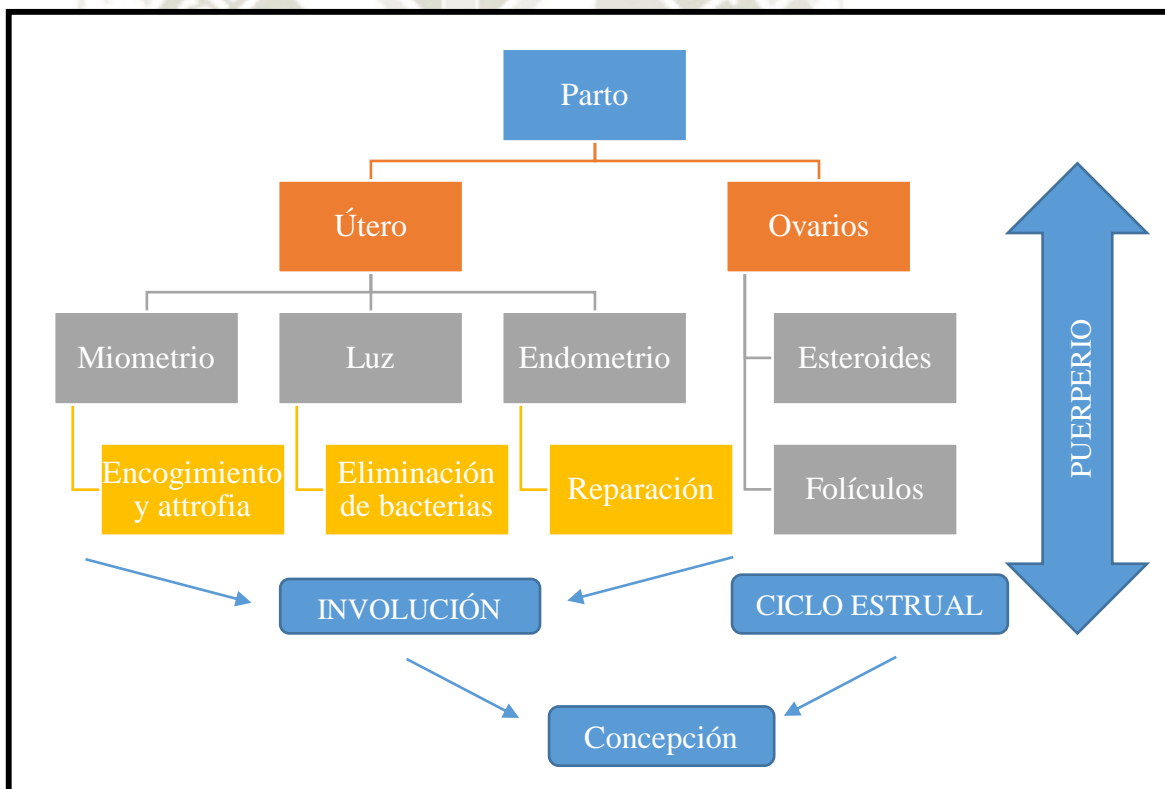


Figura N° 1: Procesos durante la involución uterina ¹³.

La regresión uterina comienza en los cuernos, después se extiende al cuerpo del útero y termina en el cérvix, que regresa a su estado inicial solo después de 40-50 días a partir del parto ¹².

La involución uterina retardada es un factor importante que limita la fertilidad en la vaca, esta ocurre por enfermedades en el posparto, que incluyen hipocalcemia, retención de placenta e infecciones uterinas (endometritis y metritis), así como en vacas viejas y en partos gemelares.^{14,15}

1.2. Regeneración del endometrio

La regeneración del endometrio se inicia inmediatamente después del parto y se completa alrededor de los 25 días postparto. Las capas más profundas de tejido no estarán completamente restauradas hasta 6 o 8 semanas postparto^{13,15}.

1.3. Reanudación de los ciclos estruales

El estro y la ovulación se suspenden durante la gestación. Este bloqueo se debe a los niveles elevados de progesterona, por lo que, si se produce ovulación, se formará un cuerpo lúteo lo que anuncia el retorno de la ciclicidad ovárica^{13,17}.

A su vez el útero también tiene efectos específicos sobre la actividad ovárica postparto. La contaminación uterina después del parto es inevitable y un alto nivel de contaminación puede deprimir la selección folicular. El efecto es mayor en el cuerno uterino previamente grávido¹⁸.

1.4. Contaminación bacteriana

El lumen uterino se encuentra estéril antes del parto, pero durante y después del parto, las barreras físicas de la cervix, vagina y vulva son comprometidas proporcionando la oportunidad para que las bacterias asciendan al tracto genital provenientes del ambiente, de la piel del animal y de las heces¹⁵. Esta contaminación se produce en el 90% de las vacas y la mayoría de las bacterias contaminantes son removidas normalmente por diversos mecanismos de defensa del útero¹⁴.

La conversión de la contaminación en infección depende de la virulencia de los microorganismos, de la condición del útero y de los mecanismos de defensa³. Esta infección implica adherencia de microorganismos patógenos a la mucosa,

colonización o penetración del epitelio y/o liberación de toxinas bacterianas que conducen al establecimiento de enfermedad uterina ¹⁶.

Una vaca con un posparto normal resuelve la infección uterina mediante la descarga del contenido uterino y movilización de las defensas naturales, incluyendo moco, anticuerpos y células fagocíticas ¹⁶. El ambiente uterino dominado por estrógeno es más resistente a la infección debido a que los niveles elevados de estradiol promueven la leucocitosis en el útero y en general en el tracto reproductivo ³. La resolución de la inflamación se produce en el transcurso del tiempo, siendo restaurado en vacas normales dentro de los 40 a 60 días después del parto ¹⁶.

En contraparte, la presencia de bacterias patógenas en el útero causa inflamación, lesiones histológicas del endometrio y retraso de la involución uterina y puede ser lo suficientemente grave como para sobrepasar los mecanismos de defensa uterina y provocar una infección que ponga en riesgo la vida del animal ¹⁵.

1.5. Bacterias contaminantes del útero

En los animales vivos, existe una flora microbiana fluctuante en el útero en las primeras 7 semanas posparto debido a la contaminación espontánea, limpieza y recontaminación ¹⁵. La mayoría de estos contaminantes ambientales, pueden ser aislados y son eliminados gradualmente del útero en este periodo ¹⁶.

La incidencia y especies de bacterias decrecen gradualmente conforme avanzan los días, así la presencia de bacterias es esporádica de los 20 a 35 días posparto y la cavidad uterina debe retornar a la esterilidad después de dicho evento. Aproximadamente a las 4 semanas el útero debe estar estéril en vacas normales ^{19,16}.

En los primeros 10 días después del parto se aísla generalmente *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Bacillus spp.* del útero de vacas sin signos clínicos visibles, mientras que *Arcanobacterium pyogenes*, *Prevotella melaninogenicus*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides spp.* fueron aisladas de vacas clínicamente enfermas lo cual se asocia usualmente con la infección uterina en bovinos ¹⁵.

1.6. Mecanismos de defensa uterina

Tanto las barreras anatómicas y funcionales, así como la respuesta inmune específica y no específica son elementos fundamentales del mecanismo de defensa contra la invasión de microorganismos ambientales del tracto reproductivo de la vaca ¹⁹. Cualquier alteración de estos mecanismos de defensa permite a los patógenos oportunistas, mayormente microorganismos del tracto gastrointestinal posterior y que se encuentran alrededor del área perineal, colonizar el endometrio y causar enfermedad uterina ¹⁶.

2. Endometritis

La endometritis es la inflamación del endometrio, la capa más interna del útero, usualmente debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina. Las pérdidas reproductivas incluyen un incremento del número de días abiertos, aumento de los servicios por concepción y un incrementado riesgo de descarte debido a fallas reproductivas ^{3,4}.

2.1. Patogenia

El desequilibrio entre la infección uterina y los mecanismos de defensa antimicrobianos propios del útero desencadenan el desarrollo de patologías como la metritis puerperal, piometra, endometritis clínica, y endometritis subclínica. Todos los procesos inflamatorios del útero afectan al endometrio, pudiendo o no extenderse al miometrio y al perimetrio ^{19,20}.

Además, en el periodo postparto de las vacas se libera prostaglandina F_{2α} ya sea en el puerperio normal o en presencia de infecciones uterinas, pero en este último caso persisten concentraciones más elevadas por más tiempo. Al parecer estas infecciones bacterianas y sus toxinas hacen que se secreten concentraciones anormalmente más elevadas de prostaglandina, lo que demora el inicio del ciclo hasta que la infección ceda. Así, la endometritis es la inflamación del endometrio debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina ^{19,21}.

2.2. Etiología

Existen varios géneros de bacterias causantes de esta infección y pueden estar solas o en combinación. Algunas son *Arcanobacterium pyogenes* y *Escherichia coli* que usualmente actúan en conjunto ²². En otras ocasiones *Arcanobacterium pyogenes* también se encuentra asociado a gérmenes anaerobios como *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides Spp.* ²³. Cuando se aísla del útero al *Arcanobacterium pyogenes* el día 21 postparto es sinónimo de endometritis grave y generalmente es la principal causa de infertilidad en vacas ²⁴.

2.3. Clasificación

Se ha propuesto una clasificación general de endometritis:

- a. Endometritis Clínica: Enfermedad en la cual los animales después de los 21 días del parto presentan contenido o descarga vaginal visible, ya sea de tipo moco purulento (50% moco + 50% pus) o purulento (>50% pus).
- b. Endometritis Subclínica: Definida por citología endometrial cuyo resultado indica un porcentaje de neutrófilos mayor al 18% entre los días 21 a 33 postparto, o un resultado mayor al 10% entre los días 35 y 47 postparto. Para esto, se realiza un conteo mínimo de 100 células endometriales, polimorfo nucleares y células escamosas.

Los animales con endometritis subclínica no muestran descargas uterinas, pero se acepta que pueden tener un grado de infección suficiente como para alterar su desempeño reproductivo ³.

3. Endometritis subclínica

La endometritis subclínica (ES) juega un papel muy crítico en la industria láctea moderna. Es altamente prevalente, asintomática y tiene un profundo efecto perjudicial sobre el rendimiento reproductivo ^{3,25}. La endometritis subclínica es, de hecho, una de las causas de ineficiencia reproductiva más importantes en vacas lecheras estudiadas en la última década ²⁶. Se define como la inflamación superficial del endometrio (no más allá del stratum spongiosum), evidenciada por el aumento relativo (porcentaje) del número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN; en relación a células epiteliales

endometriales) en la luz uterina, sin signos clínicos visibles, pero que perjudica significativamente la fertilidad ^{3, 23, 27}.

Dado que la ES no puede ser detectada por simple inspección visual, son necesarios exámenes complementarios para su diagnóstico, siendo estos: Histopatología, ultrasonografía, tiras de esterasa leucocitarias (TEL) y citología endometrial ²⁸.

3.1. Diagnóstico de la endometritis subclínica

Entre las técnicas más difundidas se pueden mencionar la palpación transrectal, vaginoscopía, ultrasonografía, biopsia endometrial, y la citología endometrial (cytobrushy lavaje uterino). En los tambos, la técnica más utilizada y difundida es la palpación transrectal que ofrece datos del útero tales como el tamaño de los cuernos, simetría, textura, tono, contenido luminal, y estructuras ováricas ¹⁶.

El empleo de la citología endometrial consiste en la recolección de células del endometrio a través de dos técnicas diferentes: Cepillado o cytobrush y lavaje uterino. Esta evaluación citológica endometrial es muy sensible para el diagnóstico de endometritis subclínica puesto que mediante el conteo de polimorfonucleares neutrófilos se infiere la presencia de una inflamación del endometrio y por ende es la técnica recomendada para optimizar el diagnóstico ^{16, 29}.

3.2. Citología endometrial

La citología endometrial es la técnica más utilizada para diagnosticar ES en el ganado lechero tanto en el campo como a nivel investigativo ^{30, 31}. La evaluación de la proporción de PMN en láminas de citología es el sello distintivo del diagnóstico de la ES, hasta el punto en que algunos autores se refieren a la ES bovina como “endometritis citológica” (CITO) ^{31, 32}.

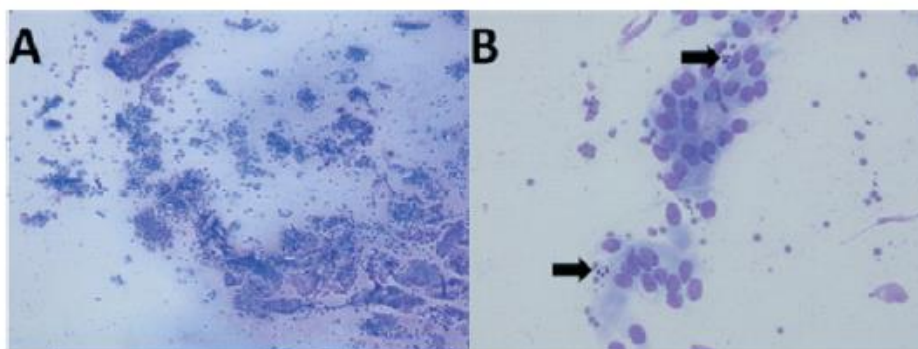


Figura N° 2: Estudios citológicos de endometrio bovino teñidos con Wright-Giemsa modificado, observados con microscopio óptico; A) 10X, B) 40X (las flechas señalan las células polimorfonucleares).

En general, las vacas afectadas por CITO experimentan un efecto perjudicial con respecto a su capacidad reproductiva. Aunque no hay impacto de la CITO en la producción de leche, su importancia se basa principalmente en el aumento del tiempo hasta la preñez: una vaca positiva a CITO tiene en promedio un aumento en el tiempo de preñez de 25 días, y la consiguiente pérdida económica ^{30, 33-35}.

4. Importancia de la Endometritis subclínica

Uno de los principales factores que afecta la eficiencia reproductiva del vacuno lechero son las patologías uterinas. Las metritis y endometritis se han relacionado con retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto, incremento del intervalo entre el parto y la primera inseminación, aumento de días abiertos, descenso de la tasa de concepción y aumento de las tasas de eliminación del ganado, reduciendo la eficiencia reproductiva del ganado lechero ^{1, 2}.

Es por esto que la salud reproductiva desempeña un importante rol para alcanzar una correcta performance reproductiva. Las vacas tienen que parir a intervalos regulares para incrementar la producción individual y total del establo ^{7, 20}.

Cuadro N° 1. Efectos de la E.S. sobre la reproducción del vacuno lechero ³⁶.

| Referencia | Características básicas del estudio | Impacto en reproducción | Parámetros afectados |
|--------------------------------|---|-------------------------|---|
| Kasimanickam et al., 2004 | n = 228; Exp. = 2; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 18% 20-33 DIM; PC. 10% 34-47 DIM | Negativo | Días abiertos, Tasa de gestación |
| Gilbert et al., 2005 | n = 141; Exp. = 5; Solo vacas sin PVD; Lavado; PC. ≈5% 40-60 DIM | Negativo | Anestro postparto, Tasa de gestación en 1ª IA, Inseminaciones/gestación, Días abiertos, Tasa de gestación |
| Barlund et al., 2008 | n = 221; Exp. = 8; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 8% 28-41 DIM | Negativo | Tasa de gestación en 1ª IA, Inseminaciones/gestación, Días abiertos, Tasa de gestación |
| Dubuc et al., 2010 | n = 1044; Exp. = 6; Combinado con PVD; Citobrush; PC. 6% 35 ± 3 DIM; PC. 4% 56 ± 3 DIM | Negativo | Tasa de gestación |
| Plöntzke et al., 2010 | n = 201; Exp. = 3; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 5% 18-38 DIM; PC. 5% 32-52 DIM | Sin efecto | Días a la 1ª IA, Inseminaciones/gestación, Días abiertos, Tasa de gestación |
| Burke et al., 2010 | n = 78; Exp. = 1; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 6% 42 DIM | Negativo | Anestro postparto |
| Green et al., 2011 | n = 169; Exp. = 1; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 18% 21 ± 3 DIM; PC. 18% 42 ± 3 DIM | Negativo | Anestro postparto |
| McDougall et al., 2011 | n = 303; Exp. = 1; Combinado PVD; Citobrush; PC. 9%; 29 ± 2,4 DIM; PC. 7% 43 ± 2,3 DIM | Negativo | Anestro postparto, Tasa de gestación en 1ª IA, Días abiertos, Tasa de gestación |
| Drillich et al., 2012 | n = 48; Exp. = 1; Solo vacas sin PVD; Citobrush; PC. 0% IA; PC. 0% Recogida | Negativo | % de embriones transferibles |
| Fernández-Sánchez et al., 2014 | n = 41; Exp. = 1; Solo vacas sin PVD; Citobrush; No PC., análisis lineal Inicio Superovulación | Negativo | % de embriones transferibles |

n: número de casos; Exp.: explotaciones; PVD: descarga vaginal purulenta; PC: punto de corte; DIM: días en leche.

