



**UNIVERSIDAD DE TALCA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE UN HIDROGEL CON
PROPIEDADES *SLOW RELEASE* DE LINEZOLID CONTRA
*ENTEROCOCCUS FAECIUM***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO
EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: MARTÍN CORREA VERGARA
PROFESOR GUIA: Dr. ESTEBAN DURÁN LARA**

TALCA – CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	7
II. INTRODUCCIÓN	8
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. Hidrogeles	10
3.2. Síntesis y preparación de hidrogeles	11
3.3 Hidrogeles homopoliméricos	11
3.4 Hidrogeles copoliméricos	12
3.5 Hidrogeles semi-interpenetrados (semi-IPN)	12
3.6 Propiedades de los hidrogeles	13
3.7 Propiedades de hinchazón	14
3.8 Propiedades mecánicas	15
3.9 Propiedades de compatibilidad	17
3.9.1 Hidrogeles como sistemas de liberación controlada de drogas.	17
4. Linezolid como antimicrobiano	19
4.1 Mecanismo de acción	19
4.2 Uso terapéutico	21
5. Género <i>Enterococcus</i>	22
5.1 Infecciones asociadas a <i>Enterococcus</i> spp.	23
5.2 Evolución de la resistencia de <i>Enterococcus</i> spp	24
IV. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Síntesis de hidrogeles	26
5.2 Estudio de hinchazón	27

5.3 Estudio de infrarrojos de transformación de Fourier FT-IR	27
5.4 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)	27
5.5 Cinética de liberación de linezolid	27
5.6 Determinación de la actividad antibacteriana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 con linezolid frente a <i>Enterococcus faecium</i> mediante difusión en agar	27
5.7 Ensayo cuantitativo de actividad antimicrobiana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 mediante la liberación de linezolid	29
5.8 Medición liberación de linezolid por HPLC	29
5.9 Análisis estadístico	30
VI. RESULTADOS	31
6.1 Análisis síntesis de hidrogeles	31
6.2 Análisis estudio de hinchazón	31
6.3 Análisis FT-IR	32
6.4 Análisis microscopía electrónica de barrido (SEM)	33
6.5 Análisis determinación de la actividad antibacteriana de las formulaciones de con linezolid frente a <i>Enterococcus faecium</i> mediante difusión en agar.	35
6.6 Análisis cuantitativo de actividad antimicrobiana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 mediante la liberación de linezolid contra <i>Enterococcus faecium</i> .	36
6.7 Análisis medición liberación de linezolid por HPLC	37
VII. DISCUSIÓN	39
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	43

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Relación entre las propiedades de los hidrogeles y los parámetros estructurales que la condicionan.	14
Figura 2. Nivel de concentración en sangre en el tiempo a partir de una forma tradicional en relación a una liberación sostenida	18
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto de linezolid	20
Figura 4. Índice de hinchazón de los diversos hidrogeles preparados	32
Figura 5. Espectro típico de espectroscopía infrarroja del hidrogel de polivinilalcohol con agente entrecruzante ácido succínico.	33
Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido, mostrando el entramado polimérico de los tres tipos de hidrogeles liofilizados	35
Figura 7. Halos de inhibición obtenidos a partir del ensayo de difusión en agar, donde A) HPAG20, B) HPAS20, C) HPAD20 D) Control	35
Figura 8. Representación de la actividad antimicrobiana mediante la formulación de hidrogeles HPAG20, HPAS20 y HPAD20.	37
Figura 9. Perfil de liberación de linezolid desde las 3 formulaciones de hidrogeles de 600 mg con relación al tiempo.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Halos de inhibición de hidrogeles a los diferentes tiempos trabajados.	Pág. 36
----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------

I. RESUMEN

Los hidrogeles corresponden a redes formadas por polímeros tridimensionales y agentes entrecruzantes, capaces de absorber grandes cantidades de sustancias tales como agua y otros fluidos, no presentan degradación frente a dichas sustancias.

En la actualidad el uso de hidrogeles en la medicina se debe a que son sistemas de liberación sostenida de diversos fármacos y drogas, destacando su carácter biodegradable e inoocuos para el organismo. Los hidrogeles se pueden sintetizar de tal manera de que adquieran propiedades diversas propiedades tanto físicas como químicas. En el caso de los sistemas de liberación sostenida, pueden sintetizarse de tal forma que almacenen una sustancia a elección, la cual mediante diversos estímulos y/o condiciones como por ejemplo pH, temperatura, entre otros, estos son capaces de sistemas con propiedades *slow release*.

En el presente trabajo se desarrollaron hidrogeles basados en poli (vinil alcohol) (PVA) y tres ácidos orgánicos a elección glutárico, succínico y adípico como agentes entrecruzantes, que otorgan estabilidad y maleabilidad a los polímeros. A estas formulaciones se les encapsuló linezolid, antibiótico usado en tratamientos de infecciones principalmente en aquellas causadas por bacterias del género *Enterococcus* A dichos hidrogeles se les evaluó la capacidad de hinchazón que presentaron, liberación del fármaco mediante la técnica de difusión en agar Müller-Hinton suplementado con sangre y también la acción antibacteriana que presento frente a *Enterococcus faecium* ATCC® 19434, en las distintas formulaciones.

Las formulaciones basadas en PVA junto a los distintos ácidos mencionados fueron llevadas a cabo con éxito, donde se evaluó la compatibilidad entre los hidrogeles y el antibiótico, también las propiedades de encapsulamiento y liberación sostenida a lo largo del tiempo, por lo que estas formulaciones podrían ser consideradas a futuro como terapias en base a sistemas con propiedades *slow release* de fármacos para combatir infecciones bacteriano.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los tratamientos para combatir infecciones bacterianas requieren de diferentes clases de fármacos que se administran principalmente por vía oral o intravenosa. Esta administración presenta diversos inconvenientes relacionados con el poco control de los niveles necesarios del medicamento en principalmente a nivel sistémico, lo que hace en cierta medida ineficiente el tratamiento dado que las concentraciones del fármaco oscilan por bajo de la concentración mínima requerida del fármaco para realizar su efecto, requiriendo frecuentemente de nuevas dosis.

El estudio de la liberación sostenida de sustancias con fines terapéuticos en los pacientes se presenta como una alternativa de solución a la anterior situación y por tanto el desarrollo de estos métodos ha sido de gran interés en la medicina para el desarrollo de nuevos materiales, lo que ha su vez ha permitido conocer en profundidad gran mayor parte de los factores que influyen en estos sistemas de administración de drogas de una manera controlada y de esta manera hacer los tratamientos más efectivos y cómodos para el paciente.

Desde el punto de vista de los materiales, se han desarrollado diversas variedades como por ejemplo nanopartículas, micelas, dendrímeros, polímeros conjugados e hidrogeles. Estos últimos han mostrado muy buenas propiedades para ser cargados con medicamentos, por ser biocompatibles y presentar propiedades de hinchamiento en medio acuoso entre otras características de interés como la nula toxicidad que presentan, la gran cantidad de compatibilidad con sustancias que se quieren administrar, además como la posibilidad de adaptar dichas condiciones para funcionar en diversos ambientes como el pH estomacal, por vía endovenosa. Esto genera una opción para ser usados en la liberación sostenida de medicamentos.

Al administrar la droga mediante un hidrogel, se logra una liberación sostenida, manteniendo una dosis terapéutica constante, esto es una ventaja por sobre los sistemas convencionales en donde como se menciona necesitan de distintas dosis a través del tiempo para generar su acción y en muchas de estas ocasiones pueden generar efectos adversos e incluso tóxicos para el paciente.

El fármaco linezolid corresponde a un antibiótico sintético, pertenece al grupo de las 2-oxazolidonas, comúnmente es utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas complicadas causadas por Grampositivos. Este fármaco se encuentra aprobado desde el año 2001 por la administración de alimentos y medicamentos FDA (Food and Drug Administration en inglés) indicado para tratar infecciones de la piel y tejidos blandos, neumonía nosocomial o adquirida en la comunidad e infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina principalmente de tipo intrahospitalario. Por esta razón es posible lograr la liberación controlada de este fármaco a través del tiempo mediante la utilización de una formulación basada en hidrogel con características específicas logrando una alternativa a los tratamientos convencionales frente a infecciones de esta índole como también una reducción en el desarrollo de resistencias frente al fármaco dado el tipo de liberación antes descrito.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son sistemas tridimensionales poliméricos formados con monómeros de origen natural o sintético capaces de retener una gran cantidad de agua (1). En condiciones fisiológicas, son capaces de retener una gran cantidad de agua u otros fluidos biológicos y se caracterizan por presentar una elasticidad muy similar a los tejidos humanos (2), lo cual permite que estas sustancias sean ideales para múltiples aplicaciones en el área médica (3).

Pueden ser sintetizados a partir de una gran variedad de polímeros generalmente hidrosolubles con las que se generan diversas formulaciones físico y químicas con propiedades específicas (4).

En relación a los tipos de hidrogeles se pueden clasificar según dos grandes grupos en función de las uniones presentadas en la red polimérica que los conforman siendo estos físicos o químicos. También es posible categorizar estos biomateriales según los polímeros usados para su conformación los cuales pueden ser de origen natural y aquellos sintéticos.

Como ha sido mencionado existen polímeros naturales, como por ejemplo el colágeno, albúmina o quitosano. Polímeros sintéticos, entre los que se distinguen: o Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico y poliglicólico. o polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos y polivinil alcohol (PVA).

