

Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica

Jorge Miguel Correia Crespo

Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
jorge.crespo17@gmail.com

Carmina Rodríguez Fernández

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. UCM
carmina@farm.ucm.es

Resumen: en este trabajo de investigación se han nanoencapsulado antibióticos destinados a formar parte de biomateriales o para el tratamiento clínico de las infecciones asociadas a biofilmes. Éstos son especialmente resistentes a los antibióticos, como ocurre en las infecciones por prótesis, induciendo su rechazo y la cronicidad de los procesos inflamatorios. El diseño de nuevas nanopartículas que penetren directamente en los biofilmes y sin efectos adversos al organismo humano, constituye una de las estrategias terapéuticas más interesantes hoy en día. Se han producido nanopartículas de diversos antibióticos según su espectro de acción y encapsulado en un polímero biocompatible de Poli(metilmacrilato), usado en la liberación controlada de antibióticos, mediante nanotecnología de fluidos supercríticos (FSC). Los FSCs más utilizados fueron nitrógeno molecular (N₂) y dióxido de carbono (CO₂), por sus propiedades críticas bajas (presión y temperatura) y por su mínima toxicidad. La actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria, CMI) de los antibióticos nanoprocesados, se ensayó por microdilución en placa y difusión en disco, obteniéndose una CMI similar a la del control del antibiótico no encapsulado. Actualmente se están realizando ensayos de liberación, cuantificación y penetración en los biofilmes. Esta nueva formulación representa un avance prometedor en Nanomedicina para el tratamiento de infecciones crónicas asociadas a dispositivos médicos.

Palabras clave: Nanopartículas. Biofilmes. Antibióticos. Prótesis. Técnicas de Fluidos Supercríticos.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores avances en Microbiología de los últimos años ha sido el estudio de los biofilmes o biopelículas y su repercusión en clínica⁽¹⁾. Los avances

tecnológicos aplicados en Nanomedicina, permiten diseñar nanopartículas de fármacos que penetren directamente en los biofilmes y sin efectos adversos al organismo humano, constituyendo una de las estrategias terapéuticas más interesantes actualmente.

Las nanopartículas se definen como partículas de dimensiones entre 1-100 nanómetros (nm). Estas partículas pueden estar constituidas por diferentes materiales (nanotubos) y formas estructurales cristalinas (fullerenos y *quantum dots*).

Los biofilmes son un agregado de células microbianas irreversiblemente adheridos a una superficie y envueltos de una matriz de material polimérico extracelular (EPS) y muy resistentes a los antibióticos ⁽¹⁾.

Existe una clara relación entre la formación de biofilmes y el desarrollo de graves procesos infecciosos, como la fibrosis quística, la endocarditis de válvula nativa, la otitis media, la periodontitis, la prostatitis crónica ^(2, 3).

Además de crecer sobre mucosas y tejidos, los biofilmes aparecen en prácticamente todos los dispositivos inertes insertados en pacientes, implantes médicos como prótesis y válvulas cardíacas, dando origen a infecciones nosocomiales y crónicas difíciles de erradicar y provocando la pérdida de la funcionalidad de los dispositivos, por lo que su recambio ha de realizarse con mayor frecuencia ⁽⁴⁾.

Los tipos dispositivos principalmente afectados son los catéteres venosos centrales, las válvulas cardíacas, los dispositivos de asistencia ventricular, las endoprótesis coronarias, las derivaciones ventrículo- peritoneales utilizadas en neurocirugía, los implantes de estimulación neurológica, las prótesis articulares y los dispositivos de fijación de fracturas.

Objetivo

Formular antibióticos nanoencapsulados destinados a formar parte de biomateriales para implantes extravasculares o para el tratamiento clínico de las infecciones asociadas a biofilmes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nanoencapsulación de antibióticos

Las técnicas utilizadas para la formulación de nanopartículas de antibióticos fueron: Supercritical Enhanced Atomization (SEA) y Supercritical Anti-Solvent process (SAS) ^(5, 6). El SCF más común utilizado en aplicaciones farmacéuticas es el dióxido de carbono (CO₂) o nitrógeno molecular (N₂) debido a sus propiedades de temperatura y presión en condiciones supercríticas y mínima toxicidad.

