

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Evaluación del Efecto Inhibitorio de Oxitetraciclina  
y Gentamicina Encapsuladas en Microesferas de Albúmina  
Sobre la Cepa de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653



TESIS PROFESIONAL

TODO · LO · ILUMINAN

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942

Presenta:

Cindy Melina Colosio López

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



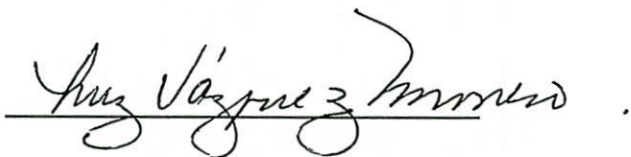
“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de p.QBC Cindy Melina Colosio López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico-Biólogo Especialidad Análisis Clínicos.



Dra. Luz Vázquez Moreno

Directora de Tesis



Dr. Enrique Bolado Martínez

Secretario



Dra. Adriana Garibay Escobar

Vocal



M. en C. María del Carmen Bermúdez Almada

Suplente

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora**, por brindarme la formación académica que me permitirá crecer en el ámbito profesional y humano. A mis maestros por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

Al **Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C.** por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones.

A la **Dra. Luz Vázquez Moreno**, por dirigir este proyecto y proporcionarme su total apoyo y disponibilidad.

A la **M.C. María del Carmen Bermúdez Almada**, le agradezco la oportunidad que me dio en su laboratorio y ser parte de su equipo de trabajo.

De igual manera agradezco a la **M.C. Angelica Espinosa Plascencia**, por todo el tiempo que me dedicó en el laboratorio, ya que siempre estuvo al pendiente de mi y aún más por su amistad.

Gracias al **C. a Dr. José Andreí Sarabia Sainz** por su gran apoyo técnico, enseñanzas, tolerancia y sobre todo por su amistad.

Al **Laboratorio de Residuos Tóxicos y Laboratorio de Bioquímica de Proteínas**, por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación. Especialmente a la **Q.B. Leticia Miranda Vásquez**, **M.C. Haydé Hayamaí González Carrillo** y la **Q. B. Claudia Lara Espinoza**, por brindarme siempre su amistad.

A mis sinodales **Dra. Luz Vázquez Moreno**, **Dr. Enrique Bolado Martínez**, **Dra. Adriana Garibay Escobar** y **M. en C. María del Carmen Bermúdez Almada**, por su tiempo, colaboración y sus valiosas aportaciones para realizar este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mis **padres** por todo el apoyo recibido a lo largo de mi vida, porque sé que sin ellos esto nunca hubiese sucedido. Porque siempre me motivan a continuar y a trabajar incansablemente. Por el ejemplo que me han dado y porque los quiero mucho.

A mi **mamá** porque siempre me ha aconsejado pero respetando mis deseos, porque siempre me has enseñado a soñar alto y volar lejos.

A mi **papá** porque siempre me ha mostrado lo que es ser una persona íntegra y con valores, porque me enseñaste responsabilidad, aunque a veces yo no quería, porque me hiciste la profesionista que hoy soy.

A mi **hermano Rafa**, quien me enseñó que rendirse no es opción, con el que aprendí estrategias de lógica, planeación y mediación, combate, e incluso terrorismo, porque me enseñó el juego "sin llorar" y porque gracias a todo eso nadie ni nada me detendrá.

A mis amigos de la Universidad, **Amanda, Thelma e Hiram** con quienes descubrí que la escuela puede ser divertida y que el estudio no está peleado con la fiesta. Con quienes viví cada momento de estrés, aventuras locas, desveladas y muchas historias más. A las amenazas **Laura y Claudia**, que fueron mi equipo maravilla, porque los laboratorios nunca habían sido tan divertidos e intrépidos. Y a todos los amigos que me han acompañado a lo largo de los años, porque sin su apoyo es difícil salir adelante.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Enfermedades Bacterianas más Frecuentes en Camarón de Cultivo <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	4
Vibriosis Sistémica.....	4
Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP).....	5
Erosión Bacteriana del Caparazón.....	5
Características Generales de la Familia <i>Vibrionaceae</i> .....	5
Características Generales de <i>Vibrio mimicus</i> .....	6
Oxitetraciclina como el Antibiótico más Utilizado en el Cultivo de Camarón.....	8
Características Fisicoquímicas de OTC.....	8
Mecanismo de Acción de Oxitetraciclina .....	9
Características Fisicoquímicas de Gentamicina.....	11
Mecanismo de Acción de Gentamicina.....	12
Mecanismos Celulares Involucrados en el Desarrollo de Resistencia Bacteriana Contra Oxitetraciclina y Gentamicina.....	13
Transducción.....	14
Conjugación.....	14
Transformación.....	15
Transposición.....	15
Aminoglucosidos .....	16
Tetraciclinas.....	16
Ventajas y Desventajas de la Administración de Fármacos Libres.....	18
Alternativas para la Administración de Fármacos en humanos.....	19

Dendrimeros.....	20
Liposomas.....	20
Micropartículas y nanopartículas poliméricas .....	21
Materiales Poliméricos Empleados en los Sistemas de Liberación	
Controlada.....	21
Albúmina como Transportador de Fármacos .....	23
Aplicación de Antibióticos con Liberación Controlada.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Solución Amortiguadora Salina de Fosfatos (PBS).....	25
Conservación de las Cepas Bacterianas.....	26
Pruebas de Sensibilidad con Sensidiscos.....	26
Preparación de Diluciones.....	26
Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos.....	30
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los	
Antibióticos Oxitetraciclina y Gentamicina.....	32
Cinética de Crecimiento Bacteriano Empleando Oxitetraciclina Libre	
y Encapsulada.....	32
Cinética de Crecimiento Bacteriano Empleando Gentamicina Libre y	
Encapsulada.....	34
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Interpretación de acuerdo a los halos de inhibición para considerar los resultados en pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	<b>27</b>
2.	Sensibilidad de <i>Vibrio mimicus</i> 602 ATCC 33653 a los distintos antibióticos.....	<b>30</b>
3.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los antibióticos encapsulados y de forma libre probados en una cepa de <i>Vibrio mimicus</i> 602 ATCC 33653.....	<b>39</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura química de las tetraciclinas con las diferentes opciones para formar derivados.....	9
2.	Esquematación del mecanismo de acción de las tetraciclinas.....	10
3.	Estructura química de un aminoglucósido-aminociclitol.....	11
4.	Mecanismo de acción de gentamicina.....	13
5.	Esquematación de los distintos mecanismos de resistencia bacteriana.....	17
6.	Distintos sistemas de liberación controlada de fármacos.....	21
7.	Distribución de las muestras con el antibiótico encapsulado o libre en microplacas de poliestireno para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del antibiótico.....	29
8.	Antibiograma de <i>Vibrio mimicus</i> 602 ATCC 33653 con distintos antibióticos.....	31
9.	Cinética de crecimiento de <i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653 (A) OTC y libre y (B) encapsulada.....	33
10.	Cinética de crecimiento de <i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653 (A) OTC libre y (B) encapsulada.....	35
11.	Porcentaje de inhibición de <i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653 en CST con OTC encapsulada y libre después de 24 h de incubación.....	36
12.	Porcentaje de crecimiento de <i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653 en CST con gentamicina encapsulada y libre después de 24 h incubación.....	37

## RESUMEN

Los cultivos intensivos de camarón son afectados por diversas enfermedades, siendo las infecciones virales y bacterianas las que más dañan los cultivos. La vibriosis es considerada una de las enfermedades más importantes, ocasionada por bacterias del género *Vibrio*, la cual puede presentarse en cualquiera de las etapas de desarrollo del camarón. Ante esta problemática se ha recurrido al empleo de antibióticos como oxitetraciclina (OTC), siendo este antibiótico el mayormente utilizado para tratar dichas infecciones en los crustáceos. Sin embargo, su uso frecuente ha generado el desarrollo de resistencia bacteriana, la contaminación de efluentes, entre otros; por ello se han buscado alternativas de tratamiento, como es el empleo de otros antibióticos y/o nuevas formas de administración de éstos, por ejemplo mediante la microencapsulación. El objetivo de esta investigación fue evaluar la acción inhibitoria de los antibióticos oxitetraciclina y gentamicina encapsulados en microesferas de albúmina sobre la cepa de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653. Se determinó la sensibilidad de *V. mimicus* a distintos antibióticos como cloranfenicol, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, oxitetraciclina y doxiciclina, mediante pruebas de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco. Además se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para OTC y gentamicina empleando los antibióticos de forma libre y encapsulados. La CMI fue determinada por la técnica de microdilución en placa empleando un lector de ELISA. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 fue sensible a todos los antibióticos probados, observándose que la OTC encapsulada tuvo un mayor efecto sobre la tasa de crecimiento en *V. mimicus* 602 ATCC 33653 que cuando el antibiótico se probó de forma libre. Para gentamicina el efecto inhibitorio fue menor con el antibiótico encapsulado. Los valores de CMI para OTC y gentamicina fueron de 0.5 µg/mL y 8 µg/mL respectivamente, demostrándose que el proceso de encapsulación no alteró la actividad antimicrobiana de los antibióticos, siendo OTC el más efectivo para inhibir a *V. mimicus* 602 ATCC 3365.



## INTRODUCCIÓN

Mundialmente, la industria del cultivo de camarón crece a niveles superiores que cualquier otro sector de producción de alimentos. Sin embargo, se ha visto afectada por la prevalencia de enfermedades en los organismos cultivados, causando importantes pérdidas económicas (Santiago y col., 2009). Las enfermedades bacterianas se encuentran entre las de mayor importancia en la industria acuícola, las bacterias Gram (-), principalmente las pertenecientes al género *Vibrio*, predominan en el ambiente marino y se han relacionado como causantes de enfermedades en las distintas especies de camarón (Álvarez y col., 2000). *Vibrio mimicus* se considera menos frecuente que otras especies de *Vibrio* asociadas a infecciones humanas, pero se le ha relacionado con diarreas ocasionadas por el consumo de pescado crudo y ostras (Mira y García, 1998; Hasan y col., 2010).

Aunado al desarrollo de la acuicultura, se inició el uso de antibióticos y quimioterapéuticos para tratar las enfermedades que se presentan como consecuencia de la producción intensiva de los organismos. Dentro de los antibióticos más utilizados en la camaronicultura se encuentran las quinolonas y las tetraciclinas, siendo la oxitetraciclina el antibiótico más utilizado por esa industria en México (Roque y col., 2001; Aguilera y col., 2010).

En todo el mundo se ha demostrado la generación de bacterias resistentes debido al uso indiscriminado de antibióticos. En México, alrededor del 70% de las bacterias de *Vibrio* aisladas de los cultivos acuícolas han desarrollado resistencia a distintos antibióticos (Thompson y col., 2004). La aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos, particularmente la multiresistencia entre los patógenos, se ha convertido en uno de los desafíos más grandes de la terapia clínica (Li y col., 2010). El diseño de sistemas que controlen la liberación y entrega de antibióticos, podrían ayudar a disminuir las dosis empleadas de estos fármacos, reduciendo el riesgo de resistencia bacteriana, contaminación del medio ambiente y toxicidad.

Un sistema de entrega prolongada del antibiótico se caracteriza por la liberación del fármaco de forma controlada, de tal manera que se mantiene una concentración terapéutica adecuada en el plasma durante un tiempo largo, y se suministra sólo donde y cuando sea

necesario, reduciendo los efectos adversos y generando la optimización de la terapia del paciente (Edlund y Albertsson, 2002).

En el mercado se encuentran disponibles una gran variedad de formas para la dosificación de fármacos de liberación controlada, en los cuales son empleados como vehículos sistemas coloidales poliméricos. Las microesferas de albúmina son ampliamente utilizadas para la liberación sostenida de agentes terapéuticos y como portadores de fármacos, tanto en sitios específicos de entrega como para influir en el lanzamiento de drogas en un sitio remoto (Patil, 2003). La administración de antibióticos empleando un sistema controlado, disminuye la carga bacteriana específicamente en el sitio de la infección, minimizando la toxicidad renal, hepática y sistémica (Mansour y col., 2010).

En este estudio se determinó la sensibilidad de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 a los antibióticos gentamicina y oxitetraciclina, estableciendo para ambos, de manera independiente, las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, cuando se probaron estos antibióticos en forma libre y encapsulados en microesferas de albúmina.