Además, los problemas de infecciones reproductivas en la ganadería causan pérdidas económicas de gran relevancia, ya que los regímenes terapéuticos para tratar infecciones como la ES en vacas lecheras proponen varias administraciones del antibiótico por día, durante varios días además de altas dosis del fármaco. Lo que eleva los costos de servicios veterinarios y de tratamiento. Asimismo, un tratamiento prolongado puede llevar a perfiles tóxicos en tejidos periféricos al tejido a tratar ^{5, 36, 37}.

5. Enrofloxacin

El enrofloxacin de fórmula química $C_{19}H_{22}FN_3O_3$, pertenece a la familia de las fluoroquinolonas y fue la primera patentada en 1984. Se ha establecido que las fluoroquinolonas pueden destruir activamente a las bacterias mediante la inhibición de la ADN girasa bacteriana o topoisomerasa II, lo que hace que la molécula de ADN sea compacta y se destruya la función biológica ^{38,39}.

El primer producto veterinario a base de enrofloxacin fue elaborado por Bayer en 1991, hoy en día existen varias formas farmacéuticas de presentación: solución inyectable, comprimidos y bolos para diferentes especies destino como animales domésticos, de granja y hasta exóticos ⁴⁰. El enrofloxacin posee una excelente actividad bactericida a bajas concentraciones ^{41, 42, 43} y tiene propiedades farmacocinéticas favorables en mamíferos, incluida una buena absorción, alta biodisponibilidad y buena penetración en el tejido ^{44, 45, 46}.

La enrofloxacin está indicada en el tratamiento local y sistémico de enfermedades causadas por agentes Gram-negativos y Gram-positivos. Está indicada para enfermedades respiratorias, infecciones digestivas, urinarias, genitales, mamarias e infecciones de la piel ^{40,47}.

La enrofloxacin es un poderoso agente antimicrobiano que muestra eficacia frente a distintas enfermedades bacterianas, posee a la vez efectos adversos que son bien tolerados y no son de gran importancia comparándolos con los beneficios ⁴⁷. Los más comunes efectos adversos incluyen náuseas, vómitos y diarrea, así como reacción inflamatoria en el sitio de administración en el caso de porcinos. Los efectos adversos también se describen sobre los animales jóvenes, afecciones en el sistema reproductivo, la vista y el sistema nervioso central ^{40,48}.

La enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina poseen una alta actividad bactericida dependiendo de la concentración, sin embargo, residuos de medicamentos en lo productos de origen animal, bacterias resistentes y reacciones de hipersensibilidad alérgica ^{49,50,51}, han hecho necesario explorar una nueva preparación para atenuar los efectos adversos tanto como sea posible, así como también reducir la frecuencia de administración ^{52,53,54}.

6. Nanotecnología

La nanociencia y la nanotecnología permiten estudiar fenómenos inéditos que ocurren a nivel atómico y molecular. La importancia de la nanotecnología radica en que en el mundo nanométrico los materiales, cuyas dimensiones son de una millonésima parte de un milímetro (1×10^{-9} mts), pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica ⁵⁵.

Nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica, y por tanto permiten trabajar y manipular de forma individual átomos y moléculas en disciplinas como la Química, la Física, la Biología, la Medicina y la Ingeniería ^{55,56}.

6.1. Nanomedicina

La nanomedicina es una rama de la nanotecnología con aplicaciones directas en Medicina, que podría permitir el abordaje de las enfermedades (diagnóstico, prevención y tratamiento) desde el interior del organismo⁵⁶. Es así que, los dispositivos con un tamaño menor de 50 nm pueden ingresar fácilmente en la mayoría de las células mientras que, los menores de 20 nm pueden salir de los vasos sanguíneos. Como resultado, los dispositivos a nanoescala pueden interactuar fácilmente con biomoléculas tanto en la superficie celular como dentro de ella, a menudo en formas que no alteran el comportamiento y las propiedades bioquímicas de esas moléculas ⁵⁷.

Además, considerando que los sistemas biológicos interactúan con su medio ambiente a través de moléculas y estructuras múlti moleculares que operan en la

nanoescala, es fácil comprender porque la nanotecnología tiene tanto potencial en el área de la salud, en los productos farmacéuticos y en la Biotecnología ⁵⁸.

6.2. Sistemas vectorizados de fármacos

El crecimiento de los enfoques terapéuticos basados en la nanotecnología, que incluyen numerosos sistemas de administración de fármacos de tamaño nanométrico o diagnósticos, se ha desarrollado para mejorar el tratamiento o el diagnóstico de diversas enfermedades ⁵⁹.

Los sistemas de administración controlada de medicamentos se han convertido en una técnica muy eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades. Están diseñados de manera que el medicamento llega al sitio de interés de manera controlada y predeterminada al mantener una concentración persistente durante un período de tiempo específico, regulando así la biodisponibilidad y minimizando los efectos secundarios del fármaco ⁶⁰.

6.3. Terapia basada en polímeros

Los polímeros y los sistemas de administración de fármacos basados en polímeros han experimentado una enorme expansión en la última década, con el desarrollo clínico y pre-clínico de nanomedicinas basadas en polímeros y otras aplicaciones biomédicas ⁶¹.

Los tratamientos a base de polímeros son preparados a una escala nanométrica. La definición abarca medicamentos poliméricos (moléculas poliméricas que son biológicamente activas por derecho propio); conjugados polímero-fármaco; conjugados polímero-proteína; micelas poliméricas a las que se une covalentemente el fármaco; y vectores poliméricos no virales para la entrega de genes ⁶².

6.4. Conjugado polímero-fármaco

Los polímeros naturales son de gran importancia en diversas aplicaciones farmacéuticas y biomédicas debido a su no toxicidad y biocompatibilidad. Una de las diversas aplicaciones es el conjugado polímero-fármaco, que consiste en un

esqueleto de polímero biocompatible hidrofílico a lo largo del cual las moléculas del fármaco se unen covalentemente a través de un enlazador biodegradable que permite la liberación controlada del fármaco ^{59,63}.

Los conjugados de polímero-fármaco tienen varias ventajas sobre los fármacos encapsulados físicamente, algunos de ellos son: 1) la capacidad de lograr una alta carga útil del fármaco, 2) mayor solubilidad del fármaco, 3) modulación de la farmacocinética del fármaco (resultando en una mayor eficacia terapéutica), 4) efectos secundarios locales y sistémicos reducidos como resultado de fármacos altamente irritantes o citotóxicos, 5) estabilidad *in vivo* aumentada del fármaco y 6) control del lugar de liberación del fármaco ^{64,65}.

6.4.1. Conjugado quitosano - fármaco

El quitosano se obtiene de la quitina, que es el segundo polímero natural más amplio que se obtiene de los esqueletos externos de los insectos y crustáceos, tiene propiedades mucoadhesivas, de menor citotoxicidad y antioxidantes ^{66, 67,68}.

La quitina, el quitosán y sus derivados, preparados en diversas formas como hidrogeles, nanofibras, membranas, micro/nanopartículas y esponjas son biomateriales prometedores para aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos. Estos tienen excelentes propiedades adhesivas, biocompatibles, biodegradables, no tóxicos, hidrofílicos, y también tiene un efecto antimicrobiano ^{69,70}.

Los grupos amino en el quitosano se pueden conjugar con varios grupos funcionales para permitir el enlace de medicamentos y otros ligandos, lo que brinda la capacidad de administrar medicamentos de forma local y sistémica ⁶⁵.

Además, entre las nanomedicinas, los conjugados de polímeros y medicamentos a base de materiales hidrofílicos y biocompatibles, como el quitosano, han llamado la atención en el tratamiento moderno de la inflamación debido a su potencial de ataque pasivo y activo al sitio de la inflamación y la liberación controlada de agentes activos una vez en allí ⁵⁹.

7. Pruebas *in vitro* para la evaluación del sistema conjugado polímero- fármaco.

7.1. Actividad antibacteriana

Esta prueba se realiza para evaluar la actividad antibacteriana de fármacos, y así determinar la resistencia o sensibilidad de las bacterias identificadas, en este caso de endometritis subclínica en vacas, al sistema conjugado polímero-fármaco de administración localizada, como nueva forma de tratamiento.

El estudio de susceptibilidad bacteriana *in-vitro* se hizo mediante el método de microdilución descrito por Patel et *al.*⁷¹, en caldo Mueller-Hinton. Este método se denomina “microdilución” porque implica el uso de pequeños volúmenes de caldo dispersado en bandejas de microdilución plásticas estériles que tienen pocillos de fondo redondos o cónicos.

El estudio se realizará con las cepas bacterianas obtenidas de cultivos de endometritis de ganado vacuno, proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Franche-Comté; para lo cual se determinará primero la concentración mínima inhibitoria (MIC) necesaria para determinar la resistencia o sensibilidad al sistema de conjugación en estudio.



CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

1. Materiales

El quitosano (peso molecular: 100,000 – 300,000; grado de deacetilación: $\geq 90\%$) se obtuvo de ACRROS Organics Fisher (Francia). Enrofloxacin (ENR), N-hidroxisuccinimida (NHS), y ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico (tampón MES) se compraron de Sigma-Aldrich (Francia). El N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) se obtuvo de TCI Chemicals (Francia), Glicocolle (glicina) se adquirió de Cooper (Francia) y el agua osmotizada se obtuvo del Laboratorio de Farmacia Galénica y Biofarmacia de la Universidad de Franche-Comté (Francia). El ácido clorhídrico (HCl) se adquirió de Merck Millipore (Alemania). El hidróxido de Sodio (NaOH) y el dimetilsulfóxido (DMSO) se compraron de Sigma-Aldrich (Francia). El tampón fosfato salino (PBS) fue obtenido de Fisher scientific (Estados Unidos).

El caldo Mueller Hinton (MH) ajustado con cationes fue adquirido de Becton-Dickinson (Estados Unidos), la sangre de caballo desfibrinada de Thermo Scientific Oxoid (Francia) y la Nicotinamida Adenina Dinucleótido (β -NAD) de Sigma Aldrich (Francia).

Las siguientes cepas bacterianas se obtuvieron del Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Franché-Comté y del Hospital Regional Universitario de Besançon (Francia): *Trueperella pyogenes* (CIP103129, 15081229 y 15081225; muestras animales de endometritis), *Bacteroides fragilis* (1500002541 y 1500009287; cultivo paciente humano) y *Fusobacterium necrophorum* (1500032358 y 1500095454; cultivo paciente humano).

Dentro del equipo de laboratorio se utilizó un liofilizador modelo AlpHa 1-4 LDplus, Zetasizer nanoZS® marca Malvern Instruments (Reino Unido), un cromatógrafo líquido marca Agilent 1220 Infinity LC, un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan Flash marca Thermo scientific (Francia), una cámara de cultivo anaeróbico modelo Whitley A35 marca Don Whitley Scientific, una centrífuga y un agitador magnético.

El material de laboratorio incluyó tubos eppendorf de 1.5 mL, placas de poliestireno estériles de fondo redondo de 96 pocillos, placas negras de 96 pocillos para fluorescencia y placas Petri estándar adquiridos de Thermo Scientific (Francia). Tubos de 50 y 12 mL estériles de Sarstedt (Alemania), parafilm marca Sigma Aldrich (France). Frascos de 20 y 40 mL, micropipetas, beakers (10, 20, 40, 100 y 200 mL) y jeringas estériles de 10 mL. Membrana para diálisis de 12 - 14 kDa y membrana de acetato de celulosa de 0.20 μ m.

2. Métodos

Método de formulación del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

Inicialmente se preparó una solución de 3 mL de quitosano a una concentración de 15 mg/mL, en HCl 0.1N, a la que se le añadió 9 mg de enrofloxacino. Posteriormente se añadió 15 ml de tampón MES y luego se incrementó el pH a 5.0 con NaOH 1N. Las concentraciones finales de quitosano y enrofloxacino fueron 2.5mg/mL y 0.5mg/mL respectivamente.

Para obtener el enlace amida entre el grupo carboxílico del enrofloxacino y el amino del quitosano, se añadió a la solución anterior EDC y NHS a una concentración de 2mg/mL, cada uno, y se incubó por 24 horas con constante agitación.

Posteriormente, se añadió glicina para detener la reacción. Luego, con el fin de remover el enrofloxacino libre, los reactivos y el subproducto urea, el conjugado fue purificado en dos pasos. Primero se añadió acetona al conjugado en proporción 4 a 1, precipitando la formulación mientras que el enrofloxacino libre se solubilizó. Después de centrifugar a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C, el conjugado contenido en el sedimento fue secado bajo aire constante por 20 minutos y posteriormente solubilizado en agua osmotizada.

A continuación, se realizó una diálisis en membrana de 12 - 14 kDa por 48 horas en agua osmotizada, para eliminar los reactivos hidrosolubles, el subproducto isourea y las trazas de enrofloxacino.

Finalmente, se filtró la formulación en membrana de acetato de celulosa de 0.20 μm , para garantizar la esterilidad de la muestra a utilizar en los siguientes estudios *in vitro*. En adelante todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar en condiciones estériles. (Anexo 4)

Método de liofilización del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

El conjugado obtenido después de la diálisis se almacenó en frascos de 40 mL a -80°C durante 1 hora, después se realizó un procedimiento de secado en el liofilizador modelo Alpha 1-4 LDplus durante 72 horas, en las siguientes condiciones:

- Primer secado: 12 horas, presión 0.018mbar, -56°C .
- Segundo secado: 60 horas, presión 0.011mbar, -60°C . (dependiendo del volumen del conjugado).

La Figura 3 resume cada una de las etapas en la formulación del conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

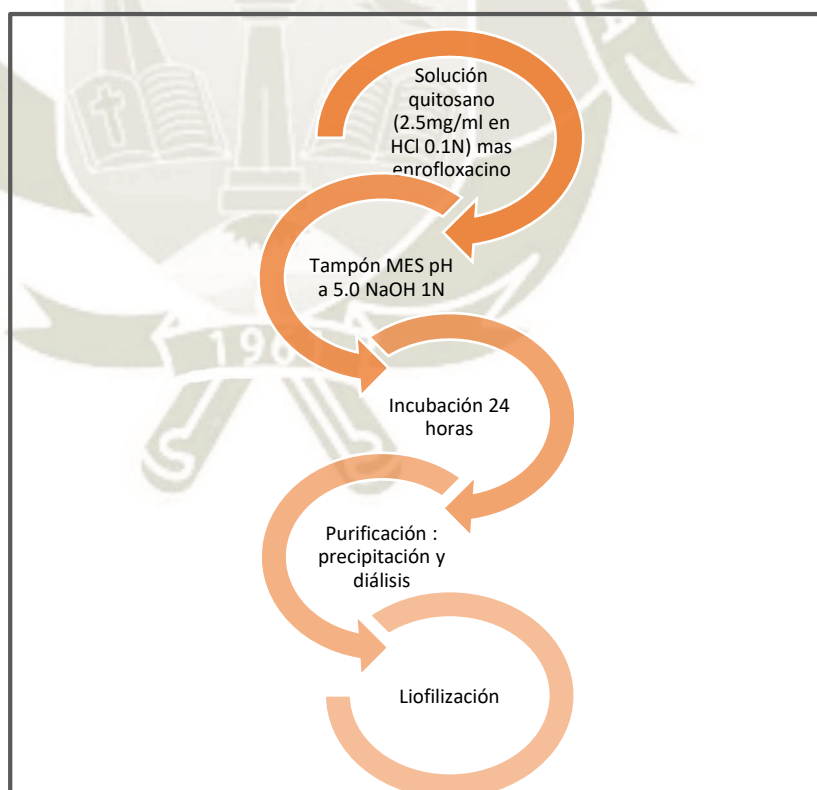


Figura N° 3: Diagrama de formulación del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”. Elaboración propia

Método de determinación del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitósano-Enrofloxacino”

La talla, PDI y potencial zeta fueron medidos usando el Zetasizer nanoZS® (Malvern Instruments, Reino Unido). Se analizó el conjugado liofilizado reconstituido con HCl 0.1N a la concentración de 2.5 mg/mL y posteriormente diluido 1/100 con agua ultrapura. Las mediciones se hicieron a una temperatura de 25 °C y fueron equilibradas dos minutos antes de analizar.