3.2 Síntesis y preparación de hidrogeles

Como fue mencionado es posible clasificar a estos biomateriales en dos tipos, hidrogeles de carácter físico y aquellos de carácter químico. La diferencia entre ambos grupos radica en el método de gelificación que estos tengan y con esto el tipo de estabilidad dependiendo de las interacciones que formen (5).

Los hidrogeles físicos, presentan una red tridimensional formada por uniones consideradas como no completamente estables a ciertos cambios físicos (pH, temperatura, etc.), por que presentan generalmente uniones que son del tipo van der Waals y puentes de hidrogeno, estos tipos de interacciones son mucho más débiles que las del covalentes, es por esto que se les conoce como biomateriales reversibles (6).

Por otra parte, los hidrogeles químicos, son aquellos en los que la red formada es a través de enlaces covalentes. Este tipo de enlace a diferencia de formados en los de origen físico, son muy fuertes y su ruptura lleva a la degradación del hidrogel (7). Es por esto que los hidrogeles químicos no son reversibles puesto que una vez rotos no es posible que se vuelvan a formar, este tipo de uniones dan lugar a un proceso conocido como gelación fuerte o permanente (8).

Según la composición que presenten los hidrogeles se pueden clasificar en: homopolímeros, copolímeros y semi-interpenetrados (semi-IPN).

3.3 Hidrogeles homopoliméricos

Los homopolímeros por definición corresponden a estructuras entrecruzadas formadas a partir de una sola especie de monómero (9), estos son principalmente empleados para el desarrollo de sistemas de almacenaje y liberación de sustancias como drogas.

Dentro de los polímeros más usados para la fabricación de hidrogeles se destaca el polivinil alcohol (PVA), formado principalmente de polímeros de carácter hidrofílico (10). En la actualidad se ha empleado en la biomedicina para el desarrollo de sistemas inteligentes para la liberación de diversos fármacos, esto fundamentalmente debido a su carácter biodegradable y biocompatible con el organismo (11).

3.4 Hidrogeles copoliméricos

Estos polímeros han sido utilizados para la liberación de diversas sustancias, incorporándolas de tal manera que cumplen un rol de almacenaje como también de transporte. Para llevar a cabo la incorporación de la molécula es necesario considerar ciertos factores como el tamaño de la molécula o sustancia y su vez la cantidad que se espera liberar. Estos sistemas se basan en una liberación controlada, la cual está determinada por el tamaño de poros encontrados en el hidrogel como también la interacción física y químicas entre el biomaterial con la sustancia a liberar, dado principalmente por enlaces covalentes, uniones electroestáticas e incluso asociaciones hidrófobas (12).

3.5 Hidrogeles semi-interpenetrados (semi-IPN)

Las redes poliméricas interpenetradas o IPNs por sus siglas en inglés (interpenetrating Polymer Networks) se definen como la combinación de dos redes poliméricas coexistentes químicamente diferentes, de las cuales al menos una de ellas es sintetizada y/o entrecruzada en presencia de otra sin ningún tipo de enlace covalente. Las IPNs se originan cuando dos polímeros que son incompatibles son capaces de unirse en condiciones en las que si son compatibles de manera que un polímero queda atrapado en la red de otro polímero (13). La combinación química y física de dos o más polímeros con estructuras diferentes proveen una alternativa conveniente para la modificación de propiedades acorde de las necesidades (14).

La formación de IPNs permite un método conveniente para mezclar como me menciono

dos polímeros químicamente incompatibles. Si al menos uno de los monómeros de la red interpenetrada es de carácter hidrofílico, ésta puede formar un hidrogel basado en polímeros capaces de absorber agua, la que además se caracterice por tener una red sensible a diversos estímulos, es reversible y puede o no hincharse en respuesta a condiciones externas como temperatura, pH, disolventes, luz, entre otros, por esto los hidrogeles semi-interpenetrados se han utilizado especialmente en la biomedicina y en la industria farmacéutica (15).

Para que llevar a cabo el proceso anteriormente descrito, se emplean una gran variedad agentes entrecuzantes entre los que se pueden mencionar ácidos tales como: adípico, succínico, aspártico, glutarico, entre otros, los cuales son compuestos multifuncionales en los que se destaca características como por ejemplo: poseer mínimo dos dobles enlaces polimerizables; al menos un doble enlace polimerizable y un grupo funcional reactivo con el monómero; al menos dos grupos funcionales reactivos con el monómero y metales polivalentes capaces de formar entrecruzamientos iónicos (16).

3.6 Propiedades de los hidrogeles

En la actualidad los hidrogeles son utilizados en múltiples disciplinas gracias a las diversas características bien conocidas (17), como ser hidrófilos dado a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos los como son: -OH, -COOH-, CONH-, entre otros, además de ser blandos, elásticos e insolubles en agua teniendo la capacidad de hincharse en presencia de ella, aumentando notablemente su volumen (18).

En la biomedicina dichos materiales son utilizados como vectores de una amplia variedad de drogas con fines terapéuticos, frente a esto es necesario que, para interactuar con los sistemas biológicos, tienen que cumplir una serie de propiedades fundamentales como biocompatibilidad, biodegradación, no presentar toxicidad y ser estables químicamente, entre otras (19). Por esta razón se deben evaluar de forma individual y grupal dichas propiedades para ser aplicados de forma segura en el ámbito médico.



Figura 1: Relación entre las propiedades de los hidrogeles y los parámetros estructurales que la condicionan (19).

3.7 Propiedades de hinchazón

La capacidad de expansión o hinchazón corresponde a una característica fundamental para la funcionalidad de los hidrogeles, esta se basa en la capacidad de absorción de agua, determinada por el estado de equilibrio de expansión o hinchazón que presentará el hidrogel, esto se explica por el balance que ocurre entre las fuerzas osmóticas en relación con el agua que entra en la estructura, y las fuerzas que ejercen a su vez las cadenas poliméricas en oposición a esa hinchazón (20).

El proceso de síntesis del hidrogel finalmente determina la capacidad de hinchamiento que este tendrá, dado que los espacios que se establezcan entre las redes poliméricas flexibles que se formen en dicho proceso determinará la cantidad de agua que el hidrogel pueda absorber (21). Esta flexibilidad a su vez se ha mostrado que es función de: el peso molecular,

el grado de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa, además de factores propios del método físico o químico de síntesis (22).

Cambios en la presión osmótica (dada por la diferencia de concentraciones iónicas entre el interior y el exterior del hidrogel) o cambios en el pH conllevan a un aumento de volumen, dado que variaciones en éste influyen en el estado de ionización de grupos funcionales en la estructura del hidrogel (21), contribuyendo así a la hinchazón del hidrogel.

La hinchazón sucede de forma cinética, cuando el hidrogel, en su estado inicial, se pone en contacto con un fluido termodinámicamente compatible. Las moléculas de solvente penetran en la red polimérica, generando una separación de fases dentro del hidrogel y una expansión de las redes, haciendo que entren más moléculas de solvente (22). Esta expansión del hidrogel se puede medir según cómo varía el peso del hidrogel a medida que se va hinchando, es decir, el grado de hinchazón (swelling degree o equilibrium swelling ratio en inglés), mediante la siguiente fórmula:

$$\%ESR = \frac{M_h - M_x}{M_x} \times 100$$

Donde %ESR es el grado de hinchazón, y M_h y M_x corresponden al peso del hidrogel en estado hinchado y seco, respectivamente (22).

3.8 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas son fundamentales en la biomedicina, por tanto, evaluar estas características es crucial para diversas aplicaciones de este tipo como reparación de tejidos en los que se puede mencionar: tendones, ligamentos, cicatrización de heridas superficiales y profundas, etc (23).

La evaluación de estas propiedades tiene como objetivo de mantener la estructura física durante el proceso de liberación de fármacos dentro de un determinado periodo de tiempo (24).

Los hidrogeles basados en formulaciones a partir de monómeros naturales no presentan estabilidad definida, ya que se ha evidenciado que pueden gatillar una respuesta inmunogénica (25) y por tanto efectos secundarios. Por el contrario, los hidrogeles basados en polímeros sintéticos tienen una estructura bien definida y permiten la manipulación de su cinética de degradación y liberación de drogas (26).

Se ha demostrado la relación entre el grado de entrecruzamiento del hidrogel y las propiedades mecánicas que este presentara. Es decir, el entrecruzamiento está dado por:

- Elasticidad, la cual se define como la capacidad del material para estirarse y luego volver a su forma original (27). A medida que los enlaces químicos del hidrogel aumentan, su estructura se torna más rígida, perdiendo su capacidad de estiramiento, en consecuencia, el hidrogel se vuelve menos viscoso, menos elástico, por tanto, presentara una estructura más frágil (28).
- Disminución de la viscosidad, es decir, la resistencia al flujo. Un aumento de los enlaces que unen a las cadenas poliméricas del hidrogel hace que estos pierdan su movilidad una sobre otra. (29).
- Insolubilidad del polímero, debido a que las cadenas poliméricas se encuentran unidas por enlaces covalentes. Así, los materiales entrelazados, como los hidrogeles, no se disuelven regularmente en solventes, pero pueden absorberlos (30).

3.9 Propiedades de compatibilidad

Cualquier material implantado en el organismo no debe provocar reacciones adversas que impidan obtener el efecto deseado (31); es decir, el material debe ser biocompatible (32). Por tanto, para evaluar un biomaterial compatible, es necesario tener en cuenta una serie de factores (33):

- Las unidades básicas deben ser tratables para modificar el diseño y así lograr necesidades específicas.
- Exhibir un grado controlado de degradación del material.
- No ser tóxico.
- Poseer propiedades que promuevan las interacciones célula-sustrato.
- Producir la mínima o nula respuesta inmune e inflamatoria.
- Fácil y reproducible la producción, la purificación y el procesamiento del material.
- Compatible químicamente con soluciones acuosas y condiciones fisiológicas.
- Facilitar el crecimiento del tejido.
- Permanecer estable en la localización implantada durante un periodo de tiempo largo como para permitir la reparación del tejido. Esto implica mínima respuesta inflamatoria y degradación relativamente lenta.