Las enfermedades ocasionadas por las bacterias del género *vibrio* causan elevada mortalidad y pérdidas económicas en la industria camaronícola. La oxitetraciclina es el antibiótico de mayor efectividad, sin embargo, debido a la resistencia bacteriana generada, se requiere probar otros antibióticos como gentamicina y nuevos sistemas de administración de fármacos. Por lo que se propone demostrar la efectividad de estos antibióticos encapsulados en microesferas de albúmina, en la cepa bacteriana de *V. mimicus* 602 ATCC 33653.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la acción inhibitoria de los antibióticos oxitetraciclina y gentamicina encapsulados en microesferas de albúmina sobre *V. mimicus* 602 ATCC 33653.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la sensibilidad de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 a distintos antibióticos mediante un ensayo biológico.
2. Probar la efectividad de oxitetraciclina y gentamicina encapsulados en microesferas de albúmina sobre la cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para oxitetraciclina y gentamicina en forma libre y encapsulada para *V. mimicus* 602 ATCC 33653, empleando el método de microdilución en placa.

## ANTECEDENTES

### Enfermedades Bacterianas más Frecuentes en Camarón de Cultivo *Litopenaeus vannamei*

Las enfermedades que afectan a la industria acuícola, provocan anualmente pérdidas millonarias, por lo que su investigación y control son de suma importancia en la resolución de este problema. Las infecciones bacterianas se encuentran entre las principales causales que afectan a este sector industrial. En la acuicultura, el agua y los organismos acuáticos como las microalgas y artemia son considerados como vectores potenciales de bacterias patógenas. Las bacterias Gram (-), principalmente las pertenecientes al género *Vibrio*, predominan en el ambiente marino y constituyen la mayor parte de la microbiota intestinal de peces y crustáceos. Existen estudios relacionados con las bacterias pertenecientes a este género, que causan enfermedades en las distintas especies de camarones marinos (Álvarez y col., 2000; Rendón y Balcázar, 2003), algunos de estos padecimientos se revisarán a continuación.

#### **Vibriosis Sistémica**

También conocida como el Síndrome de la Gaviota, la cual afecta a todas las especies de camarón de cultivo, principalmente cuando éstos se encuentran en condiciones de estrés. Esta enfermedad se caracteriza por ser una infección generalizada que involucra a distintos órganos, cuyas manifestaciones clínicas son opacidad en el músculo, anorexia, inflamación del hepatopáncreas y tejido muscular. Las especies del género *Vibrio* que están relacionadas con esta patología son: *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *Vibrio spp.* (Gómez-Gil y col., 2001; Morales, 2004; Santiago-Hernández, 2009).

#### **Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)**

Esta enfermedad es reconocida como NHP (por sus siglas en inglés), se caracteriza por la inflamación y necrosis del hepatopáncreas de los camarones. Es considerada una infección grave provocada por bacterias intracelulares de tipo *rickettsias*. La infección se incrementa, cuando se asocia con factores ambientales como salinidad y temperaturas altas, durante

periodos prolongados. Las bacterias intracelulares que provocan esta infección atacan las células del epitelio del hepatopáncreas, ocasionando que este órgano tome una coloración pálida y una inflamación crónica, las células hepatopancreáticas aparecen hipertrofiadas y con gran cantidad de bacterias en el citoplasma (Gómez-Gil y col., 2001; Morales, 2004).

### **Erosión Bacteriana del Caparazón**

Esta es una enfermedad que se presenta en todas las especies de peneidos, tanto en etapa juvenil, como adulta. Se manifiesta por la aparición de manchas cafés o negras, en áreas erosionadas por la acción de bacterias quitinolíticas. Esta infección se ha asociado a *Vibrio* sp y a otras bacterias oportunistas como *Aeromonas* sp, *Spirillum* sp y *Flavobacterium* sp, representando una amenaza para la población de camarones en cultivo, cuando éstos se encuentran en condiciones de estrés severo (Morales, 2004; Santiago-Hernández, 2009).

### **Características Generales de la Familia *Vibrionaceae***

Las bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, se caracterizan por ser bacilos Gram (-), en forma de coma, con movilidad por medio de un flagelo polar único. Estas bacterias pertenecen a las Gammaproteobacterias, son mesófilas (crecen a una temperatura óptima entre 15 y 35 °C) y quimiorganótrofas (obtienen su energía de reacciones de óxido-reducción y utilizan sustratos orgánicos), poseen un metabolismo facultativo fermentativo y su hábitat es acuático, asociado a organismos eucariontes. Generalmente, estas bacterias son capaces de crecer en agar marino y en agar selectivo Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS), siendo la mayoría oxidasa (+) (Thompson y col., 2004). Toleran un amplio intervalo de salinidad, con un requerimiento óptimo de NaCl de 2.0 a 2.5% (peso/volumen). Algunas especies (halófilas) requieren al menos una concentración de 0.5% de NaCl en el medio de cultivo para crecer, mientras que las especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *V. mimicus* o *V. hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Leyton y Riquelme, 2008).

Distintas especies del género *Vibrio* se pueden encontrar como patógenos oportunistas, en todos los crustáceos marinos donde actúan cuando los mecanismos de defensa natural del hospedero están suprimidos. Las bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* se han asociado con grandes mortalidades de camarones peneidos en



diferentes partes del mundo, siendo *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. mimicus*, las especies mayormente reportadas en los brotes de infección, afectando cualquiera de las etapas de desarrollo del camarón (Morales y col., 2011). Las mortalidades causadas por las bacterias del género *Vibrio* en peces y crustáceos en cultivo, son comunes durante las primeras etapas larvarias y pueden ocurrir de forma repentina, ocasionando la muerte de toda la población (Thompson y col., 2004).

### **Características Generales de *Vibrio mimicus***

*V. mimicus* es una bacteria que habita en el medio acuático. Ha sido aislada de costas, estuarios y ríos de zonas templadas o cálidas, se encuentra formando parte de la microbiota del zooplancton, crustáceos y moluscos que se alimentan por filtración. Es capaz de sobrevivir a la congelación (hasta 0°C) y es considerado un microorganismo contaminante de agua y productos obtenidos de la pesca (Tercero y col., 2007).

Hasta el año 1981, esta especie bacteriana fue considerada dentro del grupo de *Vibrio cholerae* no-O1, sacarosa (-) (Hasan y col., 2010). Davis y col (1981) caracterizaron cepas bacterianas de este tipo y demostraron que algunas de ellas no eran mutantes ni biotipos de *V. cholerae*, sino que se trataba de otra especie nueva a la que denominaron *Vibrio mimicus*, debido a su similitud con *V. cholerae*, ya que comparte con este género múltiples características tanto fenotípicas como genotípicas. Esto fue determinado mediante el análisis de hibridación de ADN. Con el paso del tiempo, este microorganismo ha sido estudiado, emergiendo como un nuevo patógeno de la familia *Vibrionaceae* (González y col., 2005).

El mecanismo de patogenicidad de esta bacteria no está del todo esclarecido, pero se han descrito algunos factores de virulencia, entre ellos una hemolisina termolábil, llamada VMH (Hemolisina de *Vibrio mimicus*), la cual está presente en el 98% de las cepas aisladas, tanto de muestras clínicas, como ambientales. También se ha encontrado una hemolisina termoestable, la Vm-TDH (Hemolisina directa termoestable de *Vibrio mimicus*), esta toxina le confiere la capacidad de provocar diarreas tipo disentería. Además, se ha descrito la presencia de proteasas, sideróforos y varias hemaglutininas, relacionadas con la capacidad de la bacteria de adherirse a la mucosa intestinal (Tercero y col., 2007; González y col., 2005).

Se ha reportado que algunas cepas de *V. mimicus* son capaces de provocar cólera, con todos los síntomas característicos y la correspondiente deshidratación. El análisis detallado de las cepas bacterianas reveló la presencia de una toxina colérica (CT), una toxina termoestable (ST) y una toxina termolábil (LT), todas ellas similares a las producidas por *Vibrio cholerae*. Se ha demostrado que existe un flujo horizontal de material genético entre las especies de *V. mimicus* y *V. cholerae*, indicando la transmisión de plásmidos por transducción del fago CTX, el cual porta los genes que producen la toxina del cólera (González y col., 2005).

*V. mimicus* se considera menos frecuente que otras especies de *Vibrio* asociadas a infecciones humanas, pero se le ha relacionado con diarreas ocasionadas por el consumo de pescado crudo y ostras. La gastroenteritis humana ocasionada por *V. mimicus* se caracteriza por diarrea, náuseas, vómitos, calambres abdominales y fiebre (Mira y García, 1998; Hasan y col., 2010). Esta especie de *Vibrio* ha sido aislada de agua de mar, ostras y camarones. Se ha encontrado con frecuencia en camarones aparentemente sanos de la especie *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil. Además, *V. mimicus* es considerado como un agente patógeno, que puede afectar cualquiera de las etapas del camarón (Vandenberghe y col., 1999).

## **Oxitetraciclina como el Antibiótico más Utilizado en el Cultivo de Camarón**

A la par del desarrollo de la acuicultura, se inició el uso de antibióticos y quimioterapéuticos para tratar las enfermedades que aparecen como consecuencia de una producción intensiva. Son dos las familias de antibióticos más utilizadas como agentes antibacterianos, una de ellas la conforman las quinolonas, en la cual se agrupa al ácido oxolínico y las flumequinas, la segunda familia corresponde a las tetraciclinas, siendo oxitetraciclina (OTC) el antibiótico más utilizado en la industria camaronícola en México (Roque y col., 2001; Aguilera y col., 2010).

Las tetraciclinas fueron descubiertas en el año 1945 por Benjamín Duggar. En el año 1950, después del análisis de una gran cantidad de muestras de suelos, se aisló la OTC a partir de *Streptomyces rimosus*, con características y propiedades similares a clortetraciclina (Ghizlane, 2006). Posteriormente, ocurrieron nuevos descubrimientos de antibióticos con efectos similares al compuesto original, clasificándolos a todos con el nombre de Tetraciclinas (Aguilera y col., 2010).

### **Características Fisicoquímicas de OTC**

La OTC es una sustancia cristalina, ligeramente amarilla, sin olor y levemente amarga, es muy poco soluble en agua, es anfótera ya que en solución acuosa forma sales tanto con ácidos como con bases. Es estable cuando se encuentra en polvo, pero pierde esa propiedad cuando se encuentra en solución acuosa, siendo particularmente inestable a valores de pH superiores a 7.0. Se destruye en soluciones ácidas con un valor de pH inferior a 2. Cuando OTC es preparada en soluciones acuosas neutras, pierde la mayor parte de su actividad en tres o cuatro días (Ghizlane, 2006).

Los antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, se caracterizan por tener una estructura común de octahidronaftaceno, formado por cuatro anillos condensados que le

proporcionan un amplio espectro de actividad. Su estructura general y configuración posee varios centros asimétricos (Fig. 1) (Aguilera y col., 2010).

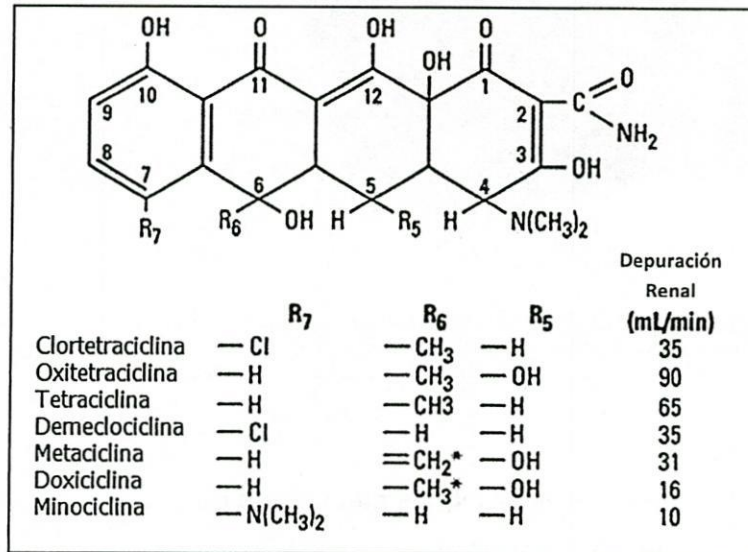


Figura 1. Estructura química de las tetraciclinas con las diferentes opciones para formar derivados

Fuente: <http://karlaliz27.blogspot.mx/>

### Mecanismo de Acción de Oxitetraciclina

El mecanismo de acción de las tetraciclinas se lleva a cabo en el ribosoma de las bacterias Gram (-), cuando el antibiótico penetra a la célula bacteriana mediante mecanismos de difusión pasiva a través de los canales hidrofílicos (porinas) y por procesos de transporte activo dependientes de energía. Lo anterior, determina que la concentración intracelular sea mayor que la extracelular. Una vez dentro de la célula, las tetraciclinas se unen de manera reversible a los receptores en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo mRNA-ribosomal, esto evita la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo la síntesis de proteínas (Mendoza, 2011) (Fig. 2).