Método de cuantificación indirecta de Enrofloxacino en el sistema conjugado polímero-fármaco “Quitósano-Enrofloxacino” por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

Para realizar la cuantificación indirecta de enrofloxacino se utilizó un cromatógrafo líquido marca Agilent 1220 Infinity LC, equipado con una bomba binaria, un horno de columna LC 480 y con un detector UV visible programado a 274 nm.

La fase estacionaria consistió en una columna RP-18 250 x 4,6 mm. La fase móvil, según la Farmacopea de los Estados Unidos de América⁷¹, consistió en una mezcla de buffer ácido fosfórico 20 mM ajustado a pH 3,0 con trietilamina y acetonitrilo (87:13 v/v) la cual pasó a través de la columna a 40 ° C a un flujo de 1,5 mL/min. De cada estándar y de cada muestra se inyectó 25 µL. Cada adquisición cromatográfica duró 12 minutos.

La curva estándar fue preparada a partir de una solución stock de Enrofloxacino a 1mg/mL en fase móvil. A partir de esta se realizaron diferentes diluciones para obtener concentraciones de 0.5, 1, 5, 10, 25, 35 y 50 µg/mL.

Las muestras para la cuantificación indirecta de enrofloxacino en el conjugado fueron tomadas a partir del sobrenadante que resultó de la mezcla del conjugado con acetona. Cada muestra fue diluida en fase móvil para luego ser inyectadas bajo las especificaciones descritas anteriormente.

Método de cuantificación directa de Enrofloxacino en el sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino” por fluorescencia

El método de cuantificación por fluorescencia se escogió por la alta sensibilidad y para restringir la interferencia con otros compuestos de la formulación. Además, la cuantificación directa del fármaco conjugado por HPLC no fue posible debido a las diferencias en solubilidad del enrofloxacino (soluble en solventes orgánicos) y el conjugado (insoluble en solventes orgánicos).

Después de revisar los parámetros descritos por Lihua et *al.*⁷⁵ para detectar la fluorescencia de enrofloxacino, se realizó este ensayo espectrofluorométrico para así obtener la concentración de enrofloxacino conjugado por miligramo de quitosano en la formulación final.

La cuantificación directa de enrofloxacino en el conjugado “Quitosano-Enrofloxacino” se realizó en un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan Flash (Thermo scientific), bajo las condiciones de reacción óptimas para medir la intensidad de la fluorescencia: Longitud de onda de excitación 274 nm y longitud de onda de emisión 450 nm.

Se prepararon soluciones stock de enrofloxacino a 0.359mg/mL, quitosano a 1mg/mL y conjugado a 1mg/mL, los tres en HCl 0.1N. Luego se realizó una dilución 1:100 de cada una de las soluciones. A partir de estas, se obtuvo tres controles (mezcla física de enrofloxacino y quitosano, enrofloxacino libre, quitosano libre) y una muestra (conjugado), mezclando las cantidades correspondientes de cada solución con PBS para obtener concentraciones finales de 1µg/mL de quitosano y 0.027µg/mL de enrofloxacino, que en comparación con el primero método de cuantificación nos permite la detección del fármaco en concentraciones más bajas haciendo este método mucho más sensible. Finalmente, se añadió a cada uno de los controles y a la muestra NaOH 1N para alcanzar el pH 6.0.

Para la curva de calibración estándar se realizó 9 diluciones en PBS de la mezcla física de enrofloxacino y quitosano (Cuadro N° 2). El mismo procedimiento fue

aplicado a los controles de enrofloxacin libre, quitosano libre y la muestra de conjugado para la cuantificación de enrofloxacin por fluorescencia.

Cuadro N° 2. Concentraciones de la mezcla física* para la curva de calibración.

| | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----|------|------|------|-------|-------|--------|--------|---------|
| Quitosano (µg/mL) | 1 | 0.5 | 0.35 | 0.25 | 0.175 | 0.125 | 0.0875 | 0.0625 | 0.04375 |
| Enrofloxacin (ng/mL) | 27 | 13.5 | 9.45 | 6.75 | 4.73 | 3.36 | 2.36 | 1.69 | 1.18 |

*Mezcla física: quitosano y enrofloxacin

Susceptibilidad bacteriana *in vitro* al sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacin”

Las propiedades antibacterianas del conjugado liofilizado fueron determinadas en el Hospital Regional Universitario de Besançon (Francia).

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) sobre las cepas *Trueperella pyogenes* (CIP103129, 15081229 y 15081225), *Bacteroides fragilis* (1500002541 y 1500009287) y *Fusobacterium necrophorum* (1500032358 y 1500095454) se determinó por el método de dilución de Patel J. et al., descrito para determinar la susceptibilidad *in vitro* bacteriana a agentes antimicrobianos ⁷¹.

El caldo de cultivo de elección fue el Müller-Hinton (MH), ajustado en cationes divalentes. Este se utiliza para el método de dilución en medio líquido (microdilución) para bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas más comúnmente encontradas ⁷³. Este se preparó y esterilizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, pero con 100 mililitros menos de agua desionizada que luego serían reemplazados por 100 mililitros de sangre de caballo previamente lisada al 50% a 43 ± 2 °C. En seguida se añadió un mililitro de solución β -NAD (a 20mg/ml) por litro de caldo MH preparado; se mezcló hasta completa homogenización y bajo condiciones estériles.

El procedimiento para la preparación de muestras fue el siguiente: El conjugado liofilizado fue reconstituido en pH ácido con HCl 0.1N a la concentración requerida.

Luego, el pH fue incrementado a 7.0 con NaOH 1N. El precipitado fue recolectado después de centrifugar a 5000 x g por 10 minutos a 4 ° C, y resuspendido en caldo MH a diferentes concentraciones (Cuadros N° 3,4,5 y 6).

El quitosano control se trabajó de la misma manera. Las concentraciones fueron ajustadas con caldo MH de acuerdo a la concentración de quitosano contenido en las muestras de conjugado.

En el caso del enrofloxacin control, el antibiótico fue disuelto en DMSO a 5 mg/mL, y diluido con caldo MH para alcanzar las concentraciones en relación al contenido de enrofloxacin en las muestras de conjugado.

Para el caso de la mezcla física entre el quitosano y el enrofloxacin, se añadió la cantidad requerida de solución stock de enrofloxacin al quitosano control. La mezcla fue diluida en caldo MH para obtener las concentraciones de fármaco y polímero de acuerdo a la proporción en las muestras de conjugado (Cuadros N° 3,4,5 y 6).

Se analizaron ocho concentraciones del conjugado liofilizado (de 64µg/mL a 0.5µg/mL de enrofloxacin), quitosano libre, enrofloxacin libre y la mezcla física (sin conjugar) entre quitosano y enrofloxacin; respetando la proporción quitosano:enrofloxacin de la formulación a evaluar. Se colocó 150 µL de cada muestra y de cada control en forma decreciente en placas de poliestireno de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas), ocho columnas pertenecientes a las diluciones y cuatro columnas a los controles (tres controles negativos a bacteria que corresponden a caldo MH y un control positivo a bacteria que corresponde a caldo MH con el inóculo bacteriano correspondiente) (Cuadros N° 3,4,5 y 6).

Cuadro N° 3. Organización de los pocillos en la placa 1: *Trueperella pyogenes* CIP103129 y *Trueperella pyogenes* 15081229

| PLACA 1 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|--------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-----------|------------|-------------|-------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> CIP 103129 | A | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | B | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | C | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | D | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |
| <i>Trueperella pyogenes</i> 15081229 | E | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | F | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | G | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | H | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |

Conjugado

Quitosano libre

ENR libre

Mezcla física

Control inicial y final: corresponde a la manipulación del caldo MH para las diluciones; control negativo: caldo MH sin inóculo bacteriano; control positivo: caldo MH con inóculo bacteriano correspondiente; ENR: enrofloxacino. Elaboración propia.

Cuadro N° 4. Organización de los pocillos en la placa 2: *Trueperella pyogenes* 15081225 y *Bacteroides fragilis* 1500002541

| PLACA 2 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|--------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-----------|------------|-------------|-------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> 15081225 | A | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | B | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | C | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | D | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541 | E | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | F | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | G | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | H | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |

Conjugado

Quitosano libre

ENR libre

Mezcla física

Control inicial y final: corresponde a la manipulación del caldo MH para las diluciones; control negativo: caldo MH sin inóculo bacteriano; control positivo: caldo MH con inóculo bacteriano correspondiente; ENR: enrofloxacino. Elaboración propia.

Cuadro N° 5. Organización de los pocillos en la placa 3: *Bacteroides fragilis* 1500009287 y *Fusobacterium necrophorum* 1500032358 y 1500095454

| PLACA 3 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|--------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-----------|------------|-------------|-------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> 150009287 | A | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | B | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | C | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | D | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 | E | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | F | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | G | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | H | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |

Conjugado

Quitosano libre

ENR libre

Mezcla física

Control inicial y final: corresponde a la manipulación del caldo MH para las diluciones; control negativo: caldo MH sin inóculo bacteriano; control positivo: caldo MH con inóculo bacteriano correspondiente; ENR: enrofloxacino. Elaboración propia.

Cuadro N° 6. Organización de los pocillos en la placa 4: *Fusobacterium necrophorum* 1500095454

| PLACA 4 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|--------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-----------|------------|-------------|-------------|
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500095454 | A | C. inicial 1 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 1 | C. negativo | C. positivo |
| | B | C. inicial 2 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 2 | | |
| | C | C. inicial 3 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 3 | | |
| | D | C. inicial 4 | 64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0.5 µg/ml | C. final 4 | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |

Conjugado

Quitosano libre

ENR libre

Mezcla física

Control inicial y final: controles de la manipulación del caldo MH para las diluciones; control negativo: caldo MH sin inóculo bacteriano; control positivo: caldo MH con inóculo bacteriano correspondiente; ENR: enrofloxacino. Elaboración propia.

Para la preparación del inóculo para la prueba de dilución se utilizó el método de suspensión directa de colonias⁷¹. Primero se suspendió en suero fisiológico las colonias en estudio aisladas de una placa de agar (incubada 18 a 24 horas). Esta suspensión se ajustó, usando un nefelómetro calibrado, para llegar a una turbidez

equivalente a 0.5 McFarland ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$). Luego, dentro de los 15 minutos siguientes, se diluyó la suspensión en caldo MH para que así después de inocular las cepas bacterianas, cada pocillo contuviese aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ (rango $2 \text{ a } 8 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$).

En cada pocillo perteneciente a las diluciones de las muestras se colocó 50 μL del inóculo. Además, en cada placa de poliestireno se inocularon dos cepas diferentes (en total 7 cepas bacterianas) y cada placa se realizó por triplicado (Cuadros N° 3,4,5 y 6). Incubación por 36 hrs a 35°C. (Anexo 4)

Método de cuantificación de colonias en agar para determinar la susceptibilidad bacteriana *in vitro* al sistema conjugado “Quitosano-Enrofloxacino”

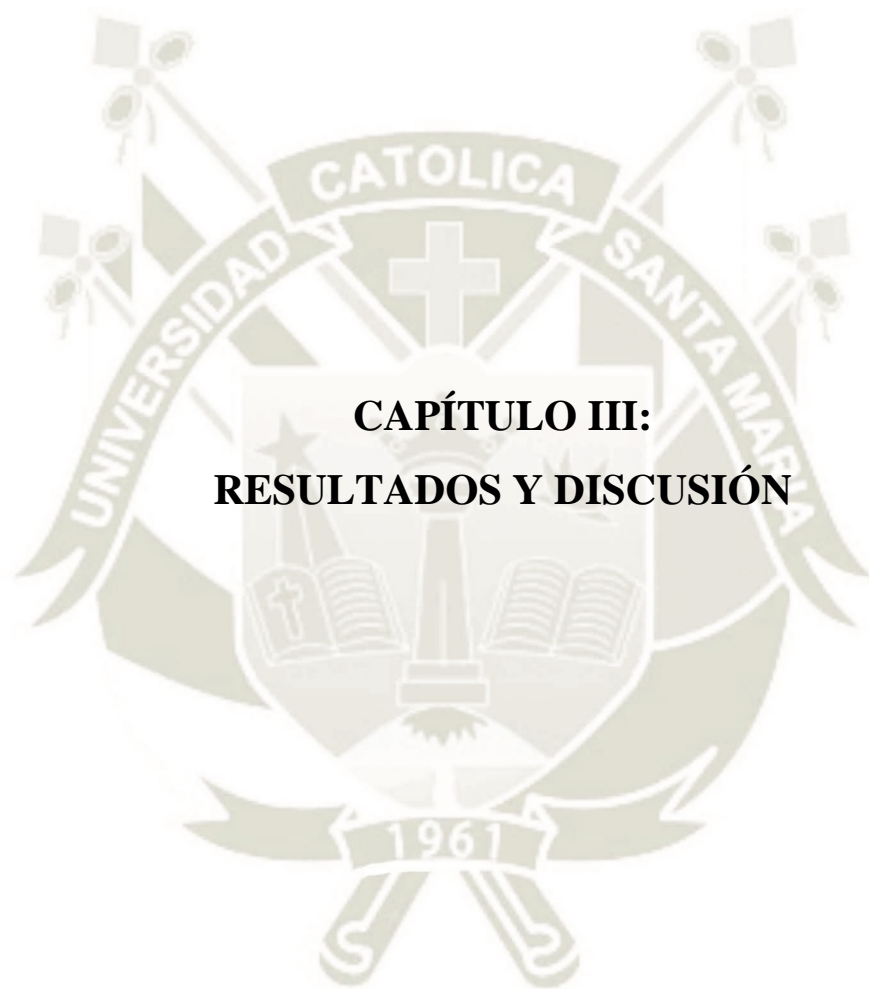
Esta prueba se realizó en agar MH distribuido en placas Petri. Primero se hizo una dilución 10^{-6} en suero fisiológico de la muestra proveniente de cada pocillo de MIC de enrofloxacino libre, el doble del mismo y los equivalentes en conjugado, quitosano libre y la mezcla física.

Luego se dispersó 100 μL de la dilución correspondiente en la superficie de la placa Petri, mediante el método de dispersión por agotamiento. Se procedió a la identificación de cada placa.

Las placas Petri fueron incubadas por 24 horas en una cámara de cultivo anaeróbico modelo Whitley A35, Don Whitley Scientific. Finalmente, se realizó un conteo del número de colonias.

Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante la técnica de estadística descriptiva con el cálculo de medidas de tendencia central y dispersión de datos.



**CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1. Desarrollo del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

El sistema conjugado “polímero - fármaco” se propone después de la evaluación de una nanoemulsión formulada por una estudiante de la maestría International LipTherap de la Universidad Franche-Comté. El principal problema de esa formulación fue que, si bien tenía un alto porcentaje de encapsulación, el tiempo de liberación *in vitro* no excedía las 8 horas, por lo que no se pudo calificar como un sistema de liberación controlada y sostenida de medicamentos ⁷⁴. Es por esta razón que en el campo veterinario se tendría que aplicar la formulación repetidas veces o con mayor frecuencia, provocando estrés y excesiva manipulación de los animales productivos lo que repercute negativamente sobre la producción láctea.

Una segunda formulación de nanopartículas poliméricas, a base de Poli[ácido-láctico-co-glicólico] (PLGA) y enrofloxacino, desarrollada por el Laboratorio de Farmacia Galénica y Biofarmacia de la Universidad Franche-Comté, fue probado en dos diferentes concentraciones. Sin embargo, la cuantificación por HPLC reveló que el porcentaje de encapsulación del fármaco era nulo. Este resultado se explicó por la solubilidad del enrofloxacino en la fase de dispersión debido a la presencia del surfactante de alcohol polivinílico (PVA) y de polietilenimina (PEI).

Debido a las dificultades para encapsular el fármaco dentro de las nanopartículas, la alternativa de elección fue el conjugado “Quitosano-Enrofloxacino”. El quitosano es conocido por sus propiedades mucoadhesivas y actividad antibacteriana^{59,69}, lo que puede originar un efecto sinérgico con el enrofloxacino. Además, la presencia del ácido carboxílico en el enrofloxacino y el grupo amino en el quitosano facilita la reacción de conjugación. La activación del ácido carboxílico usando el reactivo EDC permitirá la formación de un enlace amida entre el polímero y el fármaco, además se espera mayor eficiencia agregando NHS a la reacción. Esto resultará en la formación de un sistema conjugado y la eliminación de una molécula de agua. Un sistema de liberación controlado se espera luego de la ruptura del enlace amida gracias a las proteasas producidas por las bacterias.

2. Optimización del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

El conjugado final se logró mediante una reacción de crosslinking (proceso de unir químicamente dos o más moléculas por un enlace covalente). Esta reacción se dio entre quitosano, un biopolímero conocido por sus propiedades mucoadhesivas y antiinflamatorias usado como un nano transportador, y enrofloxacino, fluoroquinolona de uso veterinario conocida por su buena absorción y alta biodisponibilidad oral ⁴⁴.