Se ha demostrado que los hidrogeles poseen un gran potencial como biomateriales, debido a su buena biocompatibilidad, cumpliendo con todas las características anteriormente descritas, permitiendo finalmente un importante grado de asemejan a los tejidos vivos por sobre otros biomateriales sintéticos.

3.9.1 Hidrogeles como sistemas de liberación controlada de drogas

La principal ventaja que entrega el uso de este tipo de sistemas frente a las formas de dosificación tradicionales consiste en la posibilidad de prolongar el efecto del fármaco sin aumentar la dosis. En una dosificación tradicional, tras la administración de una dosis de un determinado fármaco, la concentración sanguínea alcanza un máximo a partir del cual ésta disminuye hasta que el fármaco es eliminado completamente (34). Así, la única vía para prolongar el efecto del fármaco sería aumentar la dosis, o su frecuencia, con el riesgo de alcanzar concentraciones tóxicas. En cambio, los sistemas de liberación controlada permiten mantener niveles plasmáticos efectivos durante largos periodos de tiempo sin alcanzar niveles tóxicos (figura 2). Los hidrogeles han sido ampliamente estudiados y ensayados para este fin en las últimas décadas, con el resultado de que la dosificación controlada supone actualmente uno de los campos de aplicación de los polímeros de mayor relevancia desde el punto de vista médico-farmacéutico (35).



Figura 2. Tomado de Gallardo, A.2004 (36). Nivel de concentración en sangre en el tiempo a partir de una forma tradicional en relación a una liberación sostenida.

Según Gallardo. en la figura 2: el nivel de concentración de fármaco alcanzado por los tratamientos tradicionales. Este nivel alcanza valores altos inicialmente, para luego descender rápidamente acercándose a valores ineficaces. Para los tratamientos convencionales, los niveles variables del fármaco se intentan mejorar por la administración de dosis sucesivas para mantenerse más o menos cerca del nivel óptimo de eficacia. Sin embargo, un sistema que mantenga adecuadamente la liberación de medicamentos no requiere de dosis repetidas y puede mantenerse más acotado en los niveles efectivos del tratamiento.

4 Linezolid como antimicrobiano

Linezolid es un agente antibacteriano sintético y además el primer representante del grupo de antimicrobianos denominado oxazolinidonas (37). Es un antibiótico de amplio espectro que posee actividad frente a bacterias aeróbicas Grampositivos y microorganismos anaerobios (38). Presenta actividad bacteriostática contra enterococos y estafilococos, además ha presentado acción bactericida contra la mayoría de las cepas de estreptococos como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*.

Este antimicrobiano recibió la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en diversas patologías infecciosas (neumonía nosocomial y comunitaria, infecciones de piel y tejidos blandos, entre otras), las cuales son causadas por diversos microorganismos entre ellos el SAMR (39).

4.1 Mecanismo de acción de linezolid

Linezolid inhibe la síntesis proteica bloqueando el inicio de la traducción. Actúa uniéndose a la subunidad 50s, alterando la unión del tRNA y evita la formación del complejo

de iniciación 70s (40). Otros antibióticos ejercen su acción bloqueando la síntesis de proteínas y algunos como cloranfenicol, estreptograminas, macrólidos y lincomicina también lo hacen uniéndose a la subunidad 50s, pero linezolid actúa en una fase más precoz de la síntesis de proteínas bacterianas por lo que se ha denominado como un mecanismo único (41).

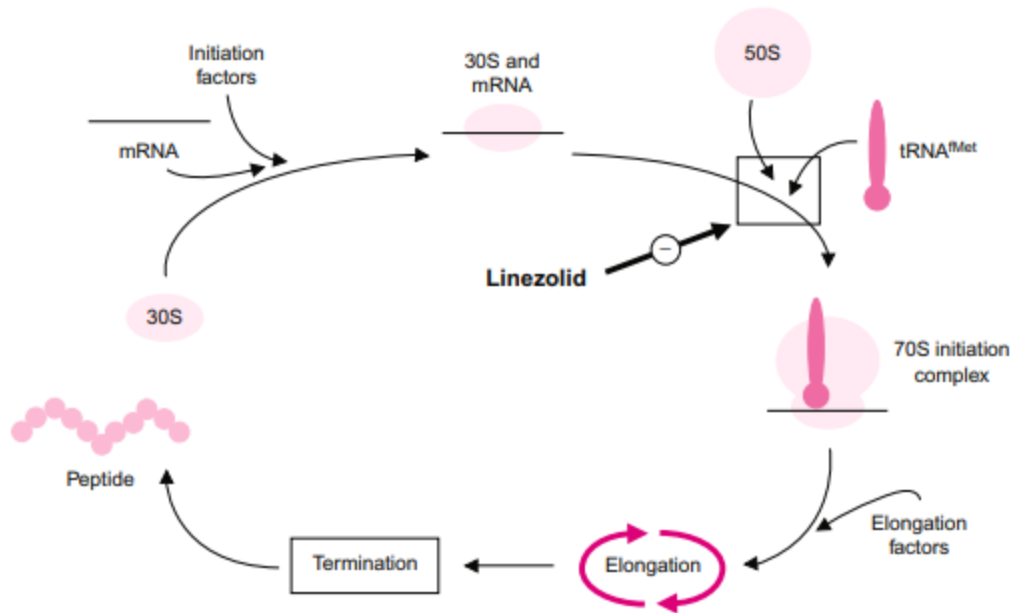


Figura 3 tomado de Clemett, D., y Markham, A. 2000. (42).

Clemett, D. y Markham, A. establecen en la figura 3: Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto de linezolid. Las oxazolidinonas parecen prevenir un paso temprano en síntesis de proteínas bacterianas mediante la prevención de la formación del complejo de iniciación tRNA^{fMet}-mRNA-70S o -30S. Los datos colectivos sugieren que la interacción ribosomal de las oxazolidinonas se reparte entre las 2 subunidades. La unión de oxazolidinona a la subunidad 50S distorsiona la unión sitio para tRNA^{fMet}, que inhibe la formación del complejo de iniciación ternaria y, por lo tanto, evitar el inicio de la traducción.

30S = 30S subunidad ribosomal; 50S = 50S subunidad ribosomal; 70S = 70S complejo ribosomal; ARNm = ARN mensajero; tRNA^{fMet} = ARN de transferencia del complejo N-formilmetionina.(40).

4.2 Uso terapéutico

El fármaco linezolid está indicado para el tratamiento de infecciones producidas por cepas susceptibles, es decir únicamente frente a bacterias Grampositivos por lo que no está indicado en el tratamiento de infecciones por Gramnegativos.

Las infecciones en las que se puede utilizar el linezolid son la neumonía nosocomial producida por *Staphylococcus aureus* (metilina-susceptibles y resistentes) o por *Streptococcus pneumoniae*, la neumonía adquirida en la comunidad producida por *Streptococcus pneumoniae* (43), incluyendo bacteremia por *Staphylococcus aureus*, infecciones complicadas de la piel tales como infecciones del pie diabético, causadas por *Streptococcus pyogenes*, e infecciones complicadas producidas por *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* siendo estas últimas las especies de mayor relevancia clínica (44) ya que se ha demostrado que presentan resistencias intrínsecas y/o adquiridas a diversos antibióticos clínicamente importantes (45).

5 Género *Enterococcus*

Los *Enterococcus* corresponden a un género de bacterias pertenecientes a la división Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia *Enterococcaceae*. Los miembros de este género fueron clasificados como grupo D *Streptococcus* porque presentaban en la pared celular un antígeno del grupo D que era un ácido teicoico con glicerol, esto fue hasta 1984 cuando los análisis de ADN genómicos indicaron que era más apropiado un grupo aparte (46).

Los *Enterococcus spp.* son cocáceas Gram positivos, las cuales pueden estar agrupadas en pares o cadenas cortas, son anaerobios facultativos, catalasa negativos, e hidrolizan el pirrolidoni-beta-naftilamida, es decir PYR positivo, la mayoría de los *Enterococcus spp.* logran crecer en NaCl al 6,5%, además hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares al 40% y además poseen el antígeno D de Lancefield (47). En algunos casos forman parte del microbiota intestinal del hombre y de animales, además son capaces de sobrevivir en medios pocos enriquecidos como lo son el agua, suelo y alimentos (48).

Estos pueden sobrevivir en ambientes hospitalarios, por lo que han aumentado los casos de infecciones nosocomiales surgiendo como un problema de la Salud Pública actual (49), además de que estos poseen resistencia intrínseca a variados antimicrobianos, ya que son capaces de adquirir mecanismos de resistencia a otras familias de antimicrobianos (50).

En los Servicios de Salud, como por ejemplo Hospitales, Clínicas, entre otras instituciones pueden sobrevivir por 24 horas en las manos de los portadores, fuentes y superficies inanimadas (51).

5.1 Infecciones asociadas a *Enterococcus spp.*

Los *Enterococcus spp* encontrados con mayor frecuencia en la clínica corresponden a *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, siendo el primero más asilado de muestras biológicas. En relación al tratamiento frente a estos agentes existe una resistencia que varía entre ambas especies, puesto que *E. faecium* presenta una mayor resistencia antimicrobiana en relación a *E. faecalis* (52).