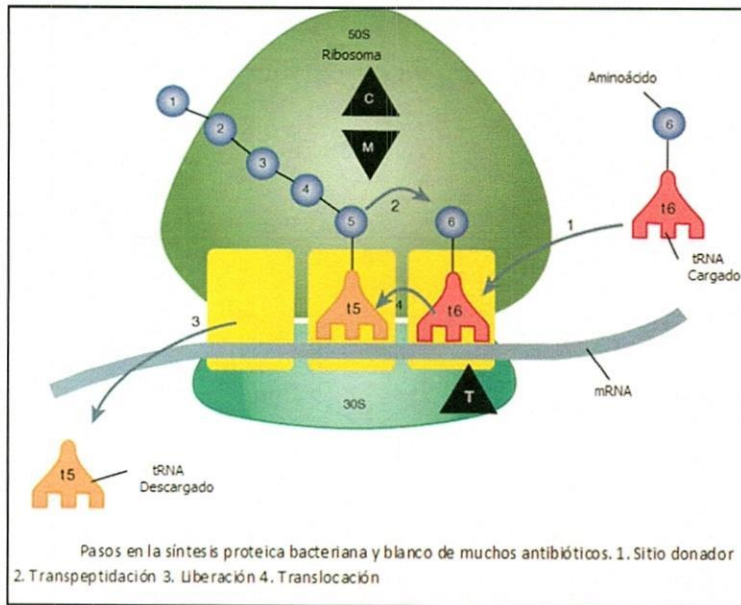


Figura 2. Esquematización del mecanismo de acción de las tetraciclinas

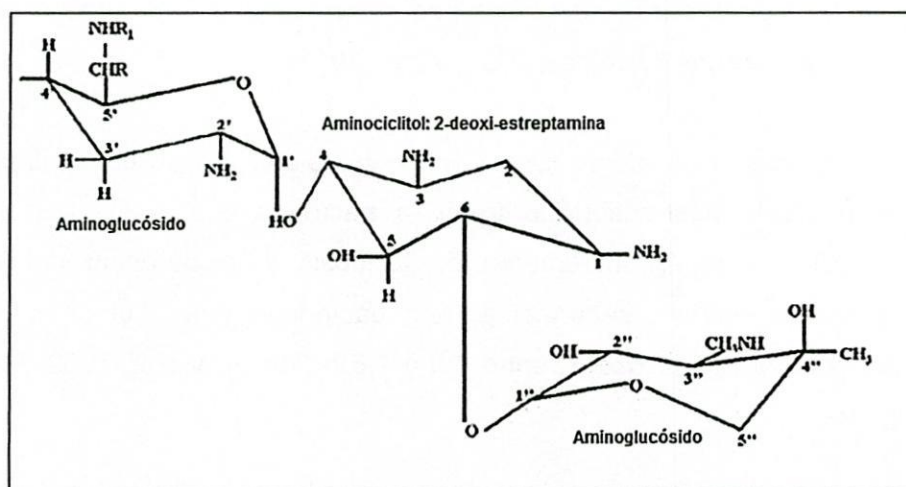
Fuente: <http://karlaliz27.blogspot.mx/>

La OTC es un antibiótico de amplio espectro, con acción antimicrobiana frente a microorganismos sensibles como: *Gonococos* y los géneros *Brucella*, *Shigella*, *Rickettsia*, *Mycoplasma* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia* y *Ureaplasma* (*U. urealyticum*). No actúa sobre bacterias del género *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Haemophilus*. *In vitro*, la principal acción de estos fármacos es bacteriostática, actuando sobre microorganismos que se encuentran en fase de multiplicación (Ghizlane, 2006; Aguilera y col., 2010).

Generalmente, las bacterias Gram (+) reaccionan a una menor concentración de tetraciclinas que las bacterias Gram (-), sin embargo, este grupo de fármacos rara vez está indicado en infecciones causadas por bacterias Gram (+), debido a la resistencia que han desarrollado (Ghizlane, 2006) ya que actualmente se encuentran disponibles en el mercado otros antibióticos con una mayor efectividad y selectividad para estos microorganismos.

## Características Físicoquímicas de Gentamicina

Los antibióticos aminoglucósidos son compuestos naturales obtenidos de actinomicetos del suelo o productos semisintéticos derivados de ellos. Poseen un anillo aminociclitol al que se unen diferentes azúcares (Fig. 3). Constituyen un grupo de agentes antibacterianos con propiedades importantes para el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente aquellas producidas por bacilos aeróbicos Gram (-) (Mella y col., 2004; Calvo y Martínez, 2009).



**Figura 3.** Estructura química de un aminoglucósido-aminociclitol

Fuente: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004000400007&scrit=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004000400007&scrit=sci_arttext)

Los aminoglucósidos-aminociclitolos están constituidos por la combinación de dos tipos de compuestos químicos: azúcares no aminados (glucósidos) o aminados (aminoglucósidos) y alcoholes cíclicos no aminados (ciclitolos) o aminados (aminociclitolos). La gentamicina está formada por un aminoglucósido y un aminociclitol. Por su carácter policationico, los antimicrobianos aminoglucósidos son muy solubles en agua, estables en el medio ambiente y presentan una absorción gastrointestinal menor a 1%.

La gentamicina, ha mostrado un incremento en la actividad antimicrobiana selectiva en un ambiente alcalino. Una posible explicación es que el pH alcalino compromete la

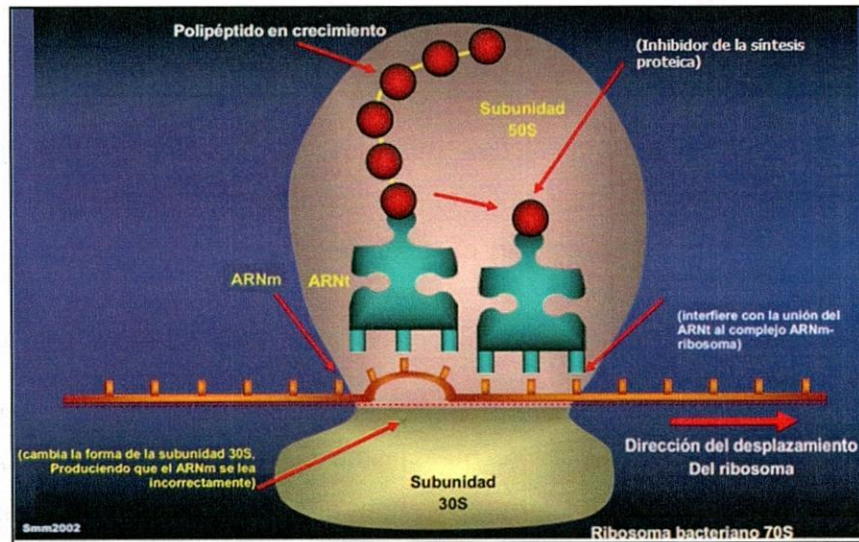
membrana bacteriana, facilitando la penetración del fármaco en la bacteria (Mella y col., 2004; Huth y col., 2011).

### **Mecanismo de Acción de Gentamicina**

Los aminoglucósidos actúan al unirse a los ribosomas bacterianos, bloqueando la acción del RNAm de manera irreversible. El fármaco se une a la subunidad ribosomal 30S y produce la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, ocasionando una lectura errónea del código RNAm, lo que produce la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. La unión de aminoglucosidos en este sitio perturba el reconocimiento y la selección del tRNA en la traducción y la interpretación errónea aumenta además de inhibir la translocación ribosomal. La perturbación de ambos traducción ribosómica y translocación en última instancia inhibe la síntesis de proteínas. (Huth y col., 2011).

Los aminoglucósidos tienen un efecto bactericida dependiente de su concentración y poseen un importante efecto post-antibiótico frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), existiendo una correlación entre el incremento de la dosis y la duración del efecto postantibiótico. Esto puede variar según el género bacteriano y en el caso de los aminoglucósidos, el efecto inhibitorio oscila entre 0.5 y 7.5 h (Molina y col., 2009; Calvo y Martínez, 2009) (Fig. 4).

Los aminoglucósidos muestran actividad bactericida frente a bacterias Gram (-) aeróbicas, incluyendo enterobacterias y bacilos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. La asociación de los aminoglucósidos con antimicrobianos que tienen acción sobre la pared bacteriana (penicilina, cefalosporinas, monobactam, carbapenems, glucopéptidos) le confieren una actividad sinérgica frente a diversos microorganismos, lo que les permite ser utilizados en el tratamiento de algunas infecciones ocasionadas por cocos Gram (+) (Molina y col., 2009).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de gentamicina

Fuente: <http://karlaliz27.blogspot.mx/>

### **Mecanismos Celulares Involucrados en el Desarrollo de Resistencia Bacteriana Contra Oxitetraciclina y Gentamicina**

Los antibióticos son sustancias capaces de reconocer sitios específicos de la estructura bacteriana y al unirse a ellos, producen la pérdida de la función correspondiente (Mendoza, 2011). Una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando éste causa un efecto inhibitorio en ella, generando la curación de la infección. Por el contrario, una bacteria es resistente a un fármaco, cuando su crecimiento no se ve afectado por las concentraciones alcanzadas del medicamento en el lugar de la infección (Daza, 1998).

La resistencia bacteriana representa un serio problema a nivel mundial, no sólo relacionado con su diagnóstico y descubrimiento temprano, sino también en cuanto a su manejo y control (Crespo, 2002). Este problema se ha incrementado debido al uso creciente de los antibióticos en todo el mundo, no solamente con propósitos terapéuticos para los humanos, sino también, por ser utilizados excesivamente en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan a los animales y como promotores de crecimiento (Mendoza, 2011).

Para que los antibióticos provoquen un efecto destructivo o inhibitorio en los microorganismos, deben atravesar la pared celular bacteriana y posteriormente, fijarse al sitio diana, es decir, sobre alguna de las estructuras o mecanismos bioquímicos que son



primordiales para la multiplicación o supervivencia bacteriana. Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y en ocasiones múltiples, pero todos ejercen su función en alguno de los siguientes puntos: a) impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, b) inhibiendo la síntesis de proteínas o la pared celular, c) alterando la membrana celular bacteriana (Daza, 1998; ).

Las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos mediante el desarrollo de mecanismos que impiden a éste ejercer su mecanismo de acción. El desarrollo de dicha resistencia se puede presentar de dos formas; a) natural o intrínseca y b) adquirida. La resistencia natural o intrínseca se define como aquella que es característica de todos los miembros de una especie o género dado, mientras que la adquirida se debe a la modificación del material genético de la bacteria (Daza, 1998; Santiago-Hernández, 2009). Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones en el ADN del cromosoma bacteriano o por el intercambio de material genético, mediante el transporte de genes de resistencia a través de diversos mecanismos como:

**Transducción.** Definida como un proceso mediante el cual el ADN es transferido desde una bacteria a otra, mediante la acción de un fago. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano, se denomina transducción generalizada, pero si sólo se encapsula una parte del genoma bacteriano y se conserva el genoma viral, se denomina transducción especializada (Cabrera y col., 2007).

**Conjugación.** Es definida como la transferencia de información genética, desde una célula donadora a otra receptora. En este proceso participan determinados tipos de plásmidos que portan un conjunto de genes que contienen la información genética que les confiere a las bacterias la resistencia a fármacos, antisépticos y desinfectantes. Éstos, plásmidos son transferidos de una bacteria a otra, a través del contacto directo entre ambas células si son bacterias Gram (+), o con la intervención de estructuras superficiales especializadas como son los "pilis" sexuales en el caso de las bacterias Gram (-) (Cabrera y col., 2007).

**Transformación.** Es el proceso en el cual se realiza la transferencia de genes contenidos en el ADN desnudo de una bacteria que fue lisada, a otra bacteria que los acepta e incorpora a su genoma (Cabrera y col., 2007).