El polímero empleado fue el Poli(metilmacrilato) (PMMA), por ser un polímero biocompatible usado en la liberación controlada de los antibióticos y con un grado aceptable de encapsulación de fármacos. Se ensayaron varios antibióticos de amplio espectro, el más estudiado fue la tigeciclina ^(7, 8). Como solvente se utilizó el tetrahidrofurano (THF) por mostrar una elevada solubilidad del polímero y del antibiótico en la misma solución, en un rango de concentraciones de 0,2%-1% (m/m) (PMMA/THF).

La solución preparada anteriormente se bombea (mediante una bomba dosificadora) a través de un nozzle coaxial (con orificio de 50, 100 ó 150µm) donde se mezcla con el fluido supercrítico en una cámara antes de su dispersión en un recipiente de precipitado a presión atmosférica. La temperatura de la maquinaria se controló por cámara de aire y por un baño de agua.

Las partículas procesadas se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM), en un filme de oro líquido por electrodeposición en vacío.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los antibióticos nanoprocesados, se ensayó por microdilución en placas multipocillos (concentración mínima inhibitoria, CMI) y difusión en disco (en medio sólido), en medio Müller-Hinton.

Las bacterias (2-3x10⁵ UFC/mL) utilizadas en estos ensayos fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las nanopartículas

El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) del tamaño y morfología de las nanopartículas producidas, reveló una distribución media 100nm-400nm (Fig. 1). Además, se verificó que hay encapsulación de antibiótico por el PMMA, con la presencia de partículas de antibiótico en la curvatura central del polímero.

Previamente, es necesario determinar las condiciones termodinámicas de la solución en su estadio inicial (antes de pasar por el nozzle) para fijar algunas variables como presión, temperatura, porcentaje de flujo, en las que se realizarán los ensayos.

Las variaciones de temperatura utilizadas fueron de 30-50°C a nivel del precipitador y presiones de 3-8MPa para garantizar las condiciones críticas y el pasaje de las partículas por el nozzle, definiendo la morfología de las nanopartículas procesadas (esfericidad o formación de fibras). Para la formulación de partículas más

esféricas y regulares se llegó a un valor fijo de 30oC y 3MPa, obteniendo mayor cantidad de partículas aisladas y con el rango de distribución más estrecho.

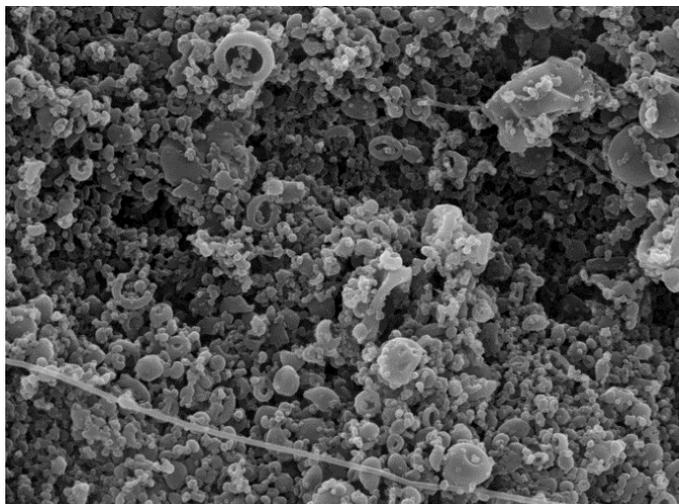


Figura 1. SEM de nanopartículas de antibiótico encapsulado. Imagen obtenida en IST (J. Crespo Instituto Superior Técnico, Lisboa).

Según los fluidos supercríticos utilizados (CO₂ y N₂) no se observaron cambios químicos y farmacológicos significativos en las partículas procesadas.

Actividad antimicrobiana de los antibióticos nanoencapsulados

Las condiciones supercríticas utilizadas en la producción de las nanopartículas no afectaron la actividad antimicrobiana de los antibióticos nanoencapsulados en ellas.

En el caso de la tigeciclina, se obtuvieron las siguientes concentraciones mínimas inhibitorias (en multipocillos) (Fig. 2).