Dentro de los cuadros clínicos generados por *Enterococcus* se han reportado infecciones endógenas lo que quiere decir, que son infecciones provocadas por microorganismos que forman parte del microbiota y que, frente a un proceso de inmunosupresión por parte del hospedador, han logrado generar un cuadro infeccioso debido al contagio desde superficies y/o utensilios contaminados, como de pacientes colonizados con estos microorganismos.

La infección enterocócica más frecuente es la infección urinaria, pero también se pueden mencionar endocarditis infecciosas, bacteriemias, además de que se puede aislar en infecciones de heridas operatorias pélvicas y abdominales (53), principalmente de casos de pacientes trasplantados, aunque un papel patógeno de los *Enterococcus spp.* no está clara, ya que son infecciones mixtas, además de causar infecciones intrahospitalarias asociadas a procedimientos quirúrgicos como la instalación de catéteres vasculares, urinarios, neuro quirúrgicos, entre otros (54).

Los principales factores de riesgo para inducir la colonización de *Enterococcus spp.* resistentes, son el uso de múltiples antimicrobianos de amplio espectro, además del uso de vancomicina, cefalosporinas de segunda o tercera generación, metronidazol y clindamicina, entre otros.

5.2 Evolución de la resistencia de *Enterococcus spp*

La resistencia a los antibióticos ha evolucionado a través de los años desde el año 1970 en donde se identificó la resistencia de alto grado a los aminoglicósidos, luego de transcurridos doce años, es decir, en el año 1982, se encontró que estos microorganismos tenían resistencia a la ampicilina, al año siguiente se identificó la producción de beta-lactamasa. En el año 1987 se reporta el primer brote de infección por *Enterococcus spp.* productores de beta-lactamasa, y durante los años 1986 hasta el año 1988 se reportó la resistencia a los glicopéptidos (55). en el año 1989 se informó una resistencia elevada a la penicilina y ampicilina. En el año 1999 en Chile se reportó el primer caso de un *Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina, obtenida a partir de una mujer de 63 años que padecía con el síndrome de Guillain-Barré.

En Chile existe la norma técnica N°175 sobre vigilancia nacional de resistencia a antimicrobianos en agentes que pueden producir infecciones asociadas al servicio de salud (IAAS). Exento N° 329, el cual indica que ciertas combinaciones de microorganismos y antimicrobianos cuya sensibilidad siempre debe ser informada, como lo es el caso de *E.faecium* y *E. faecalis*, para ampicilina, vancomicina, teicoplanina y linezolid (56).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ❖ Desarrollar formulación de un hidrogel con propiedades de *slow release* de linezolid frente a *Enterococcus faecium*.

4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar formulaciones del hidrogel basado en poli (vinil alcohol) y moléculas entrecruzante específicas.
- Evaluar la capacidad de *slow release* de linezolid a partir de las formulaciones preparadas.
- Evaluar la actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecium* de las formulaciones preparadas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3 Síntesis de hidrogeles

La síntesis de los hidrogeles se realizó a través de una reacción de esterificación, el cual es un proceso que se basa en la formación de un éster, siendo este un compuesto derivado de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. En este caso se utilizó polivinilalcohol (PVA) en conjunto con los tres ácidos orgánicos anteriormente descritos (GLU, SUC y ADI), y HCl como catalizador de la reacción.

La reacción se preparó en balones de 50 mL donde se agregó 1g de polivinilalcohol (PVA) junto los tres ácidos usados como *crosslinkers*, todos a una concentración 20% p/p, esto se realizó en 12 mL de agua destilada y adicionalmente se agregaron 80 μ L de HCl a cada formulación dejándose en reflujo con agitación constante por 3 horas.

Posteriormente la reacción se sometió a 70 °C durante 5 horas hasta obtener una reticulación completa requerida, se homogenizó cada preparación y luego se dispensaron las distintas formulaciones en placas en conjunto al antibiótico linezolid de tal manera que se obtuvieron 3 formulaciones distintas de hidrogeles que en su interior contenían el fármaco en estudio.

5.4 Estudio de hinchazón

Los hidrogeles secos (0,4 – 0,5 mm de grosor, 30 mg aprox. de peso) fueron depositados en frascos con solución tampón acetato (pH 3), tampón fosfato salino (pH 7,4) a temperatura ambiente. La medición del índice de hinchazón se hizo sacando cada espécimen de su respectiva solución, secándolo con papel filtro para remover el exceso de líquido y pesándolo en una balanza analítica, a intervalos de tiempo determinados. Tras dicho pesaje, el hidrogel se devuelve al frasco con su respectiva solución, para luego repetir el proceso.

La medición del índice de hinchazón se realizó aplicando la formula descrita por Shalviri et al. (2010) (22)

$$\%ESR = \frac{M_h - M_x}{M_x} \times 100$$

5.5 Estudio de infrarrojos de transformada de Fourier (FT-IR)

Se determinaron los espectros infrarrojos de los hidrogeles de polivinilalcohol con ácido maleico en diferentes concentraciones al 10, 20 y 30% mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier utilizando un espectrómetro Nicolet Nexus 470 dentro de los intervalos espectrales de 4000-400 cm^{-1} . Donde todos los espectros se obtuvieron en pellets de KBr a partir de un promedio de 32 exploraciones con una resolución de 4 cm^{-1} .

5.6 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis microscópico electrónico de barrido fue realizado en el Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología de la Universidad de Concepción, en el cual las muestras de hidrogel fueron cortadas y cargadas en un trozo de cobre, siendo teñidas con ácido fosfotúngstico al 0,7% p/v, se lavó y secó a temperatura ambiente. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico de bajo voltaje (5kV) LVEM5 (Delong Instruments, s.r.o., Brno, República Checa).

5.7 Cinética de liberación de linezolid

Una vez obtenidas las diversas formulaciones de hidrogeles, se procedió a depositar cada ejemplar en frascos de vidrio en 10 ml agua ultra pura (Milli-Q®) y además se preparó un control de la misma manera que contenía igual cantidad de linezolid que los hidrogeles, a cada una de las preparaciones se les fue extrayendo 1 ml del sobrenadante de la solución y al mismo tiempo se iba completando con 1 ml de agua ultra pura (Milli-Q®), esto fue realizado a distintos tiempos en intervalos de 1 ,3 ,6 , 24 y 48 horas respectivamente, durante este periodo dichas preparaciones se encontraron en constante agitación a 120 rpm a temperatura ambiente.

5.6 Determinación de la actividad antibacteriana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 con linezolid frente a *Enterococcus faecium* mediante difusión en agar

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad por medio de la técnica de difusión en placa. Con ayuda de un espectrofotómetro se midió la turbidez del inóculo bacteriano, para esto se utilizó *Enterococcus faecium* ATCC® 19434 para preparar un estándar correspondiente al 0,5 de McFarland a una longitud de onda de 625 nm.

En una primera instancia se inocularon 50 μ l de la cepa en una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre con 8 cm de grosor, en donde para cada formulaci3n preparada se us3 una placa distinta. Cada placa fue sembrada en c3sper e inmediatamente se realizaron pocillos en los cuales fueron dispensadas las al3cuotas obtenidas en el ensayo de liberaci3n antes mencionado, una vez realizado esto las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 37 $^{\circ}$ C durante 24 horas. Luego de la incubaci3n se observ3 la presencia de los halos de inhibici3n correspondientes.

5.7 Ensayo cuantitativo de actividad antimicrobiana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 mediante la liberaci3n de linezolid

Se realiz3 la detecci3n de la actividad antibacteriana mediante fotometr3a utilizando caldo BHI. Para la realizaci3n de este procedimiento se ocup3 la cepa de *Enterococcus faecium* ATCC[®] 19434, la cual fue llevada previamente a una suspensi3n de 0,5 McFarland equivalente a 1.0×10^6 UFC mL⁻¹ siendo esta la soluci3n madre. Posteriormente se dispense de dicha soluci3n 2 mL por tubo en donde a cada uno de estos, se les a3adi3 150 μ L de linezolid correspondientes a las al3cuotas tomadas en los distintos tiempos en el ensayo de cin3tica de liberaci3n de linezolid anteriormente mencionado, siendo estos incubados durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. Luego de la incubaci3n se midi3 la absorbancia a cada una de las preparaciones.

5.8 Medici3n liberaci3n de linezolid por HPLC

Se colocaron 600 mg de las distintas formulaciones de hidrogel que conten3a 120 mg de linezolid, los cuales fueron inmersos en un vial con 5 ml de buffer pH 7,4 de donde se extrajo todo el sobrenadante de la preparaci3n a la primera hora, luego a las 3 horas, 6 horas y despu3 una al3cuota a las 24 ,48 y 72 horas siendo esta reemplazado por el mismo volumen del buffer 7,4 fresco en cada extracci3n.

Posteriormente se cuantificó los sobrenadantes por HPLC en donde se calculó el % de liberación acumulado. El contenido de linezolid de las alícuotas se midió por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) con ayuda de un equipo Perkin Elmer 200 Series (Waltham, MA, USA), con bomba cuaternaria y autosampler, acoplado a un detector de UV-luz visible, utilizándose un estándar de linezolid de 125 ppm. Se utilizó una columna a 30°C Kromasil 100-5-C18 de 4,6 x 250 mm (AkzoNobel, Bohus, Suecia) y PBS pH 7,4 como fase móvil de agua y acetonitrilo (80:20) a un flujo de 1 mL/min a una longitud de 254 nm.