**Transposición.** En este proceso intervienen elementos denominados transposones o elementos genéticos transponibles, los cuales son una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de la célula, a este fenómeno se le conoce como transposición. Esta fracción de ADN (transposones) puede contener genes de resistencia a distintos antibióticos (Cabrera y col., 2007).

Los mecanismos de resistencia adquirida son muchos y variados en función del antimicrobiano al que confieren resistencia, entre los principales están: El primero producción de enzimas que inactivan o modifican a un antimicrobiano. Entre las enzimas inactivantes se encuentran las B-lactamasas, las acetiltransferasas y las transferasas de grupos acetilo, adenilo y fosforilo. En las bacterias Gram (+) estas enzimas son plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las bacterias Gram (-), pueden ser de origen plasmídico, o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También, pueden ser enzimas modificantes de aminoglucósidos, que pueden inactivar otros antibióticos como cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos (Daza, 1998; Ausina, 2006).

El segundo mecanismo de resistencia, consiste en alteraciones en la penetración del antimicrobiano a través de las envolturas bacterianas, permeabilidad, bloqueo del mecanismo de entrada o bombeo activo del antimicrobiano. Estos mecanismos tienen en común que impiden al antibiótico llegar a la diana. Esto ocurre cuando las bacterias sufren mutaciones en las porinas de la pared celular, que impiden la entrada de algunos antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos, o bien, por la alteración de los sistemas de transporte de los aminoglucósidos en las bacterias anaerobias. También, existe un mecanismo de resistencia, el cual involucra la salida del antibiótico mediante la expulsión activa (bomba de eflujo), impidiendo que el antibiótico se acumule en cantidad suficiente dentro de la célula para llevar a cabo su acción (Daza, 1998; Ausina, 2006).

El tercer mecanismo de resistencia está relacionado con alteraciones en el sustrato o blanco de acción (diana) del antimicrobiano. Cuando se modifican los puntos diana de los antimicrobianos, el antibiótico no reconoce su sustrato, no se fija y, por lo tanto, no puede ejercer su acción. En este tipo de resistencia, se incluyen las alteraciones a nivel de la

enzima ADN girasa, generando resistencia a las quinolonas, alteración del RNAr 23S que ocasiona resistencia a los macrólidos y cambios en las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina), necesarias para la formación de la pared celular, causando resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (Daza, 1998; Ausina, 2006).

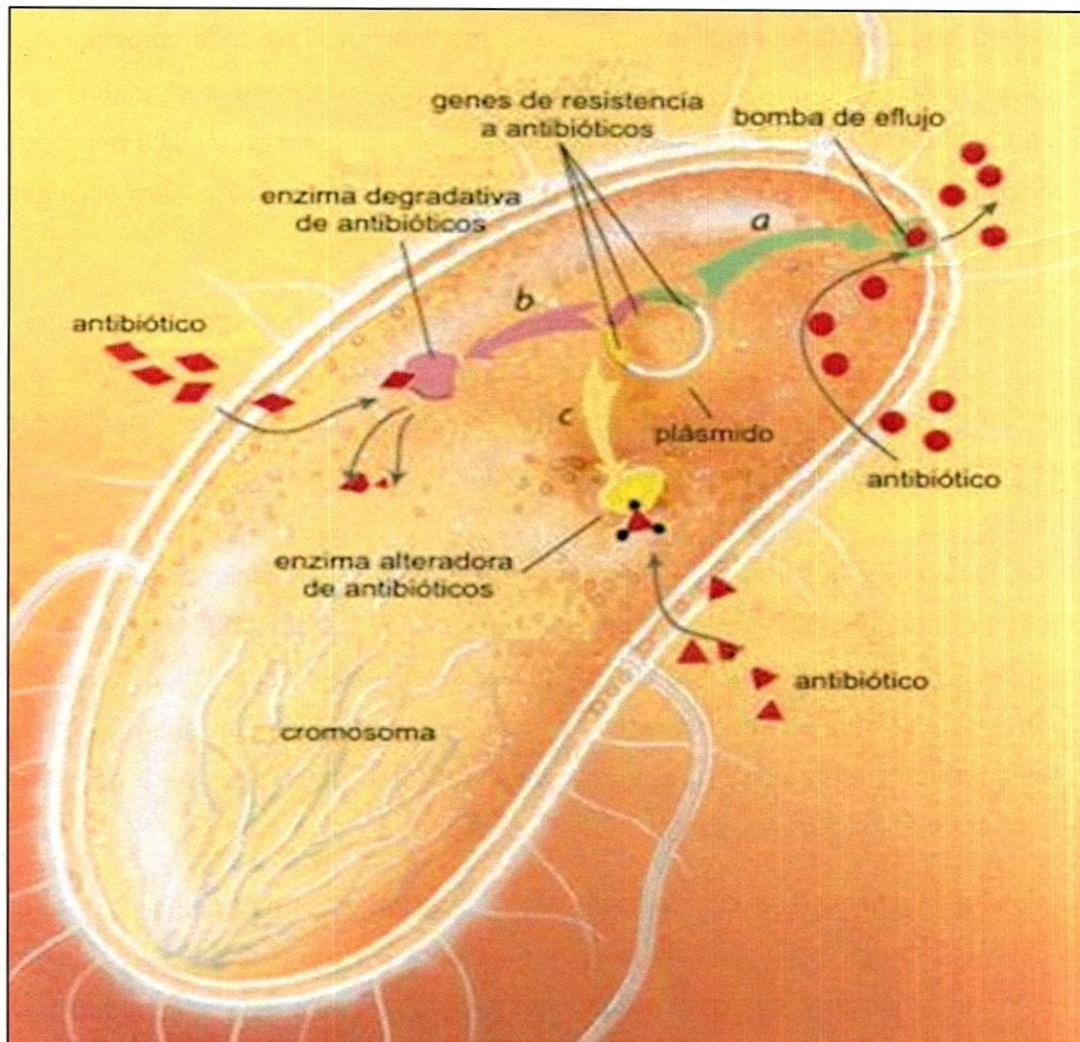
Por último, se describen las resistencias debidas a la hiperproducción de una enzima determinada que, aunque está presente en todas las cepas de una especie determinada, solo algunas de ellas pueden adquirir la capacidad de hiperproducirla o la inducción por parte de un antimicrobiano, o incluso de otras sustancias sin actividad antimicrobiana, de la expresión de uno o varios genes que comportarían la resistencia a uno o varios antimicrobianos. También están los efectos de poblaciones, como la producción de biofilms por parte del microorganismo, que dificultan la difusión del antimicrobiano, o una elevada concentración de microorganismos productores de una enzima inactivante que conlleva un incremento de la concentración de la enzima alrededor de las células y, por consiguiente, resistencia (Ausina, 2006).

Es importante señalar, que una misma bacteria puede desarrollar diversos mecanismos de resistencia frente a uno o más antibióticos. Del mismo modo, un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos en diferentes especies bacterianas, por ello, es importante continuar investigando sobre nuevos mecanismos de resistencia bacteriana para los distintos antimicrobianos (Daza, 1998).

**Aminoglucósidos.** La inactivación enzimática mediada por plásmidos, representa el principal mecanismo de resistencia en *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, Estafilococos y Enterococos, pero existen otros mecanismos de resistencia ocasionados por alteraciones en la permeabilidad de la membrana y/o mutaciones cromosómicas. Existen tres tipos de enzimas inactivantes de aminoglucósidos: acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosforilasas. Las enzimas inactivantes se subclasifican en función del grupo hidroxilo o amino que modifiquen. Las bacterias anaerobias son resistentes de forma natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos (García y García, 1997; Ausina, 2006).

**Tetraciclinas.** Aun cuando existe resistencia bacteriana generada por una modificación enzimática codificada por transposones, el mecanismo de resistencia más importante en las enterobacterias, bacterias Gram (+) y algunas bacterias Gram (-) como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Campylobacter* y *Bacteroides*, es mediante la expulsión activa. Este

mecanismo de resistencia se lleva a cabo mediante la producción de proteínas citoplásmicas, que impiden la unión de la molécula al ribosoma. En general, la resistencia es cruzada para todas las tetraciclinas, es decir un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de resistencia en diversas especies bacterianas (García y García, 1997) (Fig. 5).



**Figura 5.** Esquematación de los distintos mecanismos de resistencia bacteriana

Fuente: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>

### Ventajas y Desventajas de la Administración de Fármacos Libres

## Ventajas y Desventajas de la Administración de Fármacos Libres

La vía de administración de los fármacos es determinante para la eficacia de un tratamiento. Por cuestiones de manejo y de economía, la vía oral es la más utilizada en la camaronicultura para la administración de terapias antimicrobianas a través del alimento. Sin embargo, se ha documentado ampliamente que la medicación vía el alimento, puede ser inefectiva si el antibiótico no está conformado por moléculas estables o con recubrimientos especiales que no disminuyan su eficacia cuando éste sea expuesto en medios acuáticos a una alta concentración de minerales, al calor o la luz (Anónimo, 1997; Auró y Ocampo, 2006)

Actualmente, existe una gran variedad de medios para la administración de antibióticos a camarones de cultivo, los cuales son seleccionados de acuerdo a los requerimientos de cada sistema de cultivo, tomando en cuenta sus beneficios. Dentro de los principales métodos de administración de antimicrobianos se encuentran:

- 1.- Los baños, los cuales se caracterizan por ser simples, de fácil aplicación y baja inversión. Son empleados generalmente para la eliminación o reducción de bacterias presentes en el agua. El principal inconveniente es que una cantidad considerable del antibiótico, se pierde por lixiviación o quelación al unirse con algunos compuestos presentes en el agua de mar o salobre, ocasionando que se utilice una mayor cantidad del antibiótico, para asegurar la eficiencia del tratamiento (Auró y Ocampo, 2006).
- 2.- La administración parenteral de medicamentos, es el método más selectivo y directo cuando se lleva a cabo la evaluación de nuevos antibióticos, su aplicación está dirigida a estudiar la farmacocinética y biodisponibilidad del antibiótico a probar. La cantidad y el tamaño de los organismos en los cuales se va a realizar la evaluación son factores limitantes, incluso cuando se trabaja con un número pequeño de organismos, el estrés provocado por la captura y punción, puede ser una limitante en el uso de esta técnica (Auró y Ocampo, 2006).
- 3.- La administración oral es reconocida como la técnica más práctica para la aplicación de terapias a organismos acuáticos, empleando dietas medicadas. Este método permite suministrar el fármaco en grandes poblaciones, sin realizar modificaciones mayores en las

condiciones de cultivo. La desventaja de este procedimiento es que al administrar el medicamento, no todos los organismos consumen la misma cantidad, provocando que los organismos enfermos y más débiles no ingieran la dosis necesaria, mientras que los organismos sanos y más aptos, consumen una mayor cantidad pudiendo morir por intoxicación (Auró y Ocampo, 2006).

Otra desventaja de utilizar la vía oral para la administración de fármacos en la acuicultura, se debe a que durante la alimentación, el antibiótico al ser hidrosoluble, se lixivia del perdigón de alimento y no está completamente disponible para los organismos. Algunos factores como salinidad, temperatura, intensidad de luz, formación de complejos o quelación pueden afectar la concentración del fármaco en el alimento (Anónimo, 1997; Auró y Ocampo., 2006).

### **Alternativas para la Administración de Fármacos en humanos**

La administración de algunos fármacos de forma convencional en humanos, es impredecible e ineficaz y frecuentemente son necesarias dosis altas del medicamento, para asegurar que el agente farmacológico llegue finalmente al sitio de acción. Es importante resaltar que el efecto terapéutico se logra no solamente por la administración del fármaco, sino por el tiempo que se mantiene la concentración adecuada en el sitio de la infección (Edlund y Albertsson, 2002).

Los sistemas tradicionales de administración de fármacos, que generalmente son por medio de tabletas o inyecciones parenterales, pueden provocar que los medicamentos alcancen concentraciones plasmáticas altas, generando toxicidad, e induciendo reacciones adversas. Por otro lado, los fármacos que poseen un corto tiempo de vida media, requieren de administraciones consecutivas, con el riesgo de generar fluctuaciones en la concentración del fármaco en el organismo y la incomodidad para el paciente (Edlund y Albertsson, 2002).