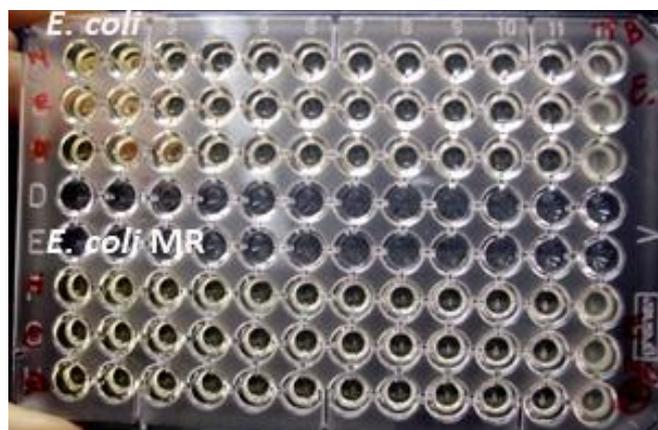


Figura 2. Determinación de la CMI por microdilución, de la Tigeciclina nanoencapsulada.

Escherichia coli ATCC 25922:
< 0,4µg/mL.
Escherichia coli multirresistente:
30 µg/mL.
Pseudomonas aeruginosa ATCC:
30 µg/mL.
Staphylococcus aureus ATCC 25923:
3,25 µg/mL.

Estos valores están de acuerdo con los establecidos por el Comité Europeo de Ensayo de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

CONCLUSIONES

Las partículas obtenidas se han reducido a nanoescala tanto en el antibiótico, como en el polímero.

Las nanopartículas obtenidas poseen una regularidad morfológica esférica.

La actividad farmacológica de los antibióticos nanoencapsulados es muy similar a la actividad de las partículas de antibióticos sin ser procesados (originales). Es decir, las condiciones supercríticas empleadas no modifican la estabilidad y actividad farmacológica de los antibióticos, consiguiendo la disminución de los fármacos encapsulados a nanoescala.

PRESPECTIVAS FUTURAS

Son diversos los avances que se pueden desarrollar dentro de este ámbito, utilizando combinaciones de antibióticos con diferentes espectros de acción, dado que un biofilme puede ser constituido por bacterias de varias especies.

Se deben investigar polímeros para encontrar el ideal, es decir, el polímero que tenga mejor encapsulación y liberación del fármaco que se estudia.

En caso de infecciones bacterianas provocadas por biofilmes asociadas a dispositivos médicos podrían ser formuladas microinyecciones para aplicarlas directamente en el agregado bacteriano. O la colocación de membranas alrededor de las prótesis con el antibiótico nanoencapsulado para ser liberado en la presencia de las bacterias. Estas tecnologías son apenas hipotéticas y que necesitan de estudios y bases científicas que aún no han sido desarrollados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 September; 8(9): 881–890.
2. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167–193.
3. Parsek R, Singh PK. Bacterial biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57:677–701.
4. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs.* 2005; 28(11):1062-8.
5. Padrela L, Rodrigues MA, Velaga SP, Fernandes AC, Matos HA, Azevedo EG. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. *J. of Supercrit. Fluids.* 2010. 53, 156-164.
6. Rodrigues M, Li J, Padrela L, Almeida A, Matos H, Azevedo EG, Anti-solvent effect in the production of lysozyme nanoparticles by supercritical fluid-assisted atomization processes. *J. of Supercrit. Fluids.* 2009.48:253-260.
7. Pinheiro L, Matos A, Crespo J, Padrela L, Rodrigues MA, Matos HA, Castro M, Duarte A, Almeida AJ, Bettencourt A. Antibacterial Activity of Tigecycline Micro/Nanoparticles under Supercritical Fluids Conditions. *European Cells and Materials.* 2010; 20 (3): 202.
8. Matos A, Padrela L, Rodrigues M, Matos H, Crespo J, Pinheiro L, Duarte A, Almeida A, Bettencourt A. Tigecycline Encapsulation Into Poly(methylmethacrylate) Drug Delivery Systems. Porto. 2010.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Shapiro IM, Hickok NJ, Parvizi J, Stewart S, Schaer TP. Molecular engineering of an orthopaedic implant: from bench to bedside. *European Cells and Materials.* 2012; 362-370.
- Lewis, G. Properties of antibiotic-loaded acrylic bone cements for use in cemented arthroplasties: A state-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2008.
- Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2005;135:243-251.

Gallo J, Kolář M, Novotný R, Řiháková P, Tichá V. Pathogenesis of prosthesis-related infection. Biomed. Papers. 2003; 147(1); 27-35.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Bacteriality – Exploring Chronic Disease. Fecha de consulta: 21 febrero 2013.
Disponible en: <http://bacteriality.com/2008/05/26/biofilm/>

Recibido: 7 noviembre 2013.
Aceptado: 24 febrero 2014.