5.9 Análisis estadístico

Los experimentos de hinchazón y liberación controlada se llevaron a cabo en tres réplicas distintas ($n = 3$) para minimizar el error. Los resultados están expresados como promedio (\pm) y desviación estándar.

VI. RESULTADOS

6.1. Síntesis de hidrogeles

La síntesis de hidrogeles bajo el protocolo ejecutado permitió la generación de polímeros con características deseables, debido a la estandarización de los procesos. Estos hidrogeles sintetizados con polivinilalcohol (PVA) y diferentes agentes entrecruzante ácido glutarico, succínico y adípico. Los tres ejemplares mantuvieron una correcta polimerización confirmada por estudios de hinchazón y SEM logrando además una estructura adecuada a temperatura ambiente para estudios posteriores.

6.2. Análisis estudio de hinchazón

El experimento se llevó a cabo para examinar el grado de hinchamiento de los hidrogeles HPAG20, HPAS20 y HPAD20 a distintos pH (3 y 7,4) a temperatura ambiente, además de evaluar si en algún punto de la hinchazón se producía la degradación del hidrogel.

La Figura 5 muestra el porcentaje de hinchazón de dicho hidrogel, el que se incrementa a lo largo del tiempo. La cinética de medición indica que la hinchazón primero es rápida y después se torna más lenta, alcanzando en todas las formulaciones un estado de equilibrio.

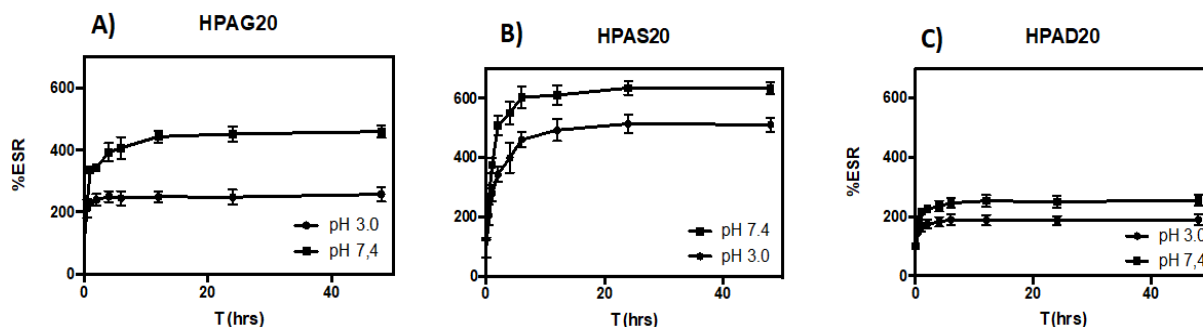


Figura 4. Índice de hinchazón de los diversos hidrogeles preparados A) HPAG20, B) HPAS20 y C) HPAD20 a 2 distintos pH (3 y 7,4) en relación al tiempo. Las barras indican desviación estándar.

El proceso de hinchazón, como se mencionó anteriormente, es dependiente de múltiples factores, como la naturaleza del polímero, el tamaño del poro, la concentración del crosslinker, pH y temperatura. En este sentido, en el pH 7,4 se logró la mayor hinchazón para todos los hidrogeles. En el caso de HPAS20 este, a las 10 horas alcanzó $400 \pm 4\%$ de su peso inicial, mientras que en pH 3 fue mucho menos su %ESR. Lo mismo ocurrió en el caso de HPAS20 y HPAD20, a las 10 horas lograron mayor porcentaje de hinchazón en pH 7,4. La formulación de HPAS20 en logro el mayor %ESR puesto que alcanza una hinchazón de hasta 600 ± 6 de su peso inicial.

6.3 Análisis FT-IR

La Figura 5 muestra el espectro de FT-IR con algunas señales características que demuestran la formación del hidrogel. Entre 3100 y 3700 cm^{-1} existe una fuerte señal de vibración que puede atribuirse al alcohol de la cadena de PVA y al grado de hidratación del hidrogel. A 2920 cm^{-1} , se observa una señal característica de los modos de estiramiento de los grupos alquilo (R-CH_2) de la cadena de PVA. El entrecruzamiento entre PVA y ácido succínico se puede observar en la señal a 1640 cm^{-1} , que corresponde a los enlaces éster covalentes formados entre el alcohol de las cadenas de PVA y el o los ácidos carboxílicos del ácido succínico.

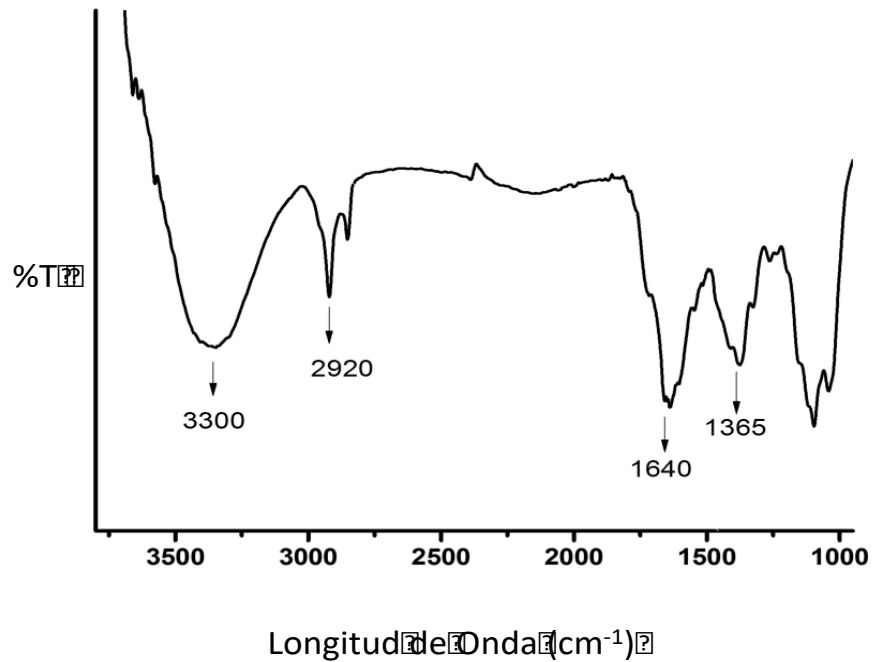


Figura 5. Espectro típico de espectroscopía infrarroja del hidrogel de polivinilalcohol con agente entrecruzante ácido succínico.

6.4 Análisis microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica se utilizaron para analizar a mayor profundidad la morfología de los hidrogeles preparados, HPAG20, HPAS20 y HPD20. Se pueden observar los poros, en donde se almacenaría el antibiótico linezolid. La figura 6 representa las micrografías obtenidas a partir de muestras de los hidrogeles, exhibiendo la estructura porosa definida y las fibras poliméricas atribuibles al proceso de entrecruzamiento. Para los tres casos el tamaño del poro correspondió aproximadamente a 10 esto, se relación a la concentración del entrecruzante. Se puede ver además la separación entre las distintas redes, cuya distención es crucial para llevar a cabo la difusión y posterior liberación de la droga.

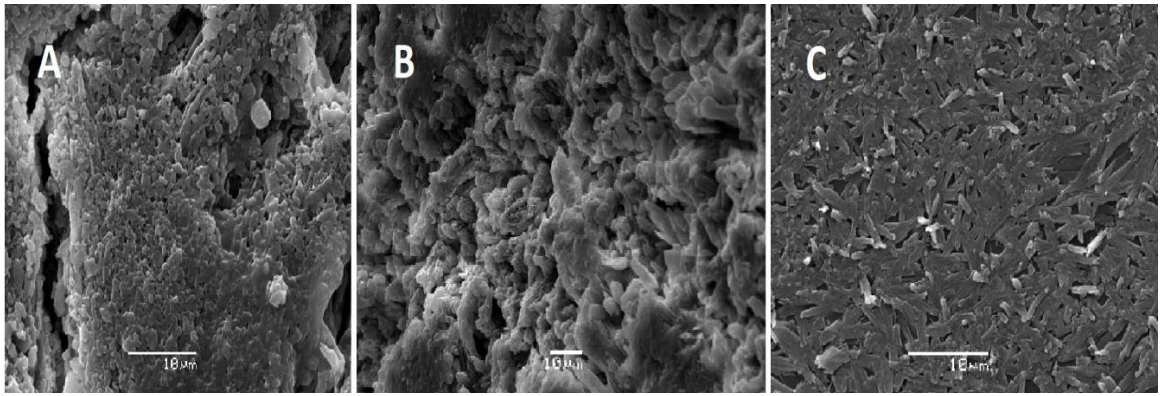


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido, mostrando el entramado polimérico de los tres tipos de hidrogeles liofilizado. Cada imagen con aumento 4300x. Barra = 50μm. (A) imagen correspondiente HPAG20 (B) HPAS20 (C) HPAD20 respectivamente.

6.5 Determinación de la actividad antibacteriana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 con linezolid frente a *Enterococcus faecium* mediante difusión en agar.