Los sistemas controlados de administración de fármacos, pueden ser muy útiles para optimizar los efectos de la farmacoterapia. Cada fármaco tiene un intervalo llamado "Concentración Mínima Efectiva", niveles por debajo de ésta, no producen efectos terapéuticos y una "Concentración Mínima Tóxica", que se refiere a los niveles por arriba

de esta concentración, que pueden provocar un efecto secundario tóxico no deseado. El valor medio es llamado "Margen Terapéutico", o "Ventana Terapéutica", y dependiendo del tipo de fármaco, esta ventana puede ser bastante estrecha (Siepmann y Siepmann, 2006).

Para optimizar los efectos terapéuticos de un tratamiento médico, es importante mantener la concentración del fármaco dentro del intervalo adecuado, durante períodos prolongados. Para mantener y controlar el perfil adecuado Concentración-Tiempo del medicamento en el sitio de acción, los sistemas controlados de administración de fármacos pueden ser una buena opción (Siepmann y Siepmann, 2006).

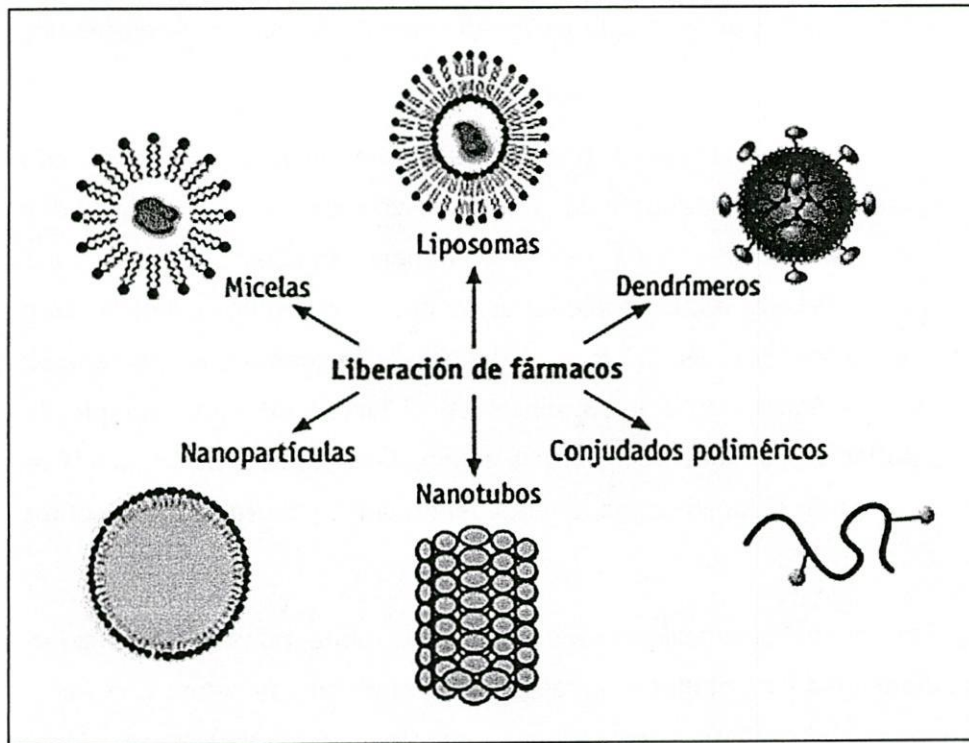
Los sistemas controlados se basan en la incorporación del fármaco alrededor o dentro de una matriz, frecuentemente son utilizados polímeros, los cuales controlan la tasa de liberación del antibiótico. Algunos procesos, como la difusión, la erosión y/o hinchazón pueden estar involucrados en la tasa de liberación del fármaco, resultando en un amplio espectro de patrones de liberación posibles. Por ejemplo, se puede generar un suministro continuo del medicamento, compensando la eliminación del agente activo fuera del cuerpo humano, logrando mantener la concentración del fármaco constante en el sitio de acción por un mayor tiempo (Siepmann y Siepmann, 2006).

Dentro de los sistemas de dosificación de fármacos con liberación controlada se pueden emplear como vehículos los siguientes polímeros:

**Dendrímeros.** Son polímeros nanométricos que se construyen con múltiples ramificaciones. Su superficie cuenta con numerosas cadenas terminales que pueden ser diseñadas para formar diversas interacciones químicas. También, algunos dendrímeros están estructurados para tener cavidades interiores en las cuales se pueden colocar algunas moléculas, que sirven para unirse específicamente a receptores precisos y liberar medicamento en una región determinada (Calderón y col., 2010).

**Liposomas.** Son pequeños vehículos con un centro acuoso incluido en una capa doble de fosfolípidos uni o multilaminares. Se han aplicado experimentalmente para la entrega de medicamentos antineoplásicos y en compuestos que actúan como factores de crecimiento (Calderón y col., 2010).

**Micropartículas y nanopartículas poliméricas.** Son estructuras circulares sólidas, fabricadas de polímeros naturales o artificiales, los cuales son biodegradables. En estas estructuras, los medicamentos pueden ser absorbidos, disueltos, encapsulados y/o unidos por enlaces covalentes a la partícula (Fig. 6.) (Calderón y col., 2010)



**Figura 6.** Distintos sistemas de liberación controlada de fármacos

Fuente: [http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt5\\_nanomedicina.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt5_nanomedicina.pdf)

### **Materiales Poliméricos Empleados en los Sistemas de Liberación Controlada**

En la mayoría de los sistemas de liberación controlada, el fármaco, pesticida o cualquier otro agente biológico, se introduce en el interior de lo que se denomina transportador, siendo éste



generalmente un material polimérico. La velocidad de liberación de la sustancia deseada está prácticamente controlada por las propiedades del polímero, aunque existen otros factores de menor influencia como el pH del medio de liberación. Una vez conocidos estos factores, es posible establecer sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos (Sáez y col., 2004).

Para que la sustancia de interés se libere y llegue al lugar deseado, primeramente se debe producir la difusión de ésta, desde su transportador hacia el medio que la rodea y a partir de ahí, alcanzar concentraciones que le permitan ejercer su actividad terapéutica (Sáez y col., 2004).

Aún cuando el número de polímeros biodegradables es diverso, solamente una pequeña cantidad de éstos es adecuada para la administración de fármacos (Edlund y Albertsson, 2002). Los polímeros biodegradables deben también poseer una biocompatibilidad, la cual se refiere a las propiedades específicas de un material para no generar efectos dañinos o tóxicos en los sistemas biológicos. Los materiales no biocompatibles pueden ocasionar daños irreversibles en el hospedero, por ejemplo, la destrucción permanente de los tejidos, necrosis, fibrosis significativa y calcificación distrófica (Mansour y col., 2010). Los sistemas poliméricos ideales deben ser biodegradables y contar con una alta biocompatibilidad.

Además, un polímero ideal para aplicaciones biomédicas, debe poseer la capacidad de resistir procesos de esterilidad y mantener la estabilidad en el almacenamiento (Edlund y Albertsson, 2002; Mansour y col., 2010). Los polímeros empleados principalmente en el suministro de medicamentos pueden ser tanto de origen natural como sintético. El primer grupo incluye los polisacáridos (dextranos o celulosa), quitina, quitosano y las proteínas (colágeno, fibrina, gelatina y albúmina) (Edlund y Albertsson, 2002). Entre éstos, la albúmina ha sido utilizada para la síntesis de micropartículas con fines terapéuticos, debido a que es una proteína versátil y relativamente fácil de obtener (Mathew, y col., 2006).

## Albúmina como Transportador de Fármacos

Kramer (1974) sugirió por primera vez el uso de microesferas (ME) de albúmina para la administración de fármacos, utilizándolas como un polímero de transporte para la entrega controlada del fármaco en un objetivo específico. Dentro de las consideraciones farmacéuticas para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos basados en albúmina se encuentran: 1) la pureza del polímero de albúmina, 2) la incorporación del medicamento, 3) la liberación del fármaco (*in vitro* e *in vivo*), 4) la estabilidad del fármaco, 5) la estabilidad de las ME (*in vitro* e *in vivo*), 6) las propiedades de superficie favorables, 7) la antigenicidad, 8) la adsorción de las proteínas plasmáticas, 9) el destino y transporte de toxicidad, la biocinética de la droga y el vehículo (Patil, 2003).

Las ME de albúmina son partículas biodegradables que se pueden producir en un intervalo de tamaño de 1 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, mediante la solidificación térmica o química de una emulsión de albúmina en una fase orgánica. La albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada para la preparación de ME (Mathew y col., 2007). Éstas se metabolizan en el cuerpo, influyendo para ello principalmente factores como el tamaño de las partículas, el grado de estabilización y el sitio de asimilación. La liberación del fármaco desde las ME de albúmina, puede ser controlado tomando en cuenta el alcance y la naturaleza del entrecruzamiento, el tamaño y el nivel de incorporación del medicamento en las ME (Mathew y col., 2007).

Las ME con tamaño de 0.1-1,000  $\mu\text{m}$  son ampliamente utilizadas para la liberación sostenida de agentes terapéuticos y como portadores de fármacos, en sitios específicos de entrega. Además, pueden influir en el lanzamiento de drogas en un sitio remoto (Patil, 2003). La tecnología de la microencapsulación, el envasado de líquidos y sólidos en partículas esféricas de tamaño micrométrico, surgió a mediados de los años 50's. Desde entonces se han utilizado en diversas aplicaciones, incluyendo los productos gráficos, óptica, productos químicos agrícolas, adhesivos, perfumes y aromas (Edlund y Albertsson, 2002).

## Aplicación de Antibióticos con Liberación Controlada

El interés de encapsular sustancias para la formulación de los dispositivos de entrega de medicamentos se ha incrementado en la última década. Al utilizar ME inyectables, no hay necesidad de una inserción de implantes de agotamiento. También, la suspensión en un vehículo adecuado o agente espesante, como una solución de metilcelulosa, puede favorecer la consistencia de la formulación, regulando su administración. Las ME bioadhesivas tienen un potencial en los sistemas de administración por vía oral (Edlund y Albertsson, 2002), logrando así, la localización del sistema medicamentoso en una región determinada del organismo, superando parcialmente los procesos naturales de eliminación local y/o evacuación de las cavidades. Estos sistemas, incrementan el tiempo de permanencia del medicamento en dicha región, mediante la disminución de la velocidad de tránsito, lográndose un mayor tiempo de efectividad del fármaco, lo que permite formular sistemas de liberación prolongada o controlada de sustancias activas (Rodríguez y col., 2000).

Las terapias con antibióticos empleando un sistema controlado, disminuyen la carga bacteriana en el sitio de la infección, minimizando la toxicidad renal, hepática y sistémica. Estos sistemas de liberación controlada de fármacos, ofrecen la ventaja de mantener una concentración elevada del medicamento en el sitio específico de acción, durante un período prolongado. Algunos de los antibióticos que han sido incorporados en los sistemas de liberación controlada son: clorhexidina, vancomicina, anfotericina B, gentamicina y doxiciclina (Mansour y col., 2010).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados en este estudio fueron de alta pureza, procedentes de la casa comercial Sigma-Aldrich, Co., salvo que se indique otro proveedor..

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pozos estériles con tapa de baja evaporación (Corning®CellBIND®Surface); un lector de microplacas (Zenyth Anthos, MOD:340st, Alcobendas, Madrid, España); micropipetas (FINPIPETTE®) de distintos volúmenes con puntas de plástico estériles; una Incubadora (RIOSSA, Mod.EC) a una temperatura de 37°C; tubos de ensayo con medidas de 13x100 mm, placas Petri desechables estériles, medios de cultivo Caldo Soya Trypticase (CST) y Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS); estándares de alta pureza de los antibióticos oxitetraciclina y gentamicina, sensidiscos comerciales BD BBL (Dekton Dickinson Co.) de los antibióticos oxitetraciclina, doxiciclina, cloranfenicol, gentamicina y sulfametoxazol. Se utilizó una cepa bacteriana tipificada de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653, donada por el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

Las microesferas (ME) de albúmina conteniendo los antibióticos de forma independiente fueron preparadas, caracterizadas y proporcionadas por el Laboratorio de Proteínas del CIAD, para su utilización en esta investigación. Las ME fueron preparadas siguiendo la metodología establecida por Mathew y col. (2006), estas presentaron una eficiencia de encapsulación del 74.5% para OTC y 92.8% para gentamicina, con un porcentaje de rendimiento de 94 y 96% respectivamente. Las ME fueron preparadas por el c. a Dr. José Andreí Sarabia Sainz y forman parte de su tesis doctoral.