Con el fin de optimizar la conjugación, se modificó la concentración de fármaco y agentes activantes o crosslinkers.

Inicialmente se realizó un estudio piloto para determinar la formulación más adecuada (Tabla 1). En adelante se hicieron replicaciones para determinar la reproducibilidad de los conjugados formulados.

Se trabajó con una concentración base de 2.5 mg de quitosano por mililitro de formulación final y se utilizaron distintas concentraciones de enrofloxacino (2, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL) además originalmente sólo se agregó EDC como agente activante a una concentración de 1mg/mL y por un tiempo de incubación de 24 horas. Se tomaron en cuenta dos controles F1 (mezcla física entre quitosano y enrofloxacino) y F2 (enrofloxacino libre), para verificar la eficiencia de la reacción (Tabla 1).

Tabla N° 1. Porcentaje de fármaco conjugado. *

| Formulación | Composición (mg/mL) ENR:EDC:Quitosano | %ENR conjugado | µgENR/mL |
|-------------|--|-------------------|----------|
| F1 | 2: 0: 2.5 | 5.78 | 114.25 |
| F2 | 2 : 1: 0 | 5.46 | 108.86 |
| F3 | 2: 1: 2.5 | 11.98 | 238.3 |
| F4 | 1: 1: 2.5 | 14.54 | 148.6 |
| F5 | 0.5: 1: 2.5 | 32.65 | 166.9 |
| F6 | 0.25: 1: 2.5 | 18.49 | 48.27 |

*Cuantificación indirecta de Enrofloxacino conjugado por HPLC; ENR: enrofloxacino; EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

Los resultados para comparar las formulaciones iniciales fueron obtenidos de una cuantificación indirecta por HPLC de enrofloxacinó libre en el sobrenadante (Tabla 1). A partir de estos resultados se optimizaron las formulaciones 5 y 6. Esto en razón a que las concentraciones 0.5 y 0.25 mg/mL de enrofloxacinó tenían un porcentaje mayor de conjugación que las otras formulaciones.

El método de cuantificación por HPLC posteriormente fue cambiado a cuantificación por fluorescencia, ya que los resultados no demostraban detección al 100% de enrofloxacinó libre como control. Además, los resultados obtenidos por el método de cuantificación indirecta por HPLC no eran reproducibles y mostraban gran margen de diferencia con el método directo, el cuál fue parcialmente validado en el laboratorio (Tabla 2).

Tabla N° 2. Comparación de métodos de cuantificación de Enrofloxacinó (n=2)

| Formulación | Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS :Quitósano | HPLC µgENR/mL | Fluorescencia µgENR/mL |
|--------------------|---|--------------------------|-----------------------------------|
| F5 | 0.5:2:2:2.5 | 15.63* | 22.05 ± 0.67 |
| F6 | 0.25:2:2:2.5 | 52.65* | 18.45 ± 1.52 |

HPLC: Cuantificación indirecta. / Fluorescencia: Cuantificación directa; ENR: enrofloxacinó; EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; NHS: N-hidroxisuccinimida; *n=1

La cuantificación de enrofloxacinó en el conjugado se realizó mediante cuantificación directa por fluorescencia. La longitud de onda de excitación y emisión fueron de 274 nm y 450 nm, respectivamente. Estos valores provienen del estudio realizado por Lihua et al.⁷⁵ y fueron confirmados por los espectros de emisión y excitación a pH 6.0 en el presente estudio. Además, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de una mezcla física entre enrofloxacinó y quitósano libres, esto para determinar la fluorescencia del quitósano y evitar interferencias al momento de interpretar los valores obtenidos.

El EDC, una carbodimida soluble en agua que activa los grupos carboxilo para la reacción espontánea con aminas primarias, se utilizó junto al NHS para aumentar la eficiencia de la reacción⁷⁶. Sin embargo, el incremento de las concentraciones mayor a 3mg/mL de ambos agentes activantes, resultó en partículas de gel de diferentes tamaños incapaces de solubilizarse para la cuantificación por fluorescencia, mientras que una concentración de 2 mg/mL de EDC y 2 mg/mL de NHS permitieron optimizar la cantidad de fármaco conjugado (Tabla 3).

Tabla N° 3. Impacto de distintas concentraciones de EDC y NHS sobre la conjugación de Enrofloxacino* (n=2)

| Formulación | Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS:Quitosano | µgENR/mL |
|----------------|--|--------------|
| F5 | 0.5:2:2:2.5 | 21.58 ± 0.64 |
| F5a | 0.5:2:3:2.5 | 15.68 ± 1.83 |
| F6 | 0.25:2:2:2.5 | 18.45 ± 1.51 |
| F6a | 0.25:2:3:2.5 | 11.86 ± 0.37 |
| Control | 0.5:0:0:2.5 | 9.54 ± 0.61 |

*Cuantificación directa por método de fluorescencia en conjugado liofilizado

Se trabajó a pH 5.0 ya que la reacción de acoplamiento es óptima cuanto más cerca a pH neutro esté la mezcla⁷⁶; pero la solubilidad del quitosano y el enrofloxacino tiende a ser en pH ácido. Por esto es que polímero y fármaco se disolvieron primero en medio ácido (HCl 0.1N), y después de haber agregado tampón MES se pudo incrementar el pH a 5.0.

Después del acoplamiento, y para obtener un conjugado más puro, fue necesario separar los remanentes de los reactivos utilizados en el conjugado. El primer paso fue eliminar el enrofloxacino libre usando acetona como solvente, además, con este método fue posible aislar el conjugado después de centrifugación. Luego, con el fin de remover los reactivos hidrosolubles, el subproducto isourea y los remanentes de enrofloxacino libre, se realizó una diálisis en agua con una membrana de 12-14 kDa. Adicionalmente, se realizó una cuantificación de enrofloxacino en el medio de diálisis para comprobar que no quedaban trazas de fármaco libre, y así finalmente liofilizar y almacenar.

La cuantificación por fluorescencia fue repetida en tres lotes diferentes para determinar la reproducibilidad del método de conjugación (Tabla 4).

Tabla N° 4. Cuantificación directa de Enrofloxacinó en la formulación final por fluorescencia (n=3)

| FORMULACIÓN | Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS:Quitósano | µgENR/mL |
|-------------|--|-------------|
| F5 | 0.5:2:2:2.5 | 23.1 ± 1.95 |

Estos resultados demostraron que es posible obtener un conjugado conteniendo valores de fármaco reproducibles, 23.1µg ± 1.95 (n=3) de enrofloxacinó por mL de formulación. El estudio antibacteriano permitirá verificar si el enrofloxacinó puede ser liberado del quitósano después de incubación con bacterias; y si el método de conjugación utilizando el grupo carboxilo del enrofloxacinó no alterará su actividad antibacteriana.

3. Determinación del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitósano-Enrofloxacinó”

El tamaño se determinó a partir del conjugado liofilizado y posteriormente reconstituido en medio ácido (HCl 0.1N). Si bien, la definición de nanopartícula comprende la talla entre 1 nm a 100 nm, el tamaño del sistema conjugado “Quitósano-enrofloxacinó” obtenido, se encuentra en la segunda categoría de clasificación de nanopartículas (500 nm > talla > 100 nm) según la comunidad europea “Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)”⁷⁷ (Tabla 5).

Tabla N° 5. Tamaño, PDI y potencial zeta del sistema conjugado “Quitosano-Enrofloxacino” (n=3)

| Formulación | Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS:Quitosano | Tamaño (nm) | PDI | Potencial zeta (mV) |
|-------------|--|----------------|-----------|---------------------------|
| F5 | 0.5:2:2:2.5 | 492.73±74.39 | 0.86±0.01 | 30.0±5.05 |

El PDI con un valor de 0.8, indica que hay diferentes poblaciones de partículas. Debido a que la medición del PDI se hizo a partir del conjugado liofilizado y reconstituido, los siguientes estudios deben enfocarse en disminuir este indicador para obtener una formulación con una población más uniforme, así como un conjugado más estable (Anexo 1).

El conjugado presenta una alta carga positiva de 30.0 mV, lo cual le confiere a la formulación estabilidad, resistencia a la agregación y propiedades mucoadhesivas sobre las células de endometrio que presentan carga negativa^{78,79}. Además, las bacterias presentan una carga negativa en su pared, lo que facilita su adhesión al sistema conjugado. Una vez degradado el enlace amida gracias a las proteasas secretadas por las bacterias, el fármaco pasará a través de la membrana celular y se unirá a los sitios de acción, las topoisomerasas bacterianas tipo II (girasa y topoisomerasa IV), convirtiéndolas en enzima tóxicas que fragmentarán el cromosoma bacteriano^{80,81}.

4. Implementación de la prueba de susceptibilidad bacteriana *in vitro* al sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano-Enrofloxacino”

El método de microdilución o dilución en caldo fue el de elección. Con este método se puede determinar la concentración mínima inhibitoria con volúmenes de hasta 0.1 mL de solución antimicrobiana por pocillo, obteniendo así resultados cuantitativos con diferentes diluciones del compuesto a estudiar^{71,82}.

En comparación con el sistema de difusión por zonas, el método de dilución en caldo se usa con menos frecuencia porque es más complejo, consume más tiempo y es costoso. Sin embargo, debido a que los ensayos de difusión de zona solo categorizan los resultados de laboratorio como susceptibles, intermedios o resistentes, no es posible cuantificar la resistencia por las concentraciones reales del antimicrobiano⁸¹. La ventaja de conocer la MIC (obtenida por dilución en caldo) es que la resistencia se puede cuantificar con mayor precisión. Además, en el método de microdilución o dilución en caldo se utiliza menos agente antimicrobiano, y es posible su homogenización completa en el medio de cultivo^{72,82}.

El caldo Mueller Hinton ajustado en cationes divalentes, es el medio que se usa para el método de microdilución o dilución en medio líquido^{71,73}. El caldo presenta un ajuste en cationes calcio y magnesio recomendado por el Subcomité del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), para su uso en bacterias de crecimiento lento según la norma ISO 20776-1, 2006⁷³. Además, se le añadió 5% de sangre de caballo, previamente lisada, ya que la sangre de cordero posee un contenido alto de timina que interfiere con las determinaciones de susceptibilidad en la prueba. La combinación del caldo MH, sangre de caballo y solución β -NAD posibilita el crecimiento de microorganismos fastidiosos, según las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y CLSI.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron repicadas en el Hospital Regional Universitario de Besançon (Francia) a partir de muestras de endometritis en vacuno (*Trueperella pyogenes*) y muestras de paciente humano (*Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium necrophorum*). El uso de bacterias anaeróbicas para el estudio de la actividad antimicrobiana, se debió a la creciente resistencia reportada a los antimicrobianos comúnmente utilizados en clínica en diferentes especies^{71,82}. Además, los microorganismos anaerobios son parte de la microbiota normal, por lo que el uso de antimicrobianos de manera indiscriminada y sistémica lleva a la aparición de cepas multiresistentes^{82,84}.

Se realizó inicialmente la prueba de microdilución en caldo MH para determinar la concentración mínima inhibitoria del enrofloxacino a cada una de las cepas. Esto para analizar las diferencias en cuanto a patogenicidad entre las cepas aisladas de

muestras reales y las que podemos encontrar en literatura o en otros reportes. Las cepas bacterianas fueron evaluadas frente a las concentraciones de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL de enrofloxacin.

Los valores para interpretar el MIC de una gama de agentes patógenos y antimicrobianos veterinarios se encuentran en la base de datos del CLSI (2018) ⁸⁵. Además, encontramos también resultados derivados de patógenos humanos y antimicrobianos que pueden ser tomados de valores referencia en veterinaria, estos son publicados por EUCAST ⁸⁶. Sin embargo, es poco la información acerca de las cepas bacterianas aisladas de muestras de útero bovino y utilizadas en este estudio. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó bajo los parámetros descritos por Patel J. *et al* 2015 (CLSI, 2015). El pocillo conteniendo la menor concentración del agente antibacteriano que se encuentra sin crecimiento bacteriano aparente, fue el resultado de MIC para la cepa correspondiente (Tabla 6).

Tabla N° 6. MIC por método de microdilución en caldo para Enrofloxacin libre

| Cepa bacteriana | MIC (µg/mL) |
|---|-------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> CIP 103129 | 8 |
| <i>Trueperella pyogenes</i> 15081229 | 8 |
| <i>Trueperella pyogenes</i> 15081225 | 16 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541 | 8 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500009287 | 16 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 | 32 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500095454 | 32 |

MIC: concentración mínima inhibitoria

Para *Trueperella pyogenes*, descrita como un microorganismo de crecimiento difícil o “fastidioso” y una cepa bacteriana que puede actuar sinérgicamente con otras bacterias Gram- resultando en un impacto negativo sobre la performance reproductiva^{71,80,83}, el MIC fue de 8 a 16 µg/mL (Tabla 6). CLSI y Trek Diagnostic

Systems Ltd. compañía microbiológica, sugieren y calculan el rango de 0.5 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Trueperella pyogenes* ATCC utilizada como control de calidad⁸¹. Este resultado fue corroborado por un estudio en el que evalúan la frecuencia de distribución del MIC de diferentes antibacterianos, incluyendo el enrofloxacin, en los días en leche (DEL) entre el día 2 a 43, obteniendo un rango entre 0.5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁸². Además, otro estudio elaborado por Sheldon et al.,⁸³ analizó 22 cepas correspondientes *Trueperella pyogenes* aislada de útero bovino encontrando un MIC de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para *Bacteroides fragilis*, microorganismo anaerobio frecuentemente aislado de infecciones mixtas con una alta resistencia a antibacterianos, el rango obtenido fue de 8 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 6). En este caso se le comparó con el MIC de ciprofloxacino, metabolito del enrofloxacin, en 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁸⁷. Se encontró además el MIC en un valor de 0.125 a 16 mg/mL , en un estudio de cepas del género *Bacteroides* aisladas de muestras de perros y gatos⁸⁴.

Finalmente, para *F. necrophorum*, microorganismo patógeno oportunista aislado de boca, tracto gastrointestinal y genitourinario en animales que además posee diferentes mecanismos de defensa en el hospedero, así como la capacidad de crear un ambiente anaeróbico para colonizar y ocasionar daño tisular⁸⁸, el MIC encontrado fue de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 6). Según resultados obtenidos por otro estudio, el análisis de 22 cepas de este microorganismo resultó en un MIC en el rango de 4 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁸³.

Los resultados para el MIC en las diferentes cepas bacterianas estudiadas son más elevados que el de los puntos de corte establecidos en los diferentes estudios mencionados anteriormente. Esta comparación sirve de referencia para establecer la patogenicidad del microorganismo y su susceptibilidad frente al fármaco, además ya que obtenemos una cantidad de enrofloxacin conjugado por mililitro de formulación podemos trabajar variando la concentración a administrar localizadamente para el tratamiento de ES según la patogenicidad de las cepas en posteriores estudios *in vivo*.

Además, hay evidencia de que *A. pyogenes* (*Trueperella pyogenes*), *Bacteroides sp.* y *Fusobacterium necrophorum* actúan sinérgicamente y son asociados a casos

severos de infecciones uterinas⁸¹. Esta fue una de las razones para seleccionar las cepas bacterianas estudiadas.

Asimismo, debemos tener en cuenta que las cepas bacterianas como el *F. necrophorum* producen unas enzimas llamadas proteasas⁸⁹. Esto puede ayudar a fragmentar el enlace amida formado entre el quitosano y el enrofloxacino en la reacción de conjugación, y así poder liberar el fármaco para su unión a las enzimas bacterianas^{90,91}.

A partir de estos resultados se realizaron varios ensayos para determinar el MIC del conjugado a las tres cepas bacterianas en estudio. Primero se determinó las concentraciones a trabajar, estas fueron de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL de enrofloxacino, en base a los resultados obtenidos en la cuantificación por fluorescencia en el conjugado.

Luego se determinó que para evaluar la actividad antibacteriana del conjugado se debía conocer también las propiedades antimicrobianas de los compuestos principales del conjugado. Es así que se analizó una muestra (el conjugado liofilizado) y tres controles (quitosano solo, enrofloxacino solo y una mezcla física entre el quitosano y enrofloxacino). Además, por cada cepa bacteriana analizada se añadió el control positivo a bacteria con el inóculo correspondiente y un control negativo a bacteria.

Finalmente, en el proceso de preparación de las placas de poliestireno de 96 pocillos y debido a la manipulación de las muestras es que se optó por efectuar controles del caldo MH, antes y después de la manipulación para excluir posible contaminación e interferencia con los resultados.