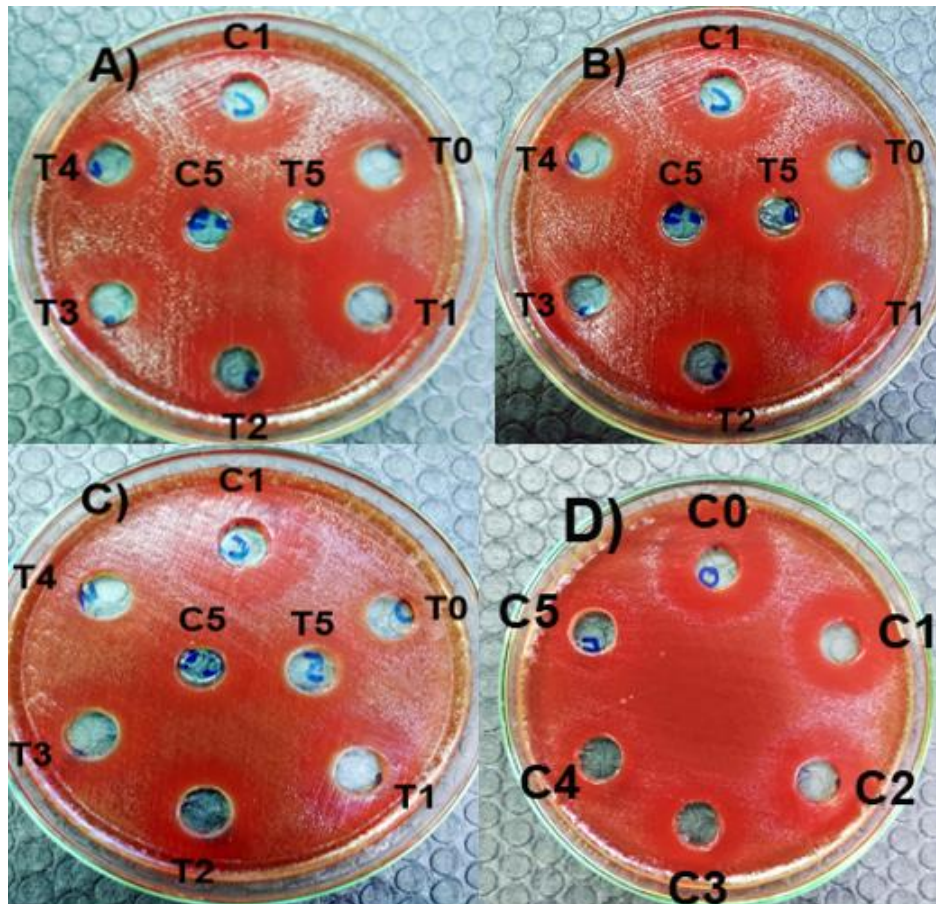


Figura 7. Halos inhibición obtenidos a partir del ensayo de difusión en agar, donde A) HPAG20, B) HPAS20, C) HPAD20 D) Control. T representa el tiempo para cada alícuota añadida siendo T0: tiempo inicial, T1: pasado 1 hora, T2: 3 horas, T3: 6 horas, T4: 24 horas y T5: 48 horas. En el caso D) se utilizó los mismos intervalos de tiempo, pero denotando C como el control en los tiempos mencionados.

HIDROGEL	HALOS 1 hora	HALOS 3 horas	HALOS 6 horas	HALOS 24 horas	Halos 48 horas
Control	30 mm	26 mm	20 mm	14 mm	9 mm
HPAG20	27 mm	26 mm	22 mm	20 mm	17 mm
HPAS20	25 mm	24 mm	21 mm	19 mm	18 mm
HPAD20	22 mm	21 mm	19 mm	17 mm	14 mm

Tabla 1: Halos de inhibición de hidrogeles a los diferentes tiempos trabajados.

6.6 Análisis cuantitativo de actividad antimicrobiana de las formulaciones de HPAG20, HPAS20 y HPAD20 mediante la liberación de linezolid contra *Enterococcus faecium*.

Con respecto al control, se puede observar la proliferación bacteriana aumento al paso de tiempo, esto dado principalmente a que la droga fue administrada en forma directa al medio de donde se sacaron las alícuotas correspondientes, esto se puede corroborar ya que a tiempo tempranos la carga bacteriana disminuye pero al transcurso de las horas se logra apreciar el aumento notorio en el crecimiento bacteriano por perdida de efecto antimicrobiano, no así en las formulaciones preparadas de hidrogeles que contenían linezolid, en este caso es posible observar que en tiempo iniciales la carga bacteriana se encuentra alta pero momento en que el hidrogel comienza a liberar el antibiótico esta disminuye para luego mantenerse constante, es aquí donde se evidenció la liberación sostenida de linezolid por parte de los hidrogeles a través del tiempo.

Liberación de linezolid

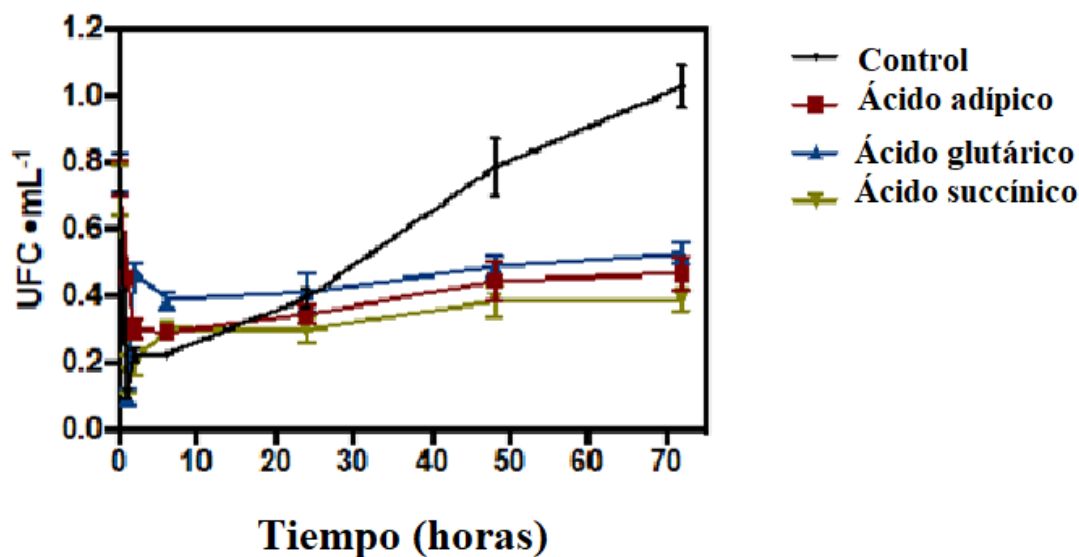


Figura 8. Representación de la actividad antimicrobiana mediante la formulación de hidrogeles HPAG20, HPAS20 y HPAD20, los cuales presentaron propiedades *slow release* de linezolid a través del tiempo.

6.7 Análisis medición liberación de linezolid por HPLC

La liberación de linezolid desde HPAG20, HPAS20 y HPAD20 se midió de forma acumulativa mediante HPLC. La Figura 10 muestra el perfil de liberación de linezolid desde dos hidrogeles de 600 mg, a lo largo de 72 horas. Para todos los modelos, dicha liberación en las primeras 6 horas evidencia un efecto ráfaga, es decir, al inicio se generó una liberación de una gran cantidad del fármaco y luego más lenta (liberación sostenida). Este efecto se puede evidenciar en todos los ejemplares, pero al cabo de cierto tiempo vuelven a liberar la droga de una forma más estable.

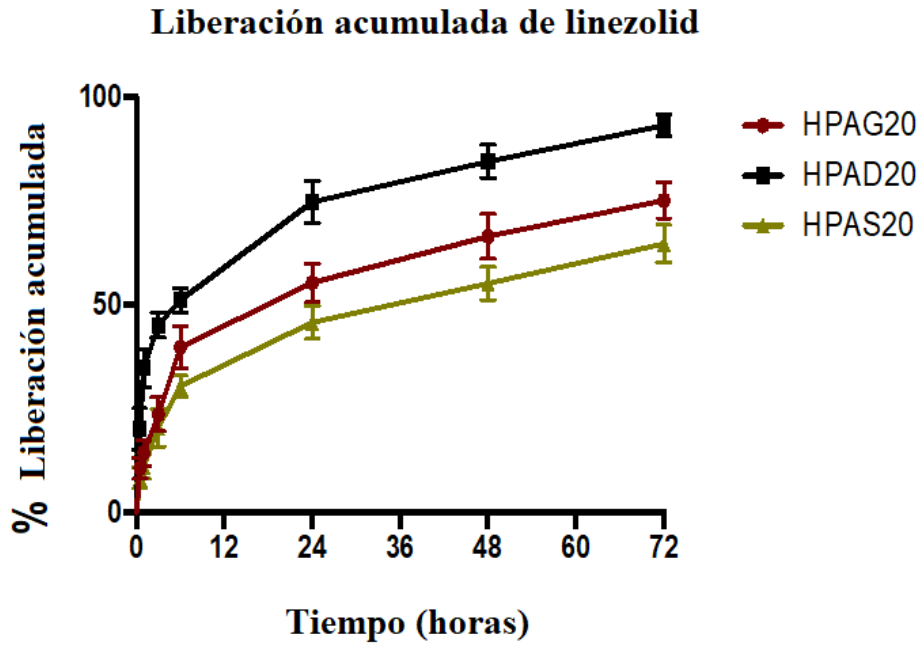


Figura 9. Perfil de liberación de linezolid desde las 3 formulaciones de hidrogeles de 600 mg con relación al tiempo. Las barras indican desviación estándar.

VII. DISCUSIÓN

Utilizando ácidos tales como glutárico, succínico y adípico como agentes entrecruzante es posible desarrollar formulaciones de hidrogel capaz de absorber y almacenar una solución e incrementar su tamaño sin romperse, y al mismo tiempo libera un fármaco de forma sostenida como fue el caso del antibiótico linezolid. El empleo del polivinilalcohol en la preparación de hidrogeles se menciona por sus cualidades de biocompatibilidad, no toxicidad, expansión y además presenta innumerables aplicaciones como biomaterial (57). Además, debido a su excelente propiedad de formación de matriz y carácter hidrofílico, el PVA se ha utilizado como componente de andamios de diversos fármacos para su posterior liberación sostenida en el tiempo (58).