### **Solución Amortiguadora Salina de Fosfatos (PBS)**

Esta solución se preparó suspendiendo 84 g de fosfato de sodio Monobásico en 1 L de agua destilada, se agitó hasta su total disolución y se esterilizó. Los medios de cultivo TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) y CST (Caldo Soya Trypticase) se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## Conservación de las Cepas Bacterianas

La conservación de la cepa bacteriana de *V. mimicus* ATCC 33653 se llevó a cabo colocando las bacterias en criotubos con glicerol como agente crioprotector, a una concentración de 15% y se almacenaron a una temperatura de -40°C.

## Pruebas de Sensibilidad con Sensidiscos

### Preparación de Diluciones

La cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 se sembró en una placa de agar TCBS por la técnica de estría en superficie, dejando incubar durante 18-24 h a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron cuatro a cinco colonias bacterianas, con la misma morfología, las cuales fueron transferidas a un tubo de 13x100 mm, conteniendo 5 mL de CST. Se incubó el caldo a 35-37°C durante 24 h, hasta obtener una turbidez igual al estándar de McFarland de 0.5 (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se ajustó la concentración bacteriana empleando solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) estéril o caldo soya tripticasa CST hasta alcanzar la concentración deseada (Alderman y col., 2001).

Una vez obtenida la suspensión bacteriana, se sumergió un hisopo estéril, rotando éste varias veces y presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Posteriormente, se sembró la superficie de la placa de agar TCBS, estriando con el hisopo en tres direcciones asegurando una distribución uniforme de bacterias. Antes de colocar los discos se dejó secar la superficie de la placa durante 3 a 5 min en un ambiente estéril, hasta que se absorbió cualquier exceso del inóculo (Alderman y col., 2001).

Se colocaron los discos con el antibiótico sobre la superficie del agar TCBS utilizando unas pinzas de disección estériles, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar inoculado. Los discos se distribuyeron uniformemente en la caja Petri, manteniendo una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de seis discos en una placa de 100 mm de diámetro interno, esto con la finalidad de evitar la superposición de las zonas de inhibición (Alderman y col., 2001).

Los antibióticos contenidos en los sensidiscos utilizados fueron: oxitetraciclina, doxiciclina, y cloranfenicol a una concentración de 30 µg, sulfametoxazol con 23.75 µg y gentamicina con 10 µg. Las cajas Petri con los sensidiscos fueron incubadas en posición invertida, a 35°C dentro de los 15 min posteriores a la aplicación de los discos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 h), se examinó cada una de las cajas Petri y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. La lectura del antibiograma se realizó tomando en cuenta los milímetros de inhibición formados por cada antibiótico, clasificando su efecto como sensible, intermedio y resistente (Tabla 1), según la tabla de referencia establecida por el Comité Nacional de Laboratorios Clínicos Estándar (NCCLS, por sus siglas en inglés, NCCLS, 2003).

**Tabla 1.** Interpretación de acuerdo a los halos de inhibición para considerar los resultados en pruebas de susceptibilidad a antibióticos

		<b>Halo de inhibición</b>		
<b>Agente Antimicrobiano</b>	<b>Cantidad µg</b>	<b>Resistente (mm)</b>	<b>Intermedio (mm)</b>	<b>Sensible (mm)</b>
<b>Cloranfenicol</b>	30	12	13-17	18
<b>Doxiciclina</b>	30	12	13-15	16
<b>Gentamicina</b>	10	12	13-14	15
<b>Oxitetraciclina</b>	30	10	11-18	19
<b>Sulfametoxazol /Trimetoprim</b>	23.75/1.25	10	11-15	16

(NCCLS, 2003)

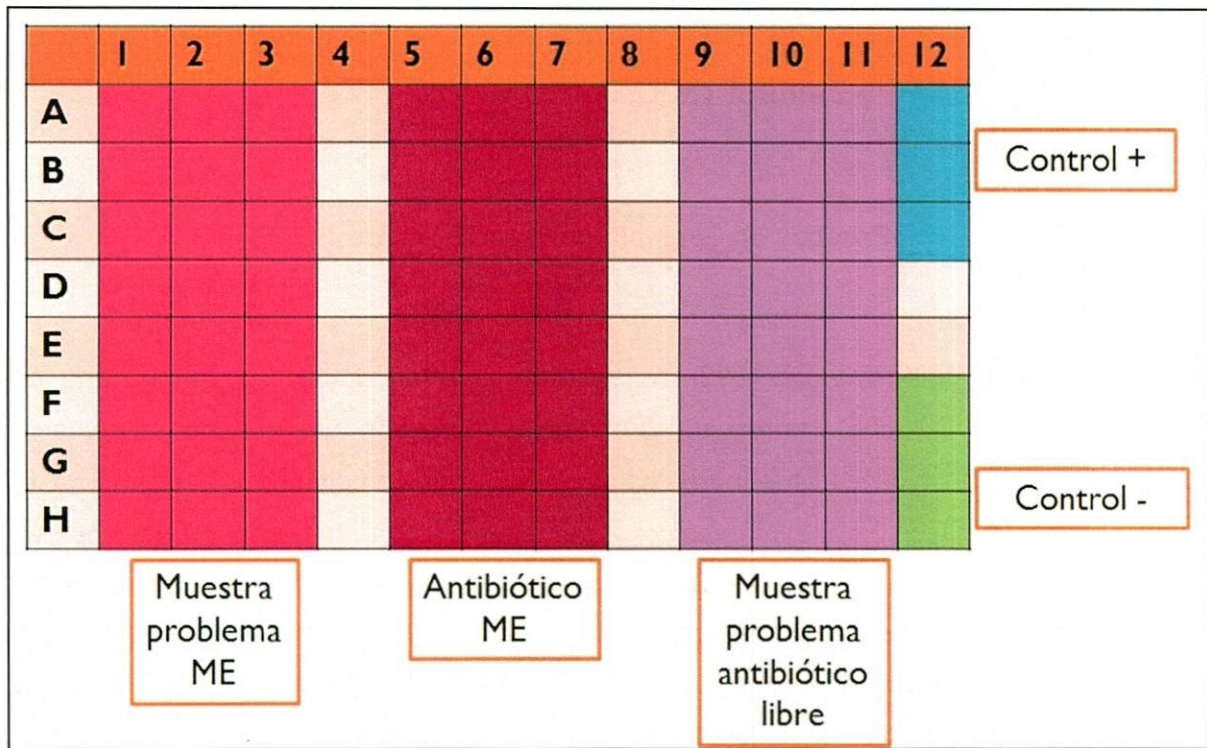
## Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución

Utilizando la técnica de dilución en tubo, se realizaron diluciones del antibiótico oxitetraciclina (OTC) en tubos con 4 mL de CST estéril, partiendo de un estándar de 1500 µg/mL, el cual se preparó pesando 0.0015 g de un estándar puro de OTC (Sigma, Co.) y se diluyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico. A partir de esta solución estándar, se prepararon las diluciones hasta obtener concentraciones finales del antibiótico de 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 y 0.031 µg/mL. (Alderman y col., 2001)







Posteriormente, se realizó una dilución de las ME de albúmina que contenían 12% de OTC utilizando CST, hasta obtener concentraciones de 33.33, 16.66, 8.33, 4.16, 2.08, 1.04, 0.52 y 0.26 µg/mL del antibiótico. Todas las diluciones se dejaron reposar durante 2 h a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar (Alderman y col., 2001 con modificaciones).

De igual manera, se prepararon diluciones del antibiótico gentamicina en tubos con CST estéril, partiendo de un estándar de 1300 µg/mL, hasta obtener concentraciones de 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µg/mL. Las microesferas de albúmina con gentamicina al 15% tuvieron una concentración del antibiótico de 26.66, 13.33, 6.66, 3.33, 1.66, 0.83, 0.41 y 0.20 µg/mL, las cuales se dejaron reposar durante 2 h a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar.

En cada uno de los pozos de la microplaca de poliestireno, fueron colocados bajo condiciones estériles 250 µL de CST con el antibiótico + 2 µL del cultivo bacteriano y 250 µL de cada una de las diluciones preparadas en CST, con las ME de albúmina que contenían el antibiótico. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones del antibiótico. Además, fueron incluidos en la misma microplaca, una hilera de pozos con 250 µL de CST más el antibiótico como control, así como un control (-) que correspondió al medio de cultivo estéril sin inóculo y un control (+) que consistió en el medio de cultivo inoculado con la cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653, para comprobar la viabilidad de la bacteria. Posteriormente, se colocó la tapa en la microplaca. Éstas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, realizando la lectura de absorbancia en un lector de ELISA, cada hora por 24 h, para posteriormente llevar a cabo el análisis de los datos. La figura 7 muestra esquemáticamente la forma en que se colocaron las muestras y los controles en las microplacas de 96 pozos (Alderman y col., modificado).



**Figura 7.** Distribución de las muestras con el antibiótico encapsulado o libre en microplacas de poliestireno para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del antibiótico.

-  250  $\mu$ L de CST + \*ME de albúmina con antibiótico (distintas concentraciones) + 2  $\mu$ L del cultivo bacteriano.
  -  250  $\mu$ L de CST + \*ME de albúmina con antibiótico (distintas concentraciones).
  -  250  $\mu$ L de CST + antibiótico libre + 2  $\mu$ L del cultivo bacteriano
  -  (+) 250  $\mu$ L de CST + 2  $\mu$ L del cultivo bacteriano
  -  (-) 250  $\mu$ L del medio de cultivo CST
  -  Hilera de pozos vacía
- \* ME : microesferas



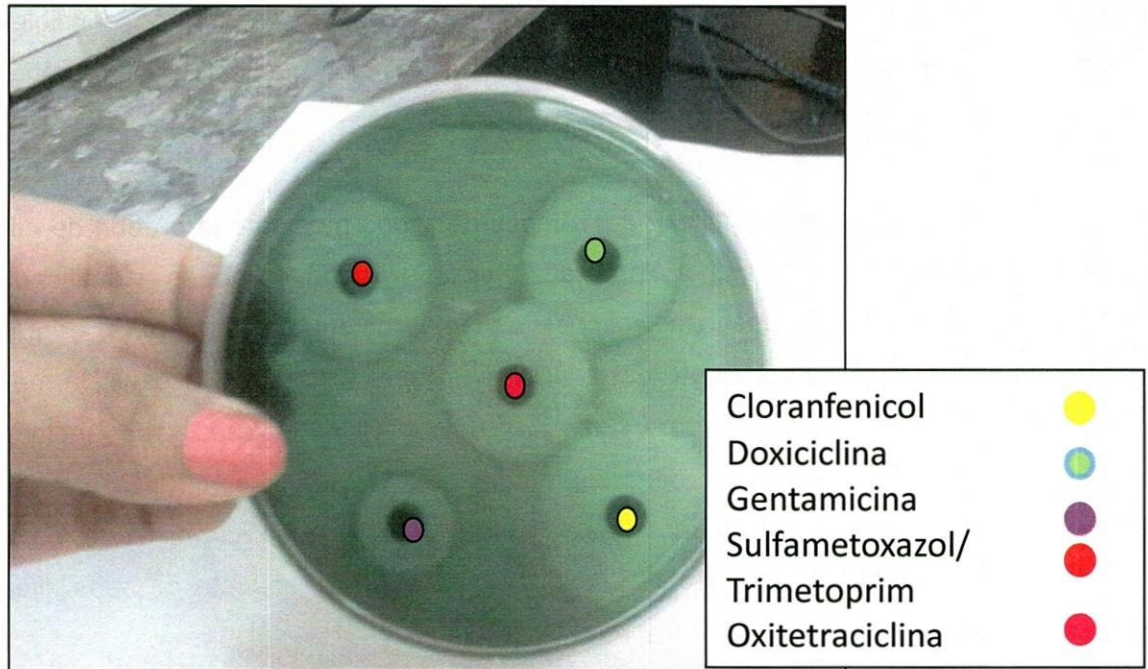
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos

Mediante el método de Kirby y col (1996), se probaron distintos antibióticos, en la cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653. Los resultados obtenidos mostraron que al poner en contacto la bacteria con los antibióticos se formaron halos de inhibición con diámetros desde 15 hasta 30 mm, siendo el mayor para cloranfenicol y el menor para gentamicina. No se observó resistencia bacteriana para ninguno de los antibióticos probados, ya que los halos de inhibición formados fueron mayores a los intervalos estándar reportados por el NCCLS (2003) para la interpretación del antibiograma (Tabla 2), lo cual permitió clasificar a la cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 como sensible a estos antibióticos (Fig. 8).