Sin embargo, al momento de reproducir la prueba e interpretar los resultados se determinó que esto no era posible, ya que en los pocillos conteniendo el quitosano en forma de conjugado, mezcla física y quitosano libre, había un sedimento que variaba en cantidad según la dilución utilizada.

Ya que para obtener el MIC, se debe identificar el pocillo que posea la mínima cantidad de antimicrobiano que inhiba el crecimiento de la cepa inoculada⁷³, el quitosano sedimentado imposibilitaba definir visualmente si las cepas eran susceptibles o no al sistema conjugado quitosano-enrofloxacino.

En razón a esto, se optó por hacer un cultivo en agar para determinar la susceptibilidad de las cepas a la muestra y controles. Se analizó el pocillo correspondiente al MIC de enrofloxacino, de las tres cepas en estudio (Tabla 6), y se comparó con el pocillo correspondiente a la misma dilución de la muestra y los controles (quitosano y mezcla física). Esta prueba alternativa se realizó en agar MH, primero se hizo una dilución 10^{-6} de la muestra de cada pocillo, luego se dispersó 100 μ L de la dilución en la superficie de una placa petri de agar. Se incubó por 24 horas y se hizo un conteo del número de colonias (Tabla 7).

Los resultados muestran que, en el pocillo del MIC de enrofloxacino correspondiente a cada cepa bacteriana, el conteo de colonias es bajo o casi nulo (lo que es normal, ya que este fármaco es de característica bacteriostática); además al evaluar la concentración anterior del MIC (el doble de la concentración), según la organización de las placas de poliestireno de 96 pocillos (Cuadros N° 3,4,5 y 6), quedan menos o ninguna colonia bacteriana (Tabla 7).

Tabla N° 7. Comparación del número de colonias después de sembrar a una dilución a 10⁻⁶

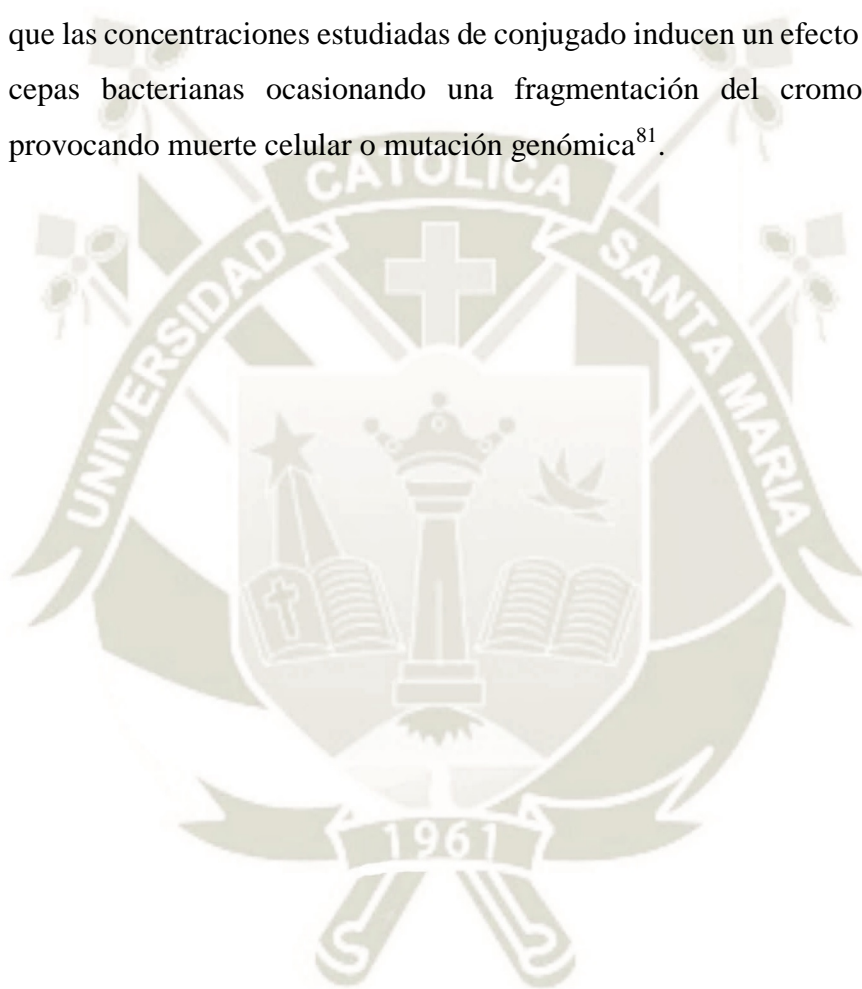
| Cepa bacteriana | Agente antimicrobiano | Pocillo | µg/mL | N° de colonias |
|--|-----------------------|---------|-------|----------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> CIP 103129 | Conjugado | MIC | 8 | 0 |
| | | MIC +1 | 16 | 0 |
| | Quitosano libre | MIC | 8 | 0 |
| | | MIC +1 | 16 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 8 | 23 |
| | | MIC +1 | 16 | 1 |
| | Mezcla física | MIC | 8 | 1 |
| | | MIC +1 | 16 | 10 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541 | Conjugado | MIC | 8 | 0 |
| | | MIC +1 | 16 | 0 |
| | Quitosano libre | MIC | 8 | 2 |
| | | MIC +1 | 16 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 8 | 5 |
| | | MIC +1 | 16 | 1 |
| | Mezcla física | MIC | 8 | 3 |
| | | MIC +1 | 16 | 2 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 | Conjugado | MIC | 32 | 22 |
| | | MIC +1 | 64 | 4 |
| | Quitosano libre | MIC | 32 | 52 |
| | | MIC +1 | 64 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 32 | 114 |
| | | MIC +1 | 64 | 0 |
| | Mezcla física | MIC | 32 | 86 |
| | | MIC +1 | 64 | 0 |

MIC: pozo equivalente al MIC de enrofloxacino, MIC + 1: pozo correspondiente al doble del MIC de enrofloxacino; conjugado: quitosano y enrofloxacino unidos por enlace covalente; mezcla física: quitosano y enrofloxacino no conjugados.

Al evaluar los pocillos correspondientes al control quitosano libre, estos resultados preliminares indican que el quitosano posee actividad antimicrobiana, posiblemente en la misma proporción a la del enrofloxacino.

Por otro lado, los resultados indican que el MIC del conjugado es menor al del enrofloxacino libre, lo que probablemente indique que es más eficiente (Tabla 7). Esto además indica que la actividad antibacteriana del enrofloxacino no es alterada por el método de conjugación; esto debido a que el átomo de flúor presente en la

segunda generación de quinolonas, quien le confiere mayor espectro antibacteriano sobre bacterias Gram+ y Gram-⁸¹, no se ve afectado por el proceso de formulación. Conjuntamente, al evaluar el conteo de colonias del MIC y MIC+1 del conjugado encontramos que en el caso de *T. pyogenes* y *B. fragilis* es nulo, y en el caso de *F. necrophorum* es menor al de los resultados del enrofloxacin solo. Luego de ingresar a la bacteria, las quinolonas tienen dos efectos: bacteriostático a bajo nivel de concentración y bactericida a altos niveles de concentración^{81,92}. Esto puede indicar que las concentraciones estudiadas de conjugado inducen un efecto bactericida en las cepas bacterianas ocasionando una fragmentación del cromosoma bacteriano provocando muerte celular o mutación genómica⁸¹.



Conclusiones

- Primera: Se logró el conjugado quitosano-enrofloxacino mediante una reacción de conjugación usando dos agentes activantes de los grupos amino del quitosano y el grupo carboxilo del enrofloxacino, esto se demostró mediante la cuantificación directa por medio de fluorescencia del fármaco contenido en el conjugado. El resultado fue de 23.1 $\mu\text{g/mL}$ de enrofloxacino en la formulación final.
- Segunda: Se obtuvo el MIC del enrofloxacino sobre las cepas bacterianas *Trueperella pyogenes* (CIP103129, 15081229 y 15081225), *Bacteroides fragilis* (1500002541 y 1500009287) y *Fusobacterium necrophorum* (1500032358 y 1500095454) cuyos valores fueron 8, 8, 16, 8, 16, 32 y 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Al realizar el cultivo para el conteo de colonias de los pocillos correspondientes al MIC de enrofloxacino y su equivalente para el conjugado, se demostró que el este posee igual o mayor actividad antimicrobiana frente al enrofloxacino libre. El método de conjugación no altera la actividad antimicrobiana del enrofloxacino y además existe un efecto sinérgico entre polímero y fármaco.

Recomendaciones

1. Realizar el cultivo y posterior conteo de colonias de cada pocillo de la placa de poliestireno de 96 pocillos, para así tener resultados mucho más exactos y determinar la reproducibilidad de la prueba.
2. Continuar con las pruebas *in vitro* para determinar la citotoxicidad del conjugado en células pertenecientes a endometrio de ganado bovino.
3. Implementar un sistema de datos acerca de la MIC de las cepas bacterianas aisladas de muestras de útero bovino.
4. Comparar los resultados de la MIC de enrofloxacino obtenidos de enfermedad uterina de ganado bovino de la ciudad de Besançon (Francia) y nuestra localidad Arequipa (Perú).
5. Optimizar la prueba de susceptibilidad microbiana para hallar la concentración mínima inhibitoria del conjugado a las cepas identificadas en ES en la localidad de Arequipa (Perú).
6. Evaluar la capacidad de traspaso del conjugado a través de tejido endometrial y moco uterino obtenido de animales con ES.
7. Realizar trabajo de campo *in vivo* para evaluar la efectividad del sistema conjugado quitosano-enrofloxacino.

Bibliografía

1. Sheldon, I.M., et al., Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, 2009. 44 Suppl 3: p. 1-9.
2. Carneiro, L.C., et al., Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Trop Anim Health Prod*, 2014. 46(8): p. 1435-9
3. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006 May; 65(8): 1516-1530.
4. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS and Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J.Dairy Sci.* 2002 Sep; 85(9): 2223-2236.
5. Reátegui J, Arenas E, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini P. Impacto de la endometritis subclínica en la performance reproductiva de vacas lecheras. *Spermova*, 2015. 5(1): p. 15 - 19.
6. LeBlanc, S.J., Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*, 2008. 176(1): p. 102-14.
7. LeBlanc, M.M. and R.C. Causey, Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim*, 2009. 44 Suppl 3: p. 10-22.
8. Ferris, R.A., Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2017. 4(1): p. 74 - 80.
9. Arrott, C., et al., Biodegradable estradiol microspheres do not affect uterine involution or characteristics of postpartum estrus in mares. *Theriogenology*, 1994. 42(2): p. 371-84
10. Gavini, E., et al., Mucoadhesive vaginal tablets as veterinary delivery system for the controlled release of an antimicrobial drug, acriflavine. *AAPS PharmSciTech*, 2002. 3(3): p. E20.
11. Rutter B. Puerperio Bovino. Sitio Argentino de Producción Animal. Facultad de Buenos Aires – Argentina 2002.

12. Massimiliano E. Manual de reproducción en ganado vacuno. S.L. Servet Diseño Y Comunicación. España, 2015.
13. Hafez y Hafez B. (eds.). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ma Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México 2002. p.157.
14. Senger P. Fertility factors; Which ones are really important? Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. Washington State University. 2003.
15. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. Anim. Reprod. Sci. 2004; 82-83: 295-306.
16. Arenas E. Determinación del punto de corte de polimorfos nucleares neutrofilos (PMN – N) para el diagnóstico de endometritis sub clínica e impacto sobre la eficiencia reproductiva y productiva en vacas lecheras. Irrigacion majes, arequipa. 2014. Proyecto de tesis. UCSM. 2014.
17. Arthur, G.H.; Noakes, D.E.; Pearson, H. (1991) Reproducción y Obstetricia Veterinaria. Madrid, McGraw-Hill Interamericana. 702p.
18. Sheldon, I.M, Noakes, D.E, Rycroft, A.N, Pfeiffer, D.U, Dobson, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. Reproduction. 2002;123:837–845.
19. Foldi, J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, De Sa C, Lohuis JA., Cox P, Huszenicza G. Bacterial complications of postpartum uterine in cattle. Anim Reprod Sci 2006; 96 (3-4):265-281.
20. Palmer C. Endometritis en vacas lecheras. Taurus, 2008, 10 (37):25-32.
21. Aquisé G., Presencia De Polimorfos Nucleares Neutrófilos (PMN–N) Como Indicador De Endometritis Sub Clínica En Vacas Lecheras De Diferentes Genotipos Mediante El Método De Citología Endometrial - La Joya - Arequipa – 2015. Tesis para optar por el título Profesional de Médico Veterinario. UCSM. 2015.
22. Seals RC, Matamoros I, Lewis GS. Relationship between postpartum changes in 13, 14- dihydro-15- keto PGF₂α concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. J Anim Sci. 2002; 80:1068-1073.
23. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. J Anim Sci. 1999; 77 Suppl 2: 101-110.
24. Arthur GH., Noakes DE., Parkinson TJ, England GCW. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, eighth ed. Elsevier Sci. 2002. Ltd, 868 p.

25. Barlund C, Carruthers T, Waldner C, Palmer C. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 2008; 69: 714-723.
26. Pascottini O, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G. A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology*. 2015; 84:1438-46.
27. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2004; 62:9-23.
28. Bogado P. y Opsomer G. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del postparto uterino en vacas lecheras: una revisión con énfasis en la endometritis subclínica. Universidad de Guelph – Colegio de Veterinaria de Ontario, Departamento de Medicina de Población, Canadá. *Compen. Cienc. Vet*. 2017; 07 (01): 29-40.
29. Overbeck W, Witte TS y Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 2011. 15; 75(7):1311-8
30. Dubuc J. Postpartum uterine diseases: prevalence, impacts, and treatments. *Adv Dairy Technol*. 2011; 23: 255-267.
31. de Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, et al. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Dairy Sci*. 2014; 97: 3983-3999.
32. Reátegui J, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini PR. Punto de corte de polimorfos nucleares neutrófilos para diagnóstico de endometritis subclínica por citología endometrial en vacas lecheras. *Spermova*, 2015. 5(1): p. 79 - 82.
33. Galvão K, Frajblat M, Brittin S, Butler W, Guard C, Gilbert R. Effect of prostaglandin F₂ α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2009; 92: 4906-4913.
34. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 2005; 64:1879-1888.

35. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 5225-5233.
36. Quintela L., Vigo M., Becerra J., Barrio M., Peña A. y Herradón P. Endometritis subclínica en ganado vacuno lechero: etiopatogenia y diagnóstico. Revisión Bibliográfica. ITEA (en prensa), Vol. xx, 1-17. 2017. DOI: 10.12706/itea.2017.016
37. Arenas E, Reategui J, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini PR. Frecuencia de endometritis subclínica en el postparto de vacas lecheras en Arequipa. *Spermova*, 2015. 5(1): p. 93 - 96.
38. Brown, S.A. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1996. 19, 1–14.
39. Lizondo M, Pons M, Gallardo M & Estelrich, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997, 15, 1845–1849.
40. Fauchier, N. (2013) *Med’Vet, le recueil des spécialités á usage vétérinaire*. 2014th Edition, Med’com, Paris.
41. Schroder J. Enrofloxacin: a new antimicrobial agent. *Journal of the South African Veterinary Association* (1989), 60, 122–124.
42. Prescott JF & Yielding KM. In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1990. 54, 195–197.
43. Hannan P, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N. & Stegemann M. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997. 41, 2037–2040.
44. Vancutsem PM, Babish JG & Schawrk WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *The Cornell Veterinarian* 1990, 80, 173–186.
45. Kung K, Piond JL & Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1993, 16, 462–468.
46. Scheer M. Studies on the antibacterial activity of Baytril. *Vet Med Rev* 1987; 2: 104-8.

47. Comité for Medicinal Products for veterinary Use (CVMP) (2007) Public Statement on the Use of (Fluoro) Quinolones in Food-Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health.
48. Martínez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet J* 2006; 172(1): 10-28.
49. Bebear CM, Renaudin J, Charron A, Renaudin H, de Barbeyrac B. Schae-verbeke, T. & Bebear, C. Mutations in the gyrA, parC, and parE genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999, 43, 954–956.
50. Wu CC, Shryock TR, Lin TL, Faderan M & Veenhuizen, MF. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinitis*. *Veterinary Microbiology* 2000, 76, 25–30.
51. Gautier-Bouchardon AV, Reinhardt AK, Kobisch M & Kempf I. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology* 2002, 88, 47–58.
52. Tang S, Zhou Y, Li R, Chen Q, Xiao X. Pharmacokinetics and lung-targeting characterization of a newly formulated enrofloxacin preparation. *J. vet. Pharmacol. Therap* 2007. 30, 443–450.
53. Mitchell MA. Enrofloxacin. *J Exotic Pet Med* 2006; 15: 66-72.
54. Boothe DM. Enrofloxacin revisited. *Veterinary Medicine* 1994, 8, 744– 753.
55. Mendoza G, Rodríguez J. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos* 2007, núm. 29, enero-junio, pp. 161-186 Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales Distrito Federal, México
56. Cuadros M., Llanos A., Villegas R. Nanotecnología en Medicina. Informe de síntesis de tecnología emergente. *Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias AETSA 2007/02-2*. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. España.
57. National Cancer Institute (NCI). *Cancer Nanotechnology. Going small for big advances using nanotechnology to advance cancer diagnosis, prevention and treatment*. National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2004. Bethesda: NCI. NIH Publication No 04-5489.