Es de suma importancia evaluar el comportamiento del grado de hinchamiento del hidrogel en pH fisiológico (7,4) y pH del estómago (3,0) pensando en la vía de administración que tendrá este, siendo una alternativa compatible para tratar por ejemplo heridas cutáneas complejas. Es por esto que se realizaron experimentos con el objetivo de evaluar la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados con diferentes *crosslinkers*. La Figura 5 muestra el porcentaje de hinchazón de los hidrogeles, el que se incrementa a lo largo del tiempo. La cinética de medición indica que la hinchazón primero es rápida y después se torna más lenta, alcanzando en todas las formulaciones un estado de equilibrio. A su vez el grado de hinchamiento tiene una relación directa con la naturaleza estructural del polímero y sus propiedades, incluido el peso molecular promedio, la rigidez de la cadena del polímero, el grado de reticulación, el tamaño de la malla de la red y las condiciones externas, tales como temperatura y pH (59). Todas las formulaciones fueron capaces de hincharse de manera exitosa, en el caso del HPS20 fue capaz de hincharse hasta 600% su peso inicial, tal fenómeno es atribuido a que el ácido succínico contiene dos grupos carboxilos (-COOH) en su cadena lateral, cuyas constantes de disociación (pKa) corresponden a pKa1=4,20 y pKa2=5,64 (60), por lo que a pH 7,4 la mayoría de ellos se encuentra desprotonado (COO⁻). En los tres casos evaluados el grado de hinchamiento es mayor a pH 7.4 que 3.0 en estos hidrogeles; por lo tanto, la ionización ocurre cuando el pH del entorno está por encima del pKa del grupo ionizable (a pH 7.4). A medida que aumenta el grado de ionización aumentando el número de cargas fijas, lo que provoca un aumento de la repulsión

electrostática entre las cadenas en las redes permitiendo una mayor hinchazón que a su vez podría depender de la difusión la solución acuosa en los poros del hidrogel (61).

En relación al FT-IR, la figura 5 muestra el espectro de FT-IR con algunas señales características que demuestran la formación del hidrogel. Entre 3100 y 3700 cm^{-1} . existe una fuerte señal de vibración que puede atribuirse al alcohol de la cadena de PVA y al grado de hidratación del hidrogel. A 2920 cm^{-1} ., se observa una señal característica de los modos de estiramiento de los grupos alquilo (R-CH_2) de la cadena de PVA. El entrecruzamiento entre PVA y ácido succínico se puede observar en la señal a 1640 cm^{-1} ., que corresponde a los enlaces éster covalentes formados entre el alcohol de las cadenas de PVA y el o los ácidos carboxílicos del ácido succínico (62). La importancia de la señal 1640 cm^{-1} . es comprobar la formación del hidrogel y sus estructuras determinantes para la formación de la matriz porosa a través del proceso de entrecruzamiento.

Las imágenes correspondientes a la figura 6 muestran la reticulación interna de las formulaciones sintetizadas mencionadas. En ellas es posible apreciar la estructura porosa del hidrogel, el cual corresponde a la zona de almacenamiento para linezolid. También se observó en todos los casos la estructura rugosa de los ejemplares en donde el poro es un determinante para determinar la capacidad de absorción, y a su vez puede ser modificada de diferentes formas (63).

Las figuras 7 y 8 mostraron la actividad antimicrobiana a partir de la liberación sostenida y difusión en agar de linezolid mediante los hidrogeles, en la figura 7 es posible observar los halos de inhibición generados por las alícuotas añadidas correspondientes a los tiempos establecidos en la liberación de la droga, al analizar el control (D) se observó un marcado efecto antimicrobiano en las primeras horas proporcional al tamaño del halo, no obstante al paso del tiempo este disminuye considerablemente puesto que fue administrado de forma directa en solución a diferencia de las formulaciones A, B y C en donde fue posible observar que pasado una hora no se observó un halo como en el caso del control pero al transcurso de las horas se vio la presencia de halos de tamaños similares indicando una liberación

sostenida y a su vez una acción antimicrobiana sostenida. La figura 8 afirma lo indicado anteriormente, aquí se observó como en horas iniciales el control mantuvo bajas concentraciones bacterianas, sin embargo, al paso de la hora esto cambió evidenciando a las 24 horas como existió un aumento considerable en la concentración bacteriana, no así en la liberación de linezolid mediante hidrogeles, en donde se apreció el fenómeno inverso ya que en el tiempo cero existieron altas concentraciones de *E.faecium*, esto ocurrió porque para ese entonces era muy baja la cantidad de linezolid disponible en solución, pero al paso del tiempo se logró la liberación sostenida por parte de este en conjunto a una actividad antimicrobiana ya que finalmente linezolid tiene un amplio espectro de actividad contra microorganismos grampositivos, incluyendo estafilococos resistentes a la meticilina, neumococos resistentes a la penicilina y *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina y en este estudio frente a *E. faecium* (64).

El proceso de liberación sostenida de linezolid in vitro desde las formulaciones HPAG20, HPAS20 y HPAD20 se determinó con la concentración acumulativa de linezolid en función del tiempo, con hidrogeles de igual peso. El perfil de liberación se observa en la figura 9. Dentro de las primeras 6 horas aproximadamente de reacción se tiene una tendencia al fenómeno denominado “efecto ráfaga” o BR (burst effect por sus siglas en inglés) el cual corresponde a la liberación de una cantidad de la droga en un breve periodo de tiempo (65). Sin embargo se puede observar que no se presenta de forma marcada, esto se puede relacionar a que el antibiótico fue agregado al pre-hidrogel de forma directa y no mediante procesos adsorción por tanto la presencia linezolid en la superficie del hidrogel disminuye por lo que es posible reducir la frecuencia del efecto BR ,controlando el proceso de síntesis y encapsulación del complejo hidrogel-fármaco para una liberación sostenida (66). En este caso HPAS20 presento una liberación más lenta en relación con HPAG20 y HPAD20 atribuible al ácido empleado, ya que a diferencia de los otros dos estructuralmente presenta una cadena carbonada más larga, por lo se consideró determinante en el tamaño del poro resultante explicando porque le liberación resultante fue más lenta.

VIII. CONCLUSIONES

A partir la metodología empleada, fue posible sintetizar diversas formulaciones de hidrogel basado en PVA en conjunto a los ácidos glutarico, succínico y adípico como crooslinkers, los que además fueron desarrollados y evaluados. Se obtuvieron ejemplares que presentaron las características físicas y químicas deseadas y además presentaron compatibilidad con el antibiótico linezolid.

La capacidad de hinchazón fue evaluada para todas las preparaciones, en donde cada uno presento un %ESR relacionado a las características del agente entrecruzante como lo es la composición propiamente tal, lo que permitió incorporar grandes cantidades de soluciones y por tanto permitió el desarrollo de una actividad antimicrobiana mediante la liberación sostenida del fármaco contra *Enterococcus faecium*.

Los hidrogeles preparados fueron dependientes además a las condiciones del medio al cual se encontraron como también a estímulos de este, siendo el pH un factor determinante que dejo en evidencia la relación existente con la naturaleza hidrofílica de los ejemplares sintetizados, lo que en cierta medida afecta el proceso de almacenamiento de drogas.

La información obtenida a partir de los estudios de SEM y FT-IR permitieron observar la estructura microscópica de en detalle y a su vez la correcta polimerización entre el PVA y los ácidos ya mencionados, además de la estructura reticulada en conjunto a la porosidad presentada

Los ensayos microbiológicos en conjunto con la cuantificación mediante HPLC fueron determinantes para evidenciar la acción antimicrobiana de linezolid frente a *E.faecium* mediante la liberación sostenida por parte de los sistemas desarrollados en este estudio, sin embargo se requieren estudios posteriores para el desarrollo de nuevos protocolos terapéuticos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1.Ullah F, Bisyrul M, Javed F, Akil H. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering* 2015;57:414–33.
- 2.Soontornworajit B, Zhou J, Snipes MP, Battig MR, Wang Y. Affinity hydrogels for controlled protein release using nucleic acid aptamers and complementary oligonucleotides. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2011;32(28):6839–49.
- 3.Wang Z, Xia J, Cai F, Zhang F, Yang M, Bi S, et al. Aptamer-functionalized hydrogel as effective anti-cancer drugs delivery agents. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015; 134:40–46.
- 4.Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008;49(8):1993-2007.
- 5.Boucard N, Viton C, Domard A. New Aspects of the Formation of Physical Hydrogels of Chitosan in a Hydroalcoholic Medium. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):3227-37.
- 6.Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(1):13-36.
- 7.Lin C-C, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(12):1379-408.
- 8.Soto D, Oliva H. Métodos para preparar hidrogel químicos y físicos basados en almidón: Una revisión 2012. 154-75 p.
- 9.Lizawa T, Taketa H, Maruta M, Ishido T, Gotoh T, Sakohara S. Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007;104(2):842-50
- 10.Jeyanthi R., Rao K.P. In vivo biocompatibility of collagenpoly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials*, 11(4), 238-243, May 1990.