**Tabla 2.** Sensibilidad de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653 a los distintos antibióticos

Agente Antimicrobiano	Resultados (mm)	Interpretación NCCLS (mm)
Cloranfenicol	30	Sensible <18
Doxiciclina	24	Sensible <16
Gentamicina	15	Sensible <15
Oxitetraciclina	23	Sensible <19
Sulfametoxazol /Trimetoprim	28	Sensible <16



**Figura 8.** Antibiograma de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653

Una de las causas de variabilidad en la sensibilidad a los antibióticos que muestran las bacterias del género *Vibrio* es debida a un historial en el uso de estos compuestos en la producción acuícola, afectando también al medio ambiente las descargas de agua que contienen residuos de antibióticos provenientes de esta industria. La frecuencia, las cantidades y el modo de aplicación de los antibióticos influyen en la residualidad de estos fármacos, alterando las comunidades microbianas (Le y col., 2005; Tendencia y De la Peña, 2001) las cuales desarrollan mecanismos de resistencia que les permiten una adaptación al medio que las rodea (Tang y Moxon, 2001; Daza, 1998).

Rocha (2011) reportó el aislamiento de 70 cepas de *Vibrio* spp. de esteros, de las cuales 32 cepas fueron identificadas como *V. mimicus*, mostrando todas ellas sensibilidad a los antibióticos gentamicina y sulfametoxazol/trimetoprim. También se encontró que el 1.4% de las cepas presentaron resistencia a cloranfenicol, 11.4% a oxitetraciclina y 8.6% a tetraciclina. Por su parte, Bravo y col. (2004) probaron la sensibilidad de 50 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 a los antibióticos cloranfenicol, tetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim, reportando que el 99% de ellas fueron sensibles a tetraciclina, el 98% a cloranfenicol y un 92% a sulfametoxazol /trimetoprim. En otro estudio realizado por Junco y col. (2006), en el cual se aislaron 65 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 de agua de distintas fuentes,

observaron que más del 67.7% de las cepas analizadas resultaron sensibles a los aminoglucósidos, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, nitrofurantoína y sulfametoxazol-trimetoprim.

Davis y col. (1981) analizaron 51 cepas de *Vibrio* mediante la prueba de difusión en disco, de las cuales 23 correspondieron a *V. mimicus*, siendo algunas identificadas en la colección ATCC 33653. Los antibióticos que probaron fueron tetraciclina, gentamicina y cloranfenicol, observando que todas las cepas fueron sensibles a estos fármacos. Los resultados obtenidos en la cepa *V. mimicus* 602 ATCC 33653 utilizada en la presente investigación fueron similares a los reportados por Davis y col. (1981). La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema grave dentro de la camaronicultura, pero en este caso *V. mimicus* 602 ATCC 33653, mostró una buena respuesta de sensibilidad a los antibióticos oxitetraciclina y gentamicina.

#### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los Antibióticos Oxitetraciclina y Gentamicina**

En la cinética de crecimiento realizada para *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653 se probaron dos distintos antibióticos (oxitetraciclina y gentamicina), ambos en forma libre y encapsulada. Se utilizó una escala de colores y símbolos para representar las distintas concentraciones del antibiótico probadas (encapsuladas o libres).

#### **Cinética de Crecimiento Bacteriano Empleando Oxitetraciclina Libre y Encapsulada**

La Figura 9 muestra el crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 a las distintas concentraciones de OTC. Se observó que su comportamiento fue dependiente de la concentración, tanto en la forma libre del antibiótico como del encapsulado en las ME de albúmina. Se puede apreciar en la Fig. 9 A y B una curva identificada en color naranja, que representa el crecimiento total que presentó *V. mimicus* 602 ATCC 33653 sin antibiótico (control +). También, se aprecia en estas mismas gráficas, tres curvas de crecimiento que corresponden a las distintas concentraciones del fármaco (verde 0.125 µg/mL, rosa 0.25

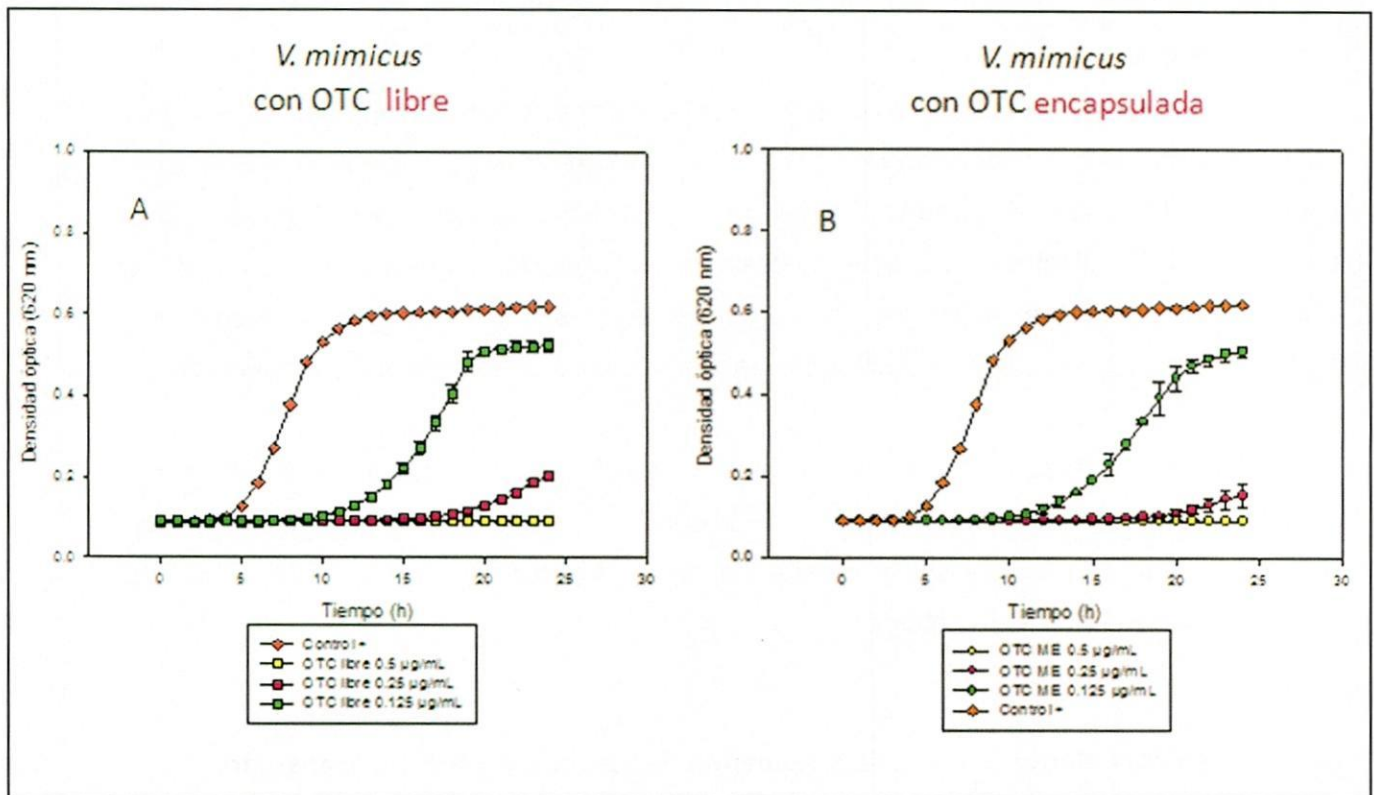


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653

(A) OTC libre y (B) OTC encapsulada.

µg/mL y amarillo 0.5 µg/mL), tanto de antibiótico libre como del encapsulado. Se observó un crecimiento bacteriano inversamente proporcional a la concentración del fármaco.

Se obtuvo una Concentración Mínima Inhibitoria de 0.5 µg/mL (curva de crecimiento amarilla) en las dos formas del antibiótico (libre y encapsulado) sobre *V. mimicus* 602 ATCC 33653, ambas formas de exposición (libre o encapsulada) mostraron un comportamiento similar. Observándose que a dicha concentración no hubo desarrollo bacteriano. A partir de la concentración de 0.25 µg/mL de OTC (curvas de color rosa), en ambas presentaciones del antibiótico se observó una disminución en el crecimiento de la bacteria, siendo hasta las 18 h de incubación cuando inició el crecimiento bacteriano en el fármaco libre y para la OTC encapsulada el crecimiento bacteriano inició después de 20 h de incubación. Es decir hubo un retraso de 2h en el crecimiento con el encapsulado.

En la curva identificada de color verde (0.125 µg/mL) se pudo observar un crecimiento exponencial de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 iniciando a las 11 h para ambas formas del fármaco. La fase estacionaria se alcanzó a las 20 h de incubación, mostrando un

patrón de crecimiento menor al control (+). Apreciándose en las dos formas del antibiótico un efecto similar.

En los experimentos con OTC encapsulada se observó un crecimiento más lento y no se alcanzó la fase estacionaria. El retraso en el crecimiento bacteriano puede estar asociado a la liberación pausada del fármaco de la ME. Además se comprobó que el antibiótico no fue afectado durante el proceso de encapsulación, puesto que permaneció su actividad antimicrobiana, ya que se obtuvieron resultados similares entre el fármaco libre y el encapsulado, y en algunos puntos de la gráfica se puede apreciar un mejor efecto inhibitorio de la OTC encapsulada.

Es importante resaltar que OTC sigue siendo el antibiótico mayormente empleado, en el tratamiento de las infecciones bacterianas que se presentan en los sistemas de cultivo acuícolas, aun cuando se sigue reportando en la literatura científica el desarrollo de bacterias resistentes a este antibiótico.

### **Cinética de Crecimiento Bacteriano Empleando Gentamicina Libre y Encapsulada**

Al igual que para OTC, se realizaron pruebas para gentamicina, este antibiótico fue propuesto en esta investigación como una alternativa para el control de infecciones bacterianas provocadas por *Vibrio*. Se llevó a cabo la cinética de crecimiento con *V. mimicus* 602 ATCC 33653, con las dos presentaciones del fármaco (libre y encapsulado). La Fig. 10 muestra el crecimiento total obtenido de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 sin antibiótico (curva de color naranja), observándose una curva típica del desarrollo bacteriano. Se probaron tres distintas concentraciones de gentamicina (8, 4 y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en las dos formas del fármaco, obteniendo como resultado que *V. mimicus* 602 ATCC 33653 fue inhibido a una concentración de gentamicina de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentando un comportamiento lineal en la curva de crecimiento, lo que indicó la ausencia de desarrollo bacteriano en las dos formas del antibiótico.