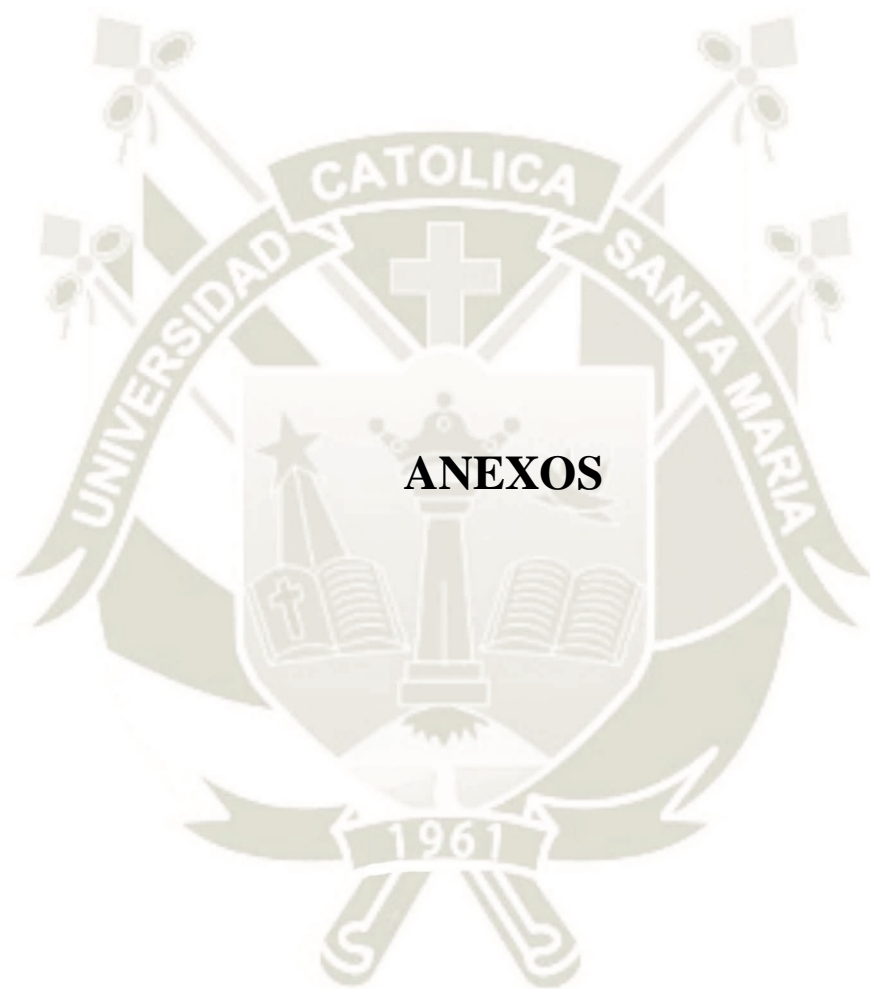
58. Villafuerte-Robles L. Nanotecnología Farmacéutica. Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de México., México 2014. ISSN 1605-4806
59. E. Koziolová, K. Vencíková, T. Etrych. Polymer-Drug Conjugates in Inflammation treatment. Review. *Physiol. Res.* 67 (Supl.2): S281-S292, 2018.
60. N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 62 (2010) 83-99.
61. Larson N, Ghandehari H. Polymeric Conjugates for Drug Delivery. *Chem. Mater.* 2012;24:840-53.
62. R. Duncan. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* volume2, pages347–360 (2003).
63. Y. Ikada, H. Tsuji, Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromol, Rapid Commun.* 132 (2000) 117-32.
64. H. Himali, D. Soumi, M. Bishnupada, K. Lal Mohan, Development of a photoresponsive chitosan conjugated produrg nano-carrier for controlled delivery of antitumor drug 5-fluorouracil. *International Journal of Biological Macromolecules* 121 (2019) 1070-1076.
65. Marasini Nirmal, Haque Shadabul, Kaminskas Lisa M., Polymer-drug conjugates as inhalable drug delivery systems: A review, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2017), doi:10.1016/j.cocis.2017.06.003
66. F. Mi, Y. Tan, H. Liang, H. Sung, In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, *Biomaterials* 23 (2002) 181–191.
67. E. Lee, J. Lee, I.H. Lee, M. Yu, H. Kim, S.Y. Chae, S. Jon, Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6442–6449.
68. H. Yin, Y. Du, J. Zhang, Lowmolecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities, *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (2009) 1546–1559.
69. Biagini, G.; Muzzarelli, R.A.A.; Giardino, R.; Castaldini, C. Biological materials for wound healing. In *Advances in Chitin and Chitosan*; Brine, C.J., Sandford, P.A., Zikakis, J.P., Eds.; Elsevier Science: Barking, UK, 1992; Volume 11, pp. 16–24.
70. Liu, X.F.; Guan, Y.L.; Yang, D.Z.; Li, Z.; de Yao, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 79, 1324–1335.

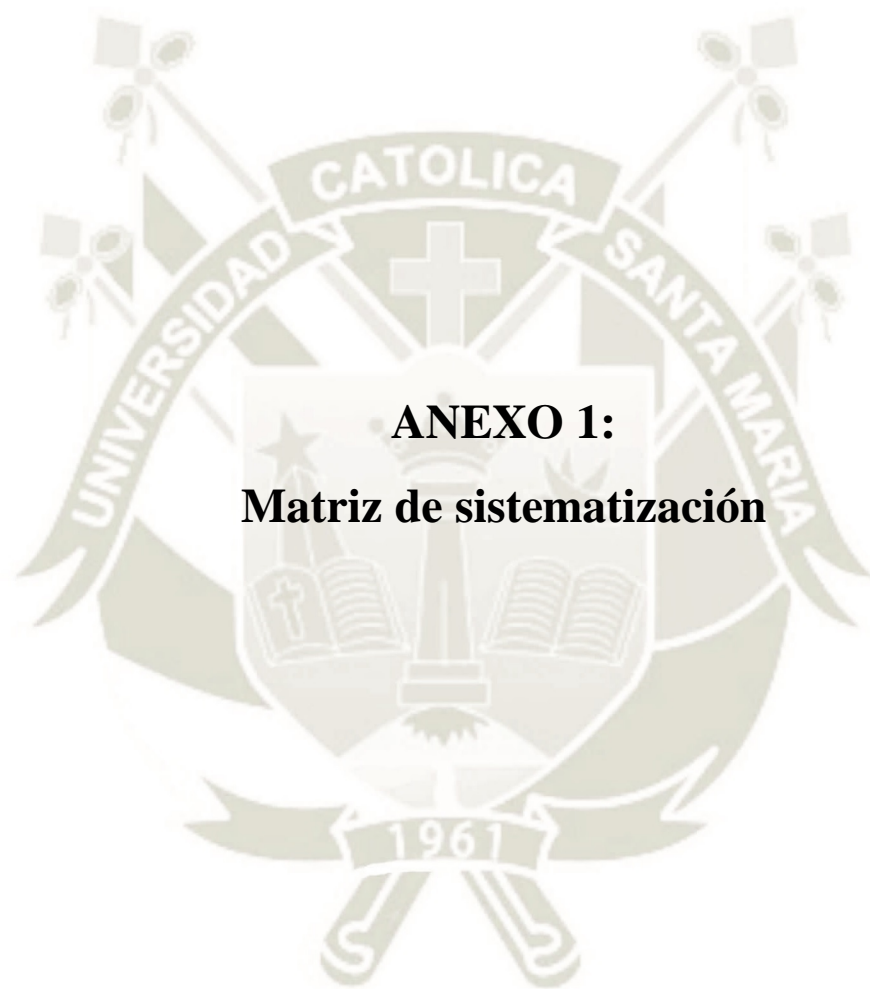
71. Patel J., Miller L., Cockerill F., Nicolau D., Bradford P., Powell M., Eliopoulos G., Swenson J., Hindler J., Traczewski M., Jenkins S., Turnidge J., Lewis J., Weinstein M., Limbago B., Zimmer B. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition Volume 35 Number 2, 2015.
72. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP NF 2013. 12601 Twinbrook arkway, Rickville, MD 20852, Estados Unidos de América
73. Bonnet R, Bru Jp, Caron F, Cattoen C, Cattoir V, Courvalin P, Dubreuil L, Jarlier V, Lefort A, Merens A, Plesiat P, Ploy M, Soussy C, Varon E, Weber P. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2019 V.1.0 Janvier. CA-SFM / EUCAST 2019.
74. Kaïli A. Development and characterization of enrofloxacin-loaded nanoemulsions in mucoadhesive gel. To get the degree in Master International LipTherapI, UFR des Sciences de Santé de Dijon - Université de Bourgogne. 2018, France.
75. Lihua Ma, Baosheng Liu, Chundan Wang, Hongcai Zhang, Xu Cheng. The Investigation of Fluorescence Spectra and Fluorescence Quantum Yield of Enrofloxacin. Journal of Chemical, Environmental and Biological Engineering. Vol. 2, No. 1, 2018, pp. 11-16. doi: 10.11648/j.jcebe.20180201.13.
76. Thermo Scientific. Easy molecular bonding crosslinking technology. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>.
77. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR Scientific Basis for the Definition of the Term “Nanomaterial”. 6, July 2010. European Commission. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_030.pdf
78. Varma, J. N., Kumar, T. S., Prasanthi, B., & Ratna, J. V. Formulation and Characterization of Pyrazinamide Polymeric Nanoparticles for Pulmonary Tuberculosis: Efficiency for Alveolar Macrophage Targeting. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2015.77(3), 258–266.
79. Kirby BJ. Micro and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluid Devices. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University. Press; 2010 ISBN 978-0-521-11903-0.
80. Boer M., Buddle B., Heuer C., Hussein H., Zheng T., LeBlanc S.J., McDougall S. Associations between intrauterine bacterial infection, reproductive tract

- inflammation, and reproductive performance in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 83 (2015), pp.1514-1524
81. Aldred K., Kerns R., Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 2014, 53, 1565-1574.
 82. Boer M, Heuer C., Hussein H., and McDougall S. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* of bovine uterine origin. *American Dairy Science Association*. 2015. *J. Dairy Sci.* 98:4427–4438. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8890>.
 83. Sheldon, I. M, M. Bushnell, J. Montgomery, and A. Rycroft. 2004. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet. Rec.* 155:383–387.
 84. Peterson M., Hovde L., Wright D., Hoang A., Raddatz J., Boysen P. Y Rotschafer J. Fluoroquinolone Resistance in *Bacteroides fragilis* following Sparfloxacin Exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept. 1999, p. 2251–2255. Vol. 43, no. 9
 85. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. CLSI document VET01–A4. 5th ed. CLSI, Wayne, PA. <https://clsi.org/standards/products/veterinary-medicine/>
 86. Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) 2019. <http://www.eucast.org/>
 87. Silley P., Stephan B., Heinrich A. Pridmore G. y Pridmore A. Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007) 60, 999–1003. doi:10.1093/jac/dkm346
 88. Nagaraja T., Narayanan S., Stewart G. and Chengappa M. *Fusobacterium necrophorum* infections: Virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. January 1996. *Veterinary Research Communications* 20(2):113-40. DOI: 10.1007/BF00385634.
 89. Nagaraja T., Narayanan G., Syewart M., Chengappa M. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Veterinary anaerobes and diseases*. *Anaerobe* 11 (2005) 239-246

90. Larson, N., & Ghandehari, H. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of materials: a publication of the American Chemical Society* (2012), 24(5), 840–853. doi:10.1021/cm2031569.
91. Lamele L. Vecchia L. and Claudia Scotti. Antibody-drug conjugates: targeted weapons against cancer. *Antibody Technology Journal*. 9 January 2015. DOI:10.2147/ANTLS52914
92. Trouchon T., Lefebvre S. a Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 6, 40-58. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>.







ANEXO 1:
Matriz de sistematización

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

by Intensity



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 1
SOP Name: Claudia plga.sop
General Notes:

File Name: Raphaël.dts **Dispersant Name:** Water
Record Number: 2592 **Dispersant RI:** 1,330
Material RI: 1,59 **Viscosity (cP):** 0,8872
Material Absorbtion: 0,010 **Measurement Date and Time:** vendredi 12 avril 2019 09:4...

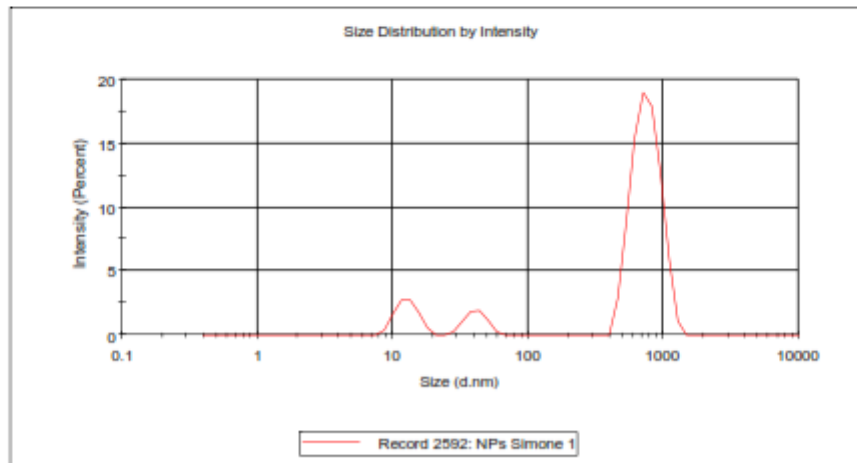
System

Temperature (°C): 25,0 **Duration Used (s):** 180
Count Rate (kcps): 38,6 **Measurement Position (mm):** 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette **Attenuator:** 11

Results

| | Size (d.n... | % Intensity: | St Dev (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 578,6 | Peak 1: 762,4 | 83,7 | 178,4 |
| Pdl: 0,846 | Peak 2: 12,92 | 9,8 | 2,352 |
| Intercept: 0,964 | Peak 3: 41,47 | 6,5 | 7,261 |

Result quality Refer to quality report



PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

by Intensity



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 2
SOP Name: Claudia plga.sop
General Notes:

| | |
|-----------------------------------|--|
| File Name: Raphaël.dts | Dispersant Name: Water |
| Record Number: 2593 | Dispersant RI: 1,330 |
| Material RI: 1,59 | Viscosity (cP): 0,8872 |
| Material Absorbtion: 0,010 | Measurement Date and Time: vendredi 12 avril 2019 09:5... |

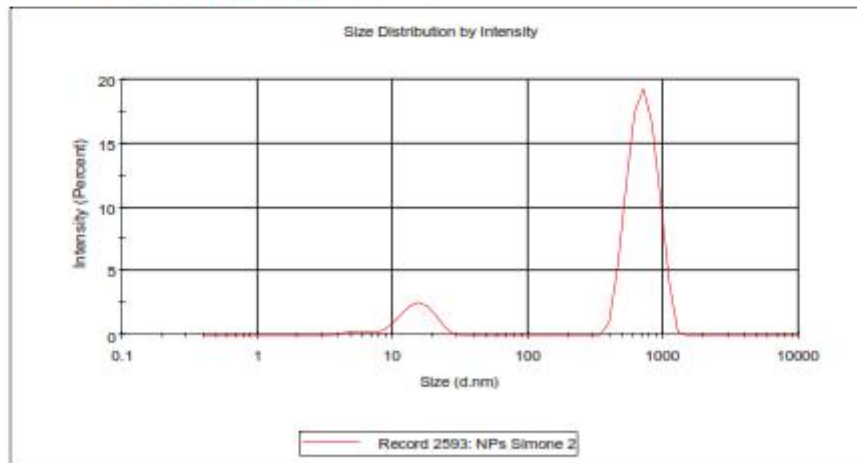
System

| | |
|--|--|
| Temperature (°C): 25,0 | Duration Used (s): 180 |
| Count Rate (kcps): 35,2 | Measurement Position (mm): 4,65 |
| Cell Description: Disposable sizing cuvette | Attenuator: 11 |

Results

| | Size (d.n... | % Intensity: | St Dev (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 447,5 | Peak 1: 719,7 | 86,4 | 171,6 |
| Pdl: 0,867 | Peak 2: 15,61 | 12,5 | 4,178 |
| Intercept: 0,955 | Peak 3: 5,805 | 1,1 | 1,066 |

Result quality Refer to quality report



PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

by Intensity



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 3
SOP Name: Claudia plga.sop
General Notes:

File Name: Raphaël.dts **Dispersant Name:** Water
Record Number: 2594 **Dispersant RI:** 1,330
Material RI: 1,59 **Viscosity (cP):** 0,8872
Material Absorbtion: 0,010 **Measurement Date and Time:** vendredi 12 avril 2019 09:5...