11. París R, Quijada-Garrido I. Swelling and hydrolytic degradation behaviour of pH-responsive hydrogels of poly[(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] crosslinked by biodegradable polycaprolactone chains. *Polymer International*. 2009;58(4):362-7
12. A.K Bajpai, S. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, “Responsive polymers in controlled drug delivery”, *Progress in Polymer Science*, vol. 33, pp. 1088– 1118, 2008.
13. N. González, J. Contreras, F. López-Carrasquero, A. El-Halah, C. Torres, J. Prin, J. Benítez, B. Rojas, “Estudio de la síntesis y caracterización de hidrogeles semi-IPN obtenidos a partir de poliacrilamida y el biopolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)”, *Interciencia*, vol. 38, pp. 430-436, 2013.
14. A. Bajpai, J. Bajpai and S. Shukla, “Water sorption through a semiinterpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains”, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 50, no. 1, pp. 9-21, 2002.
15. Pérez I.P. Sistemas poliméricos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable. Tesis de grado, Instituto de ciencia y tecnología de polímeros, Universidad Complutense de Madrid, 2006.
16. Escobar J.L., Zaldivar D., Agüero L., Fernández S., Katime I. Liberación de cefazolina sódica a partir de hidrogeles de copolímeros de poli (acrilamida-co-ácido metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 1-10, 2003.
17. De Queiroz A., Passos D., De Brito Alves, Sdnei., Silva, Gerard S., Higa, Olga Z., Vítolo, Michele. Alginate-Poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. *Brasil*. 2005.
18. Chirani N, Yahia LH, Gritsch L, Motta F, Chirani S, Faré S. History and applications of hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*. 2015;4.
19. B. Zhu, H. Yin, Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structurefunction analysis and applications, *Bioengineered*. 6 (2015) 125– 131.
20. Ishikawa Y, Hiratsuka K, Sasada T (2006) Role of wáter in the lubrication of hidrogel.

Wear 261: 500-504.

21. Katime I, Katime O, Katime D (2004) Los Materiales Inteligentes de este Milenio: Los Hidrogeles Macromoleculares. Síntesis, Propiedades y Aplicaciones. Universidad del País Vasco. Bilbao, España. 18 pp.

22. Shalviri A, Liu Q, Abdekhodaie MJ, Wu XY. Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. Carbohydrate Polymers. 2010;79(4):898-907.

23. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. European Polymer Journal. 2015;65(Supplement C):252-67.

24. Chung, H., & Grubbs, R. H. Rapidly Cross-Linkable DOPA Containing Terpolymer Adhesives and PEG-Based Cross-Linkers for Biomedical Applications. Macromolecules, 45(24) (2012), 9666-9673.

25. Wang RM, Johnson TD, He J, Rong Z, Wong M, Nigam V, et al. Humanized mouse model for assessing the human immune response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. Biomaterials. 2017;129:98–110. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.016.

26. Sharpe LA, Daily AM, Horava SD, Peppas NA. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2014;11(6):901-15.

27. Katime I, Katime O, Katime D “Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones”. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao España, 2004.

28. Maitra J, Shukla V. Cross-linking in hydrogels - a review. Am J Polym Sci. 2014;4(2):25-31.

29. Hao J, Weiss RA. Viscoelastic and Mechanical Behavior of Hydrophobically Modified Hydrogels. Macromolecules. 2011;44(23):9390–8.

30. Franzén H, Draget K, Langebäck J, Nilsen-Nygaard J. Characterization and

Properties of Hydrogels Made from Neutral Soluble Chitosans. *Polymers*. 2015(7):373-89.

31.Cai DZ, Zeng C, Quan DP, Bu LS, Wang K, Lu HD, et al. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor-beta1 delivery for cartilage tissue engineering. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120:293.

32.Li X, Liu KL, Li J, Tan EP, Chan LM, Lim CT, et al. Synthesis, characterization, and morphology studies of biodegradable amphiphilic poly [(R) -3-hydroxybutyrate]-alt-poly(ethylene-glycol) multiblock copolymers. *Biomacromolecules* 2006; 7:31129.

33.Keilhoff G, Stang F, Wolf G, Fansa H. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction *Biomaterials* 2003; 24:2779-8.

34.KC Weng, JJR Stalgren, DJ Duval , SH Risbud , CW Frank *Biomembranasfluidas soportadas en sustratos de aerogel / xerogel nanoporosos Langmuir*, 20 (2004) , pp. 7232 – 7239.

35.Sáez V., Hernáez E., Sanz A.L. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 55-70, 2004.

36.Gallardo, A.; Vázquez, B.; Elvira, C.; San Román, J.; *Sistemas de liberación controlada de medicamentos. Biomateriales*. Ed. R. Sastre, S. de Aza, J. San Román. CYTED, 2004, 449-71.

37.Ficha técnica de Zyvoxid® (linezolid) 2 mg/ml solución para perfusión. [Acceso junio 2019]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/64106/FT_64106.pdf.

38.Jones RN, Johnson DM, Erwin ME. In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 720-6.

39.Leonard SN, Cheung CM, Rybak MJ. Activities of ceftobiprole, linezolid, vancomicina, and daptomycin against community-associated and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2979-2976.

40. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, et al. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3251-5.
41. Lin Df, Zhang Y.Y., Wu J.F., Wang F., Zheng J. C, Miao J.Z., 2008) Linezolid para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos grampositivos en China . En t. J. *Antimicrob. Agentes* 32, 241 - 249 doi:10.1016 / j. ijantimicag.2008.04.004.
42. Clemett, D., y Markham, A. (2000). Linezolid. *Drugs*, 59 (4), 815–827. doi: 10.2165 / 00003495-200059040-00007.
43. Zurenko G E, Yagi B H, Schaadt R D et al. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 839-45.
44. Cammaratta SK, Hafkin B, Todd WM, Batts DH. Efficacy of linezolid in Community-Acquired *S. pneumoniae* pneumonia. (abstract). Proceedings of the 5th International Conference on the Macrolides, Streptogramins, Ketolides and Oxazolidinones, 2000; Jan 26-28; Seville, 08.22.
45. Quiñones-Pérez D, Goñi P, Rubio MC, Baquero F, Gómez-Lus R, Del Campo R. Genetic relatedness and antimicrobial resistance determinants among clinical isolates of enterococci from Cuba. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:793-7.
46. Kalima A.P.: The Taxonomy and nomenclature of enterococci. *J. Syst. Bacteriol.* 20:185,1970.
47. Fica C Alberto, Jemenao P María Irene, Bilbao V Paola, Ruiz R Gloria, Sakurada Z Andrea, Pérez de Arce O Edith et al. Emergencia de infecciones por *Enterococcus* sp resistente a vancomicina en un hospital universitario en Chile. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2007 Dic [citado 4 Mayo 2019];24(6):462-471. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182007000600006&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000600006>.
48. *Rev. chil. infectol.* v.23 n.3 Santiago sep. 2006. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* sp aisladas en hospitales del norte de Chile.

49. Porte L, Hervé B, Prat S, Chanqueo L. Enterococcus sp. Parte I. Rev Chil Infect 2007;24(3):231
50. Barberán López J. Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por enterococo. Revista electrónica de Medicina Intensiva [revista en la Internet]. 2004 [citado 4 May. 2019];4(9):1-6. Disponible en: <http://remi.uninet.edu/2004/09/REMIC10.html>
51. Cercenado E, Coque MT. Epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos grampositivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;5:14-26
52. HEITMANN I. Nota breve: Epidemiología nacional de las infecciones por Streptococcus pneumoniae. Rev Chile Infect 1999; 16: 133-36.
53. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:4643-7.
54. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in Enterococcus faecium. Antimicrob. Agents Chemother. 2011; 55:4606-12.
55. Iversen A, Kuhn I, Rahman M, Franklin A, Burman L G, Olsson-Liljequist B, et al. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of Enterococcus faecium. Environ Microbiol 2004; 6: 55-9.
56. Martínez-Odriozola P, Muñoz-Sánchez P, Gutiérrez-Macías A, Arriola-Martínez P, Montero-Aparicio E, Ezpeleta-Baquedano C. Análisis de 182 episodios de bacteriemia por enterococo: Estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25:503-7.
57. Gao, T., Jiang, M., Liu, X., You, G., Wang, W., Sun, Z., ... Chen, J. (2019). Patterned polyvinyl alcohol hydrogel dressings with stem cells seeded for wound healing.
58. Gupta, S., Webster, T. J., & Sinha, A. (2011). Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 22, 1763–1772.

59. Gupta, N.V.; Shivakumar, H.G. Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite. *Iran. J. Pharm. Res.* 2012, 11, 481–493.
60. National Center for Biotechnology Information, “Succinic Acid,” PubChem Compound Database, 2017. [Online] citado el 29 de junio del 2019. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1110>.
61. Xu, J.; Li, X.; Sun, F. Cyclodextrin-containing Hydrogels for Contact Lenses as a Platform for Drug Incorporation and Release. *Acta Biomater.* 2010, 6, 486–493.
62. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B, Reviews.* 2010;16(4):371-83.
63. Brazel CS, Huang X. The Cost of Optimal Drug Delivery: Reducing and Preventing the Burst Effect in Matrix Systems. *Carrier-Based Drug Delivery. ACS Symposium Series.* 879: American Chemical Society; 2004. p. 267-82.
64. Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW, et al. Mecanismo de acción de las oxazolidinonas: efectos de linezolid y eperezolid sobre las reacciones de traducción. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 21326.
65. Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release.* 2002;82(2):289-307.
66. Brazel CS, Huang X. The Cost of Optimal Drug Delivery: Reducing and Preventing the Burst Effect in Matrix Systems. *Carrier-Based Drug Delivery. ACS Symposium Series.* 879: American Chemical Society; 2004. p. 267-82.