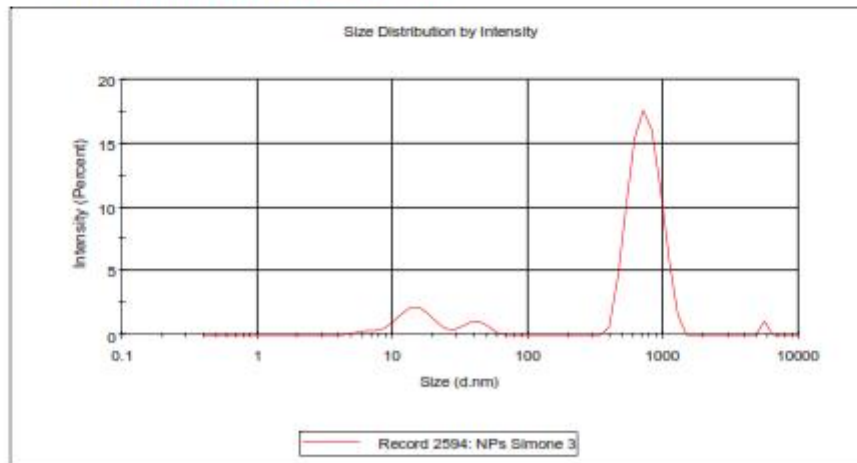
System

Temperature (°C): 25,0 **Duration Used (s):** 180
Count Rate (kcps): 35,8 **Measurement Position (mm):** 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette **Attenuator:** 11

Results

| | Size (d.n... | % Intensity: | St Dev (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 452,1 | Peak 1: 749,0 | 82,8 | 190,4 |
| Pdl: 0,857 | Peak 2: 14,87 | 12,1 | 5,055 |
| Intercept: 0,937 | Peak 3: 40,80 | 4,0 | 7,942 |

Result quality Refer to quality report



 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 1

SOP Name: Paul PLGA Zeta.sop

General Notes:

| | |
|---|-------------------------------|
| File Name: Raphaël.dts | Dispersant Name: Water |
| Record Number: 2595 | Dispersant RI: 1,330 |
| Date and Time: vendredi 12 avril 2019 10:45:49 | Viscosity (cP): 0,8872 |
| Dispersant Dielectric Constant: 78,5 | |

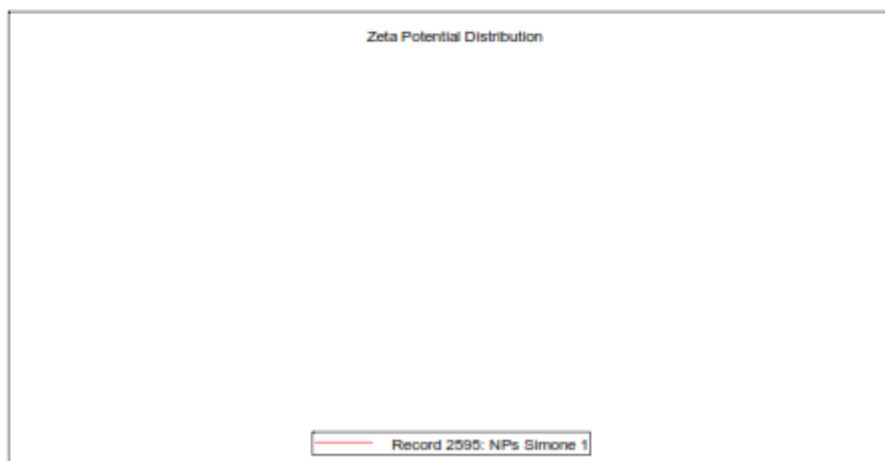
System

| | |
|---|--|
| Temperature (°C): 25,0 | Zeta Runs: 27 |
| Count Rate (kcps): 616,3 | Measurement Position (mm): 2,00 |
| Cell Description: Clear disposable zeta cell | Attenuator: 11 |

Results

| | Mean (mV) | Area (%) | St Dev (mV) |
|-----------------------------------|---------------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): 24,6 | Peak 1: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Zeta Deviation (mV): 0,00 | Peak 2: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Conductivity (mS/cm): 43,9 | Peak 3: 0,00 | 0,0 | 0,00 |

Result quality **Good**



 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 2

SOP Name: Paul PLGA Zeta.sop

General Notes:

| | |
|---|-------------------------------|
| File Name: Raphaël.dts | Dispersant Name: Water |
| Record Number: 2596 | Dispersant RI: 1,330 |
| Date and Time: vendredi 12 avril 2019 10:47:49 | Viscosity (cP): 0,8872 |
| Dispersant Dielectric Constant: 78,5 | |

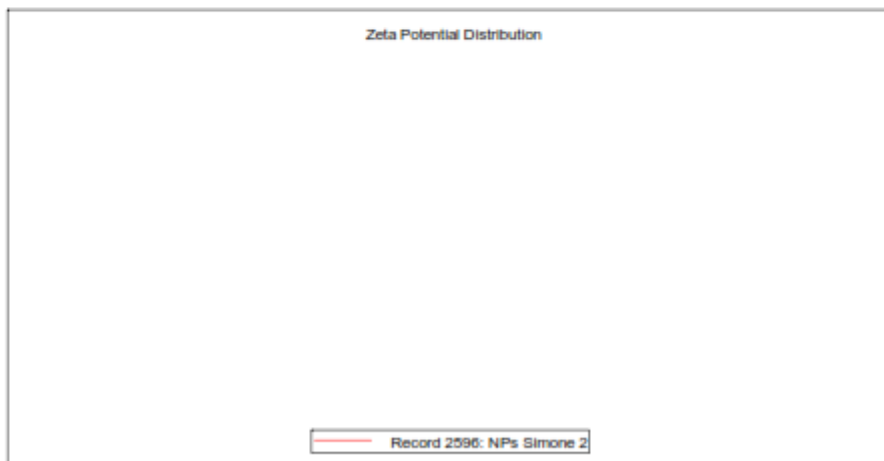
System

| | |
|---|--|
| Temperature (°C): 25,0 | Zeta Runs: 17 |
| Count Rate (kcps): 374,4 | Measurement Position (mm): 2,00 |
| Cell Description: Clear disposable zeta cell | Attenuator: 11 |

Results

| | Mean (mV) | Area (%) | St Dev (mV) |
|-----------------------------------|---------------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): 33,1 | Peak 1: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Zeta Deviation (mV): 0,00 | Peak 2: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Conductivity (mS/cm): 44,9 | Peak 3: 0,00 | 0,0 | 0,00 |

Result quality **Good**



 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Sample Details

Sample Name: NPs Simone 3

SOP Name: Paul PLGA Zeta.sop

General Notes:

| | |
|---|-------------------------------|
| File Name: Raphaël.dts | Dispersant Name: Water |
| Record Number: 2597 | Dispersant RI: 1,330 |
| Date and Time: vendredi 12 avril 2019 10:48:36 | Viscosity (cP): 0,8872 |
| Dispersant Dielectric Constant: 78,5 | |

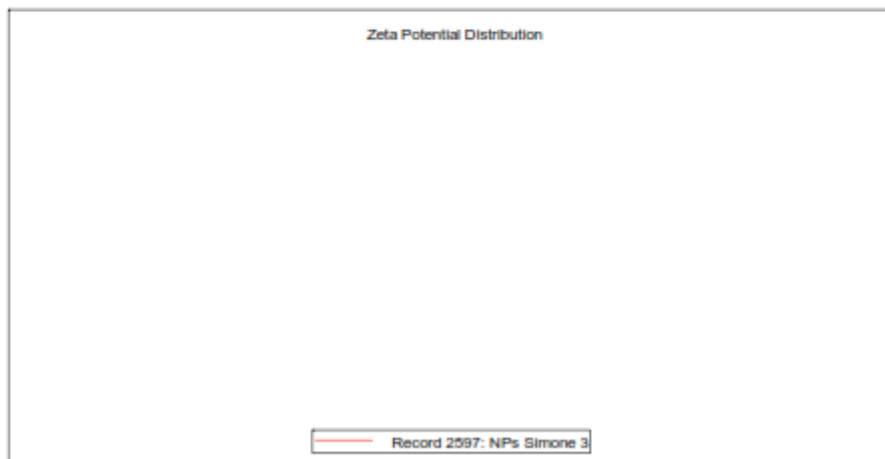
System

| | |
|---|--|
| Temperature (°C): 25,0 | Zeta Runs: 13 |
| Count Rate (kcps): 462,9 | Measurement Position (mm): 2,00 |
| Cell Description: Clear disposable zeta cell | Attenuator: 11 |

Results

| | Mean (mV) | Area (%) | St Dev (mV) |
|-----------------------------------|---------------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): 33,6 | Peak 1: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Zeta Deviation (mV): 0,00 | Peak 2: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Conductivity (mS/cm): 45,1 | Peak 3: 0,00 | 0,0 | 0,00 |

Result quality **Good**

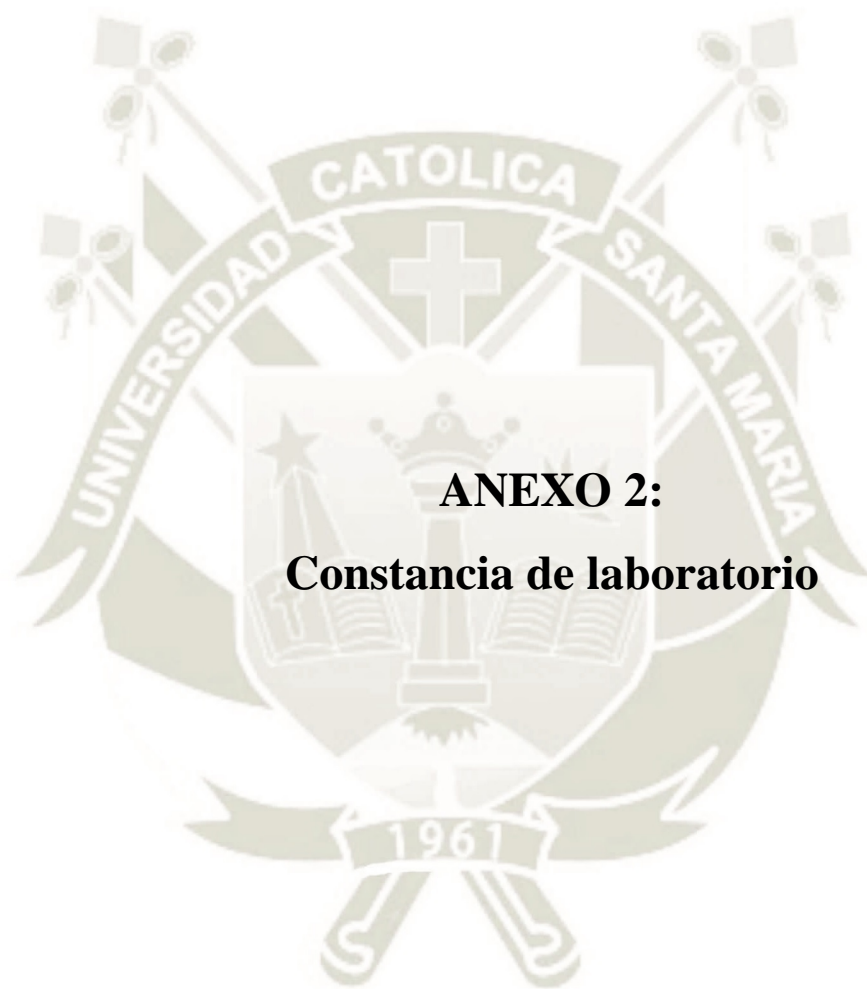


CUADRO CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

| Cepa bacteriana | Agente antimicrobiano | MIC |
|--|------------------------------|------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> CIP 103129 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 8 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Truperella pyogenes</i> 15081229 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 8 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Truperella pyogenes</i> 15081225 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 16 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 8 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500009287 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 16 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 32 |
| | Mezcla física | NA |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500095454 | Conjugado | NA |
| | Quitosano libre | NA |
| | Enrofloxacinó libre | 32 |
| | Mezcla física | NA |

**NÚMERO DE COLONIAS POR PLACA LUEGO DE UNA DILUCIÓN A 10^{-6} DE CADA
POSILLO**

| Cepa bacteriana | Agente antimicrobiano | Pocillo correspondiente | N° colonias obtenidas |
|--|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>Trueperella pyogenes</i> CIP 103129 | Conjugado | MIC | 0 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Qitosano libre | MIC | 0 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 23 |
| | | MIC+1 | 1 |
| | Mezcla física | MIC | 1 |
| | | MIC+1 | 10 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> 1500002541 | Conjugado | MIC | 0 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Qitosano libre | MIC | 2 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 5 |
| | | MIC+1 | 1 |
| | Mezcla física | MIC | 3 |
| | | MIC+1 | 2 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> 1500032358 | Conjugado | MIC | 22 |
| | | MIC+1 | 4 |
| | Qitosano libre | MIC | 52 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Enrofloxacino libre | MIC | 114 |
| | | MIC+1 | 0 |
| | Mezcla física | MIC | 86 |
| | | MIC+1 | 0 |



ANEXO 2:
Constancia de laboratorio

UNIVERSITÉ DE
FRANCHE-COMTÉ

EA4267
PEPITE

Arnaud BEDUNEAU
Associate Professor in Pharmaceutical Engineering
University of Franche-Comté
19 rue Ambroise Paré
25030 Besançon
FRANCE

Besançon, May 21, 2019

INTERNSHIP CERTIFICATE

TO WHOM IT MAY CONCERN

Ms Simone HERRERA BEJAR, Student at the Catholic University of Santa Maria in Arequipa, worked under my supervision during her Master internship in the Research Team EA4267, PEPITE of the University of Franche-Comté in France, from September 01, 2018 to February 28, 2019.

Her research project focused on the design and the evaluation of a new polymer-drug conjugate to treat endometritis in cow. The conjugate was synthesized by covalently linking enrofloxacin, a well-known veterinary antibiotic to a mucoadhesive biopolymer, the chitosan. During her internship, I was impressed by the abilities of Ms Simone HERRERA BEJA to adapt to a new environment and to new scientific fields including the chemistry and the pharmaceutical technology. She successfully led her project by demonstrating numerous skills such as the autonomy and the rigor. She also showed excellent human qualities and was perfectly integrated in our team. She shared her knowledge and skills in veterinary medicine with pharmacy students during a 1.5-hour lecture.

Signature

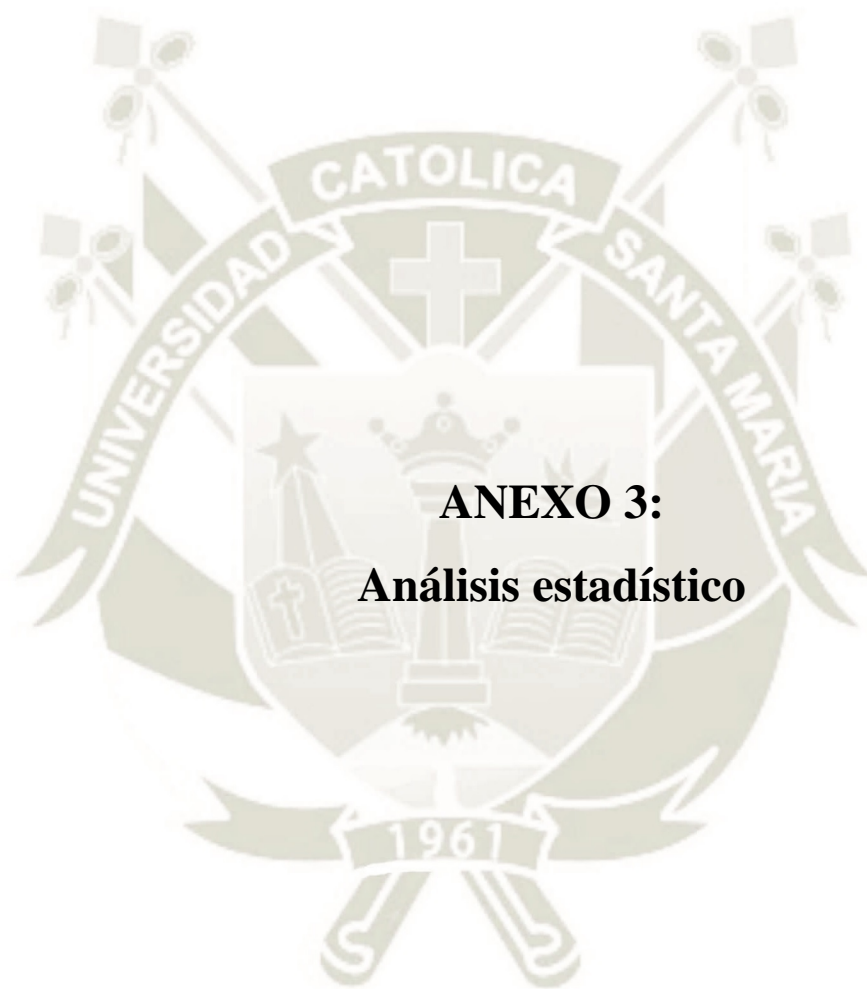


Université de Franche-Comté
Membre fondateur de UBFC

1 rue Claude Goudimel,
25 030 Besançon cedex

tél. 03 81 66 66 66
www.univ-fcomte.fr

1 / 1



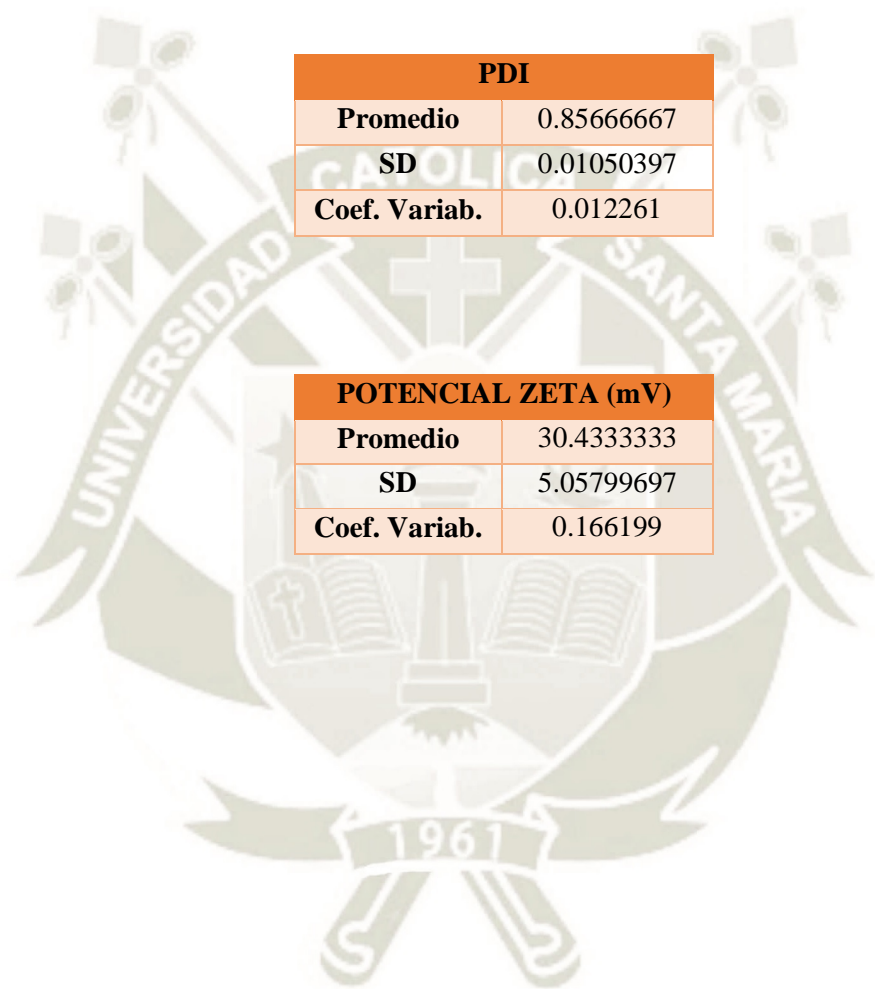
ANEXO 3:
Análisis estadístico

ANEXO 3: Análisis estadístico descriptivo para tamaño, PDI y potencial zeta.

| TAMAÑO (nm) | |
|----------------------|------------|
| Promedio | 492.733333 |
| SD | 74.3982751 |
| Coef. Variab. | 0.150991 |

| PDI | |
|----------------------|------------|
| Promedio | 0.85666667 |
| SD | 0.01050397 |
| Coef. Variab. | 0.012261 |

| POTENCIAL ZETA (mV) | |
|----------------------------|------------|
| Promedio | 30.4333333 |
| SD | 5.05799697 |
| Coef. Variab. | 0.166199 |





Reactivos para la formulación del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitosano- Enrofloxacino”



Figura N° 4. Enrofloxacino, quitosano y tampón

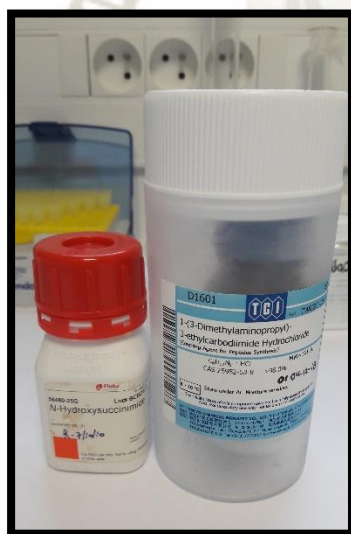


Figura N° 5. NHS y
EDC.

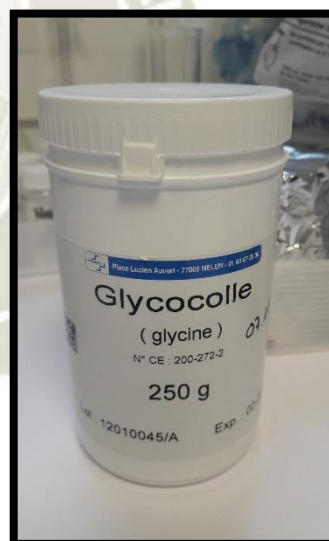


Figura N° 6. Glicina.

Secuencia fotográfica de la formulación del sistema conjugado polímero-fármaco
“Quitosano-Enrofloxacino”

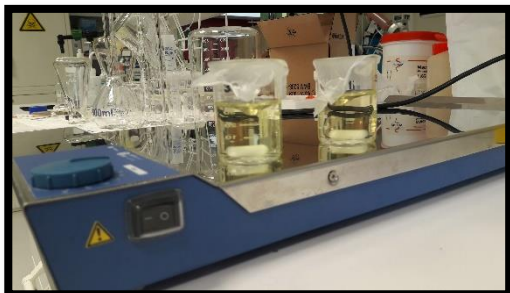


Figura N° 7. Solución quitosano (2.5 mg/mL en HCl 0.1N), enrofloxacino (0.5mg/mL) y tampón MES.

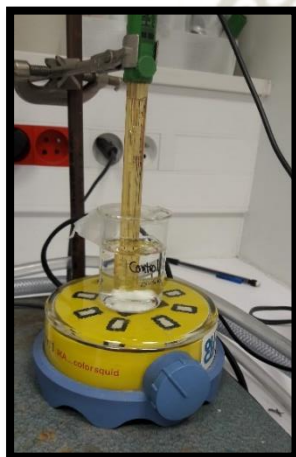


Figura N° 9.
Solución incrementada a pH 5.0 con NaOH 0.1N.

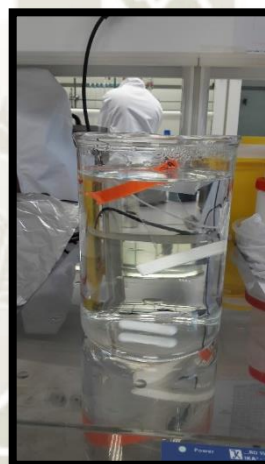


Figura N° 8.
Diálisis 12hrs.



Figura N° 10. Diálisis 48 hrs.



Figura N° 11. Materiales para filtrar y eliminar contaminantes del conjugado Quitosano-Enrofloxacino.

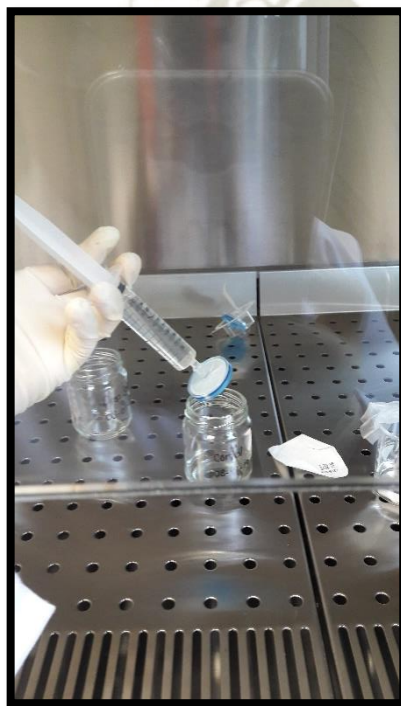


Figura N° 12. Proceso de filtrado de la formulación en membrana de acetato de celulosa de 0.20 μm

Secuencia fotográfica evaluación MIC de la formulación del sistema conjugado polímero-fármaco “Quitósano-Enrofloxacino”



Figura N° 13. Materiales en la cámara de flujo laminar.

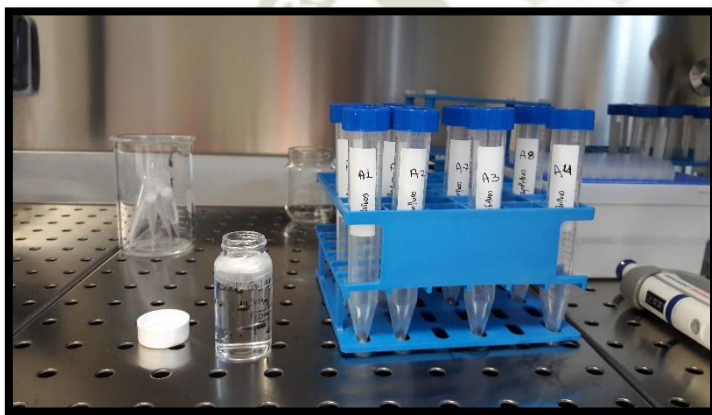


Figura N° 14. Identificación de las muestras en tubos falcon.

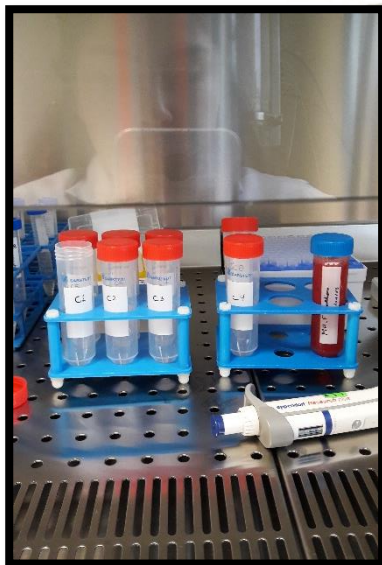


Figura N° 15. Mezcla del caldo MH con las muestras y controles en tubos falcon.



Figura N° 16. Inoculación de las placas de poliestereo de 96 pocillos.

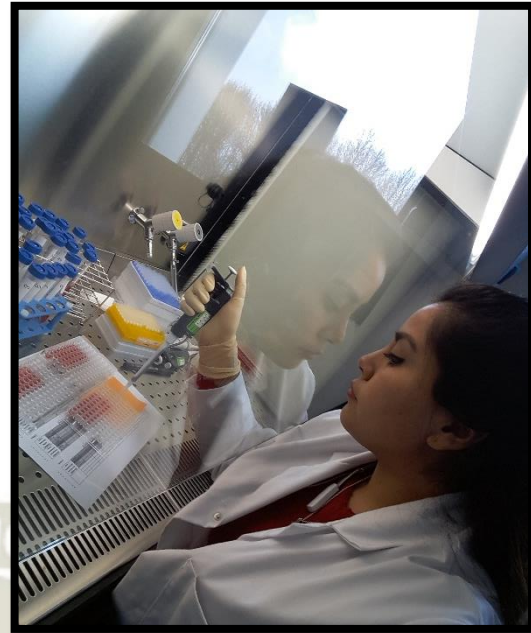


Figura N° 17. Inoculación de las placas de poliestereo de 96 pocillos.

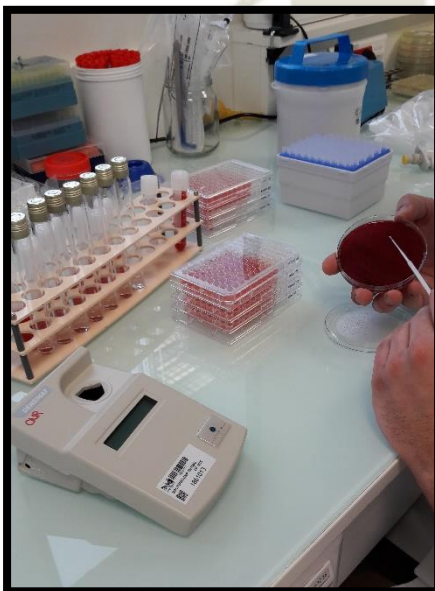


Figura N° 19. Preparación del inóculo bacteriano.

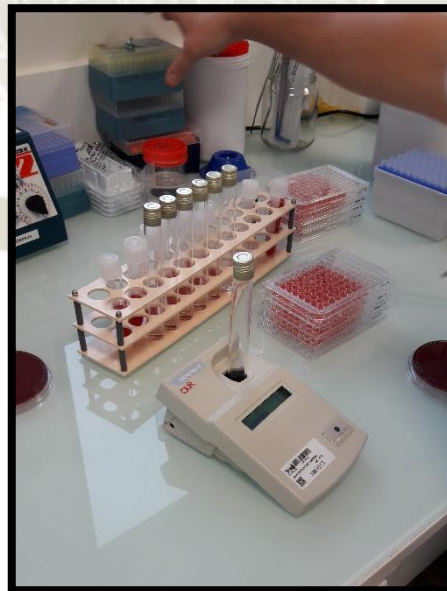
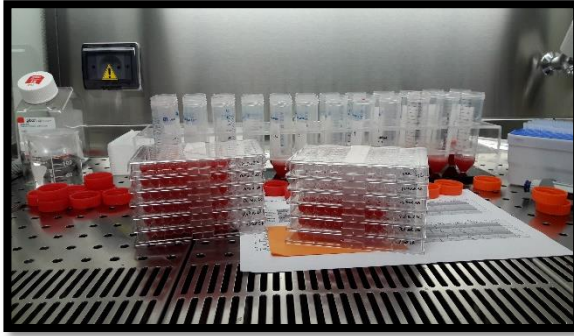


Figura N° 20. Preparación del inóculo bacteriano.



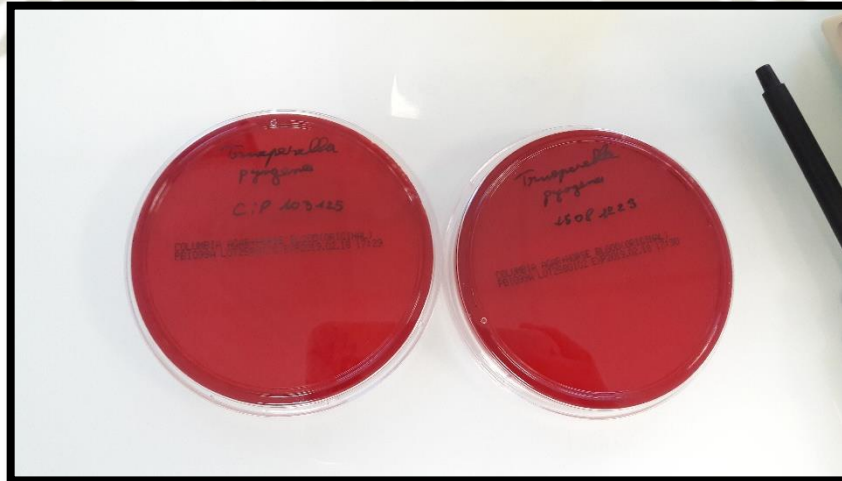
Figura N° 18. Preparación del inóculo bacteriano.



**Figura N° 21. Placas de poliestereo de
96 pocillos inoculadas.**



**Figura N° 22. Placas en la cámara de
cultivo anaeróbico a 35°C.**



**Figura N° 23. Cepas bacterianas
repicadas.**