En la curva presentada en la fig. 10 A y B (de color rosa) correspondiente a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina, se apreció un crecimiento logarítmico que inició a partir de las 13 h de incubación. Este comportamiento en el desarrollo bacteriano fue muy parecido en las dos formas del fármaco, pero se pudo apreciar para el caso del fármaco libre (Fig. 10 A) un menor crecimiento con respecto a la respuesta obtenida en la OTC encapsulada (Fig. 10 B), aun cuando esta diferencia no sea significativa. La variación en la desviación estándar mostrada en la curva de color rosa (concentración de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) puede

ser debida a que hay un retraso en la fase logarítmica de crecimiento bacteriano en algunos de los microorganismos, esto derivado de la de las diferencias en la sensibilidad a este antibiótico a la concentración previa a la mínima inhibitoria, por lo tanto su crecimiento varia provocando una mayor desviación estándar

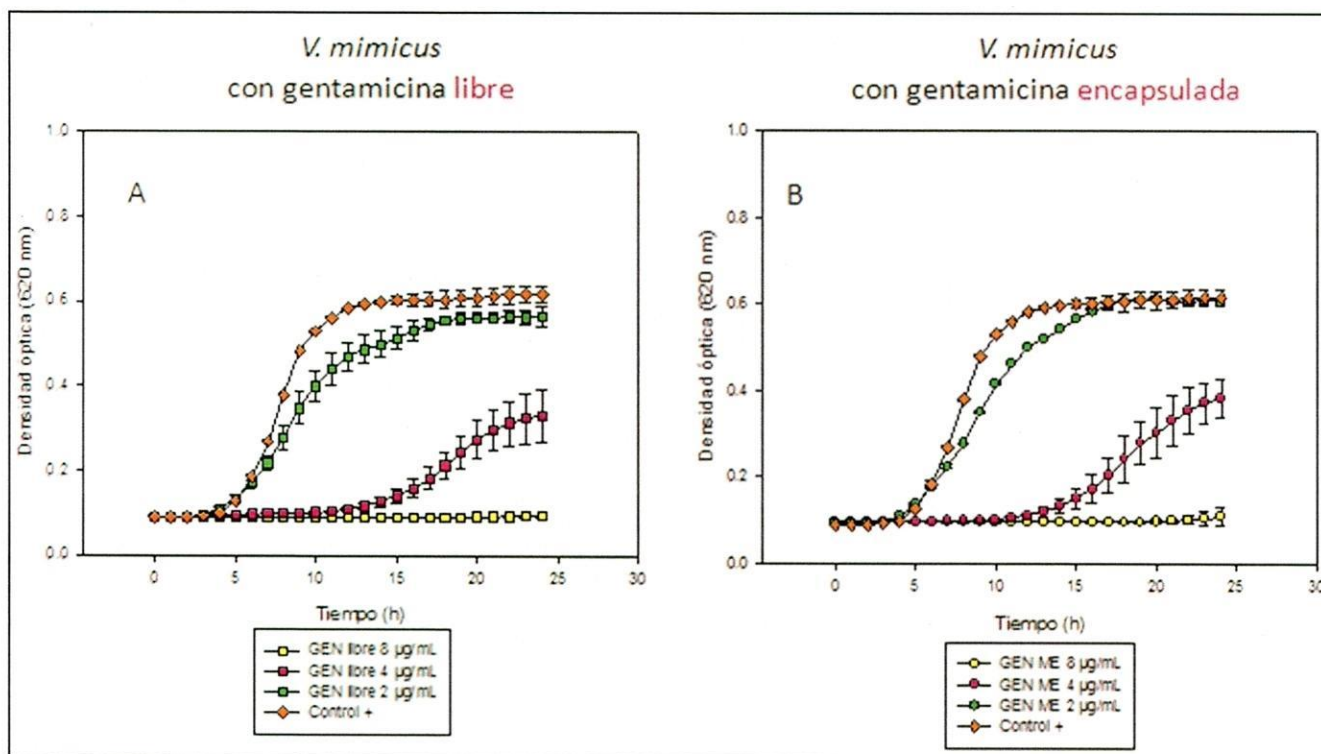


Figura 10. Cinética de crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653  
(A) OTC libre y (B) OTC encapsulada

La curva de color verde de gentamicina (2 µg/mL) mostró un comportamiento muy parecido al del control (+) que tuvo el crecimiento total de la bacteria. Iniciando el crecimiento bacteriano de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 después de 5 h de incubación en el caso del fármaco libre, con una menor intensidad que el encapsulado. Sin embargo, después de 24 h de incubación se observó para ambas formas de gentamicina, un mismo porcentaje de crecimiento bacteriano. En este caso se puede señalar que la forma libre de gentamicina mostró un crecimiento bacteriano menor y más lento, pero en las dos formas

de gentamicina fueron requeridas concentraciones elevadas del fármaco para ejercer un efecto inhibitorio (8 µg/mL).

Además, se obtuvieron en esta investigación, los porcentajes de inhibición (a las 24 h de incubación) para *V. mimicus* 602 ATCC 33653 (Figura 11). Para la OTC encapsulada se presentó un mejor porcentaje de inhibición que en el caso del antibiótico libre; incluso se pudo observar que a la concentración de 0.06 µg/mL continuó teniendo un efecto inhibitorio en *V. mimicus* 602 ATCC 33653, mientras que en la forma libre de OTC a esa misma concentración se presentó crecimiento bacteriano. Como se observó en la Fig. 9 a partir de 0.5 µg/mL el crecimiento fue inhibido completamente.

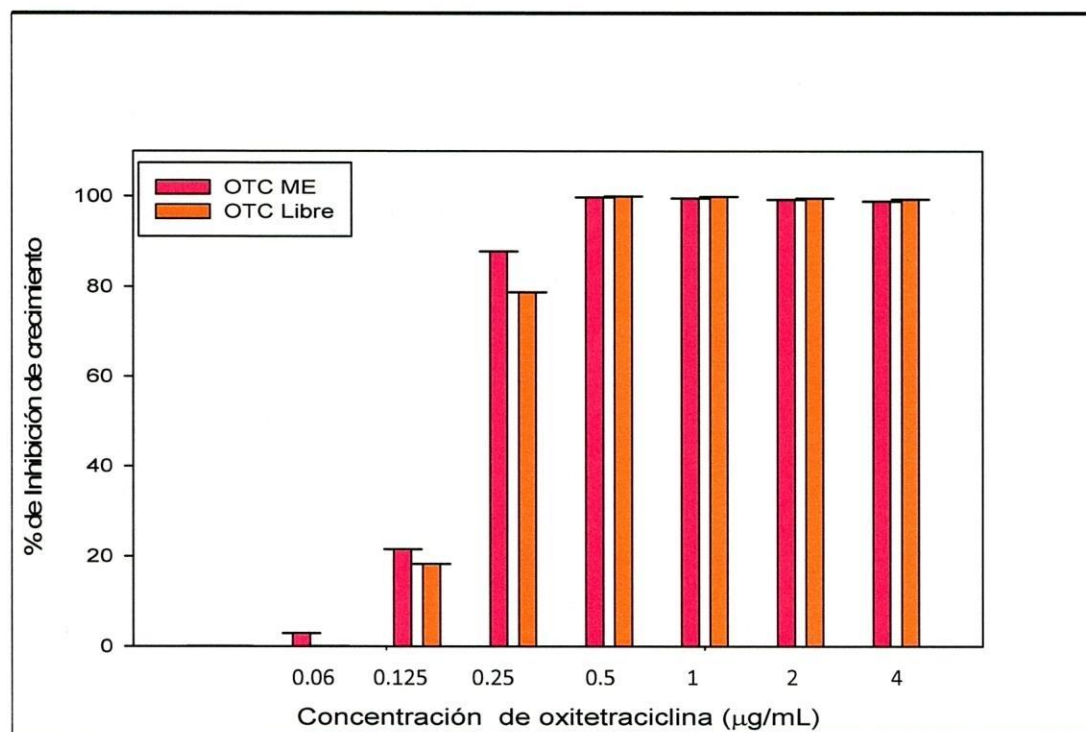


Figura 11. Porcentaje de inhibición de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 en CST con OTC encapsulada y libre después de 24 h de incubación

La Figura 12 muestra el porcentaje de inhibición de gentamicina una vez realizado el análisis de los datos obtenidos en la cinética bacteriana de este fármaco sobre *V. mimicus* 602 ATCC 33653. Para este antibiótico se determinó una CMI de 8 µg/mL. También se detectó una rápida pérdida del efecto inhibitorio, a partir de la concentración de 4 µg/mL y fue superior a 2 µg/mL de dicho antibiótico. Cabe señalar que con la gentamicina libre se tuvo un mejor efecto inhibitorio de *V. mimicus* 602 ATCC 33653. A la concentración de 0.5 µg/mL no hubo inhibición del crecimiento con las dos formas del fármaco.

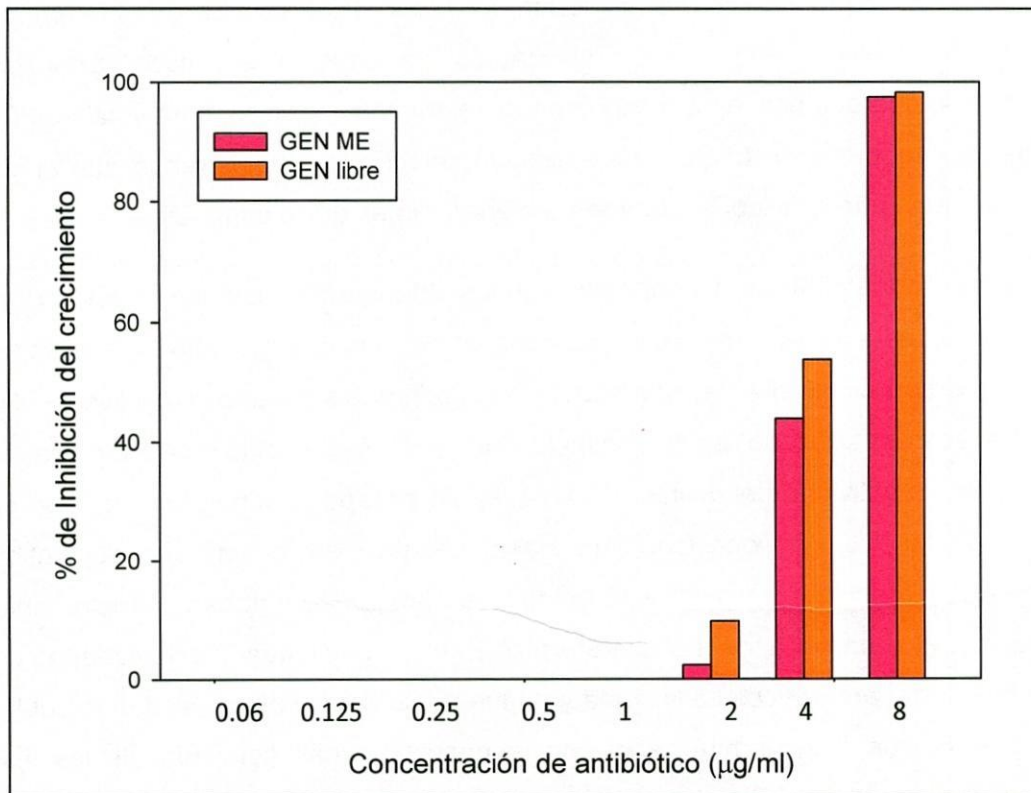


Figura 12. Porcentaje de crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 en CST con gentamicina encapsulada y libre después de 24 h incubación

Se pudo observar que gentamicina tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653, sin embargo, se requirieron concentraciones elevadas del fármaco, apreciándose claramente cuando gentamicina dejó de tener un efecto antimicrobiano. Es importante resaltar que OTC tuvo un mejor efecto inhibitorio frente a *V. mimicus* 602 ATCC 33653 a una menor concentración. Haswani y col. (2006) realizaron pruebas de actividad antimicrobiana con gentamicina encapsulada en albúmina de suero bovino (BSA), encontrando una actividad antimicrobiana significativa sobre *Escherichia coli*, demostrando que el antibiótico encapsulado tuvo un porcentaje de inhibición considerable, pero menor al obtenido cuando el antibiótico fue probado en forma libre.



Otro estudio realizado por Avivi y col. (2003), en el cual se investigó la actividad antimicrobiana de tetraciclina encapsulada en microesferas de BSA, sobre dos cepas de *E. coli*. Se encontró que las bacterias formaron halos de inhibición de 30 mm para la tetraciclina encapsulada, empleando el método de difusión en disco. Esta zona de inhibición fue comparada con la formada cuando se empleó un disco comercial de 30 µg de tetraciclina, el cual provocó un halo de inhibición de 33 mm, demostrando que el fármaco encapsulado tuvo una actividad ligeramente menor que el disco comercial.

Los resultados publicados contrastan con los obtenidos en esta investigación, ya que se obtuvieron en este estudio mejores resultados inhibitorios con el antibiótico encapsulado que con el que se encontraba de forma libre. Esta diferencia en el efecto inhibitorio puede ser debida al proceso utilizado en el encapsulamiento del fármaco, lo cual se refleja en una disminución de la actividad del mismo. El proceso de encapsulación llevado a cabo para la elaboración de las ME no ocasionó un efecto negativo en la actividad del antibiótico, manteniendo una efectividad similar al fármaco libre, mostrando ambos un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano. La literatura científica publicada relacionada con el encapsulamiento de antibióticos es limitada y no fue posible encontrar estudios publicados similares a éste, que nos permita hacer una comparación más detallada, de los distintos procesos de encapsulación utilizados y su aplicación.

Debe tomarse en cuenta que los ensayos de este estudio fueron realizados *in vitro*, y en un futuro debe considerarse realizar pruebas *in vivo* para comprobar si el proceso de encapsulación funciona adecuadamente, en relación a la protección de la actividad del antibiótico y el efecto que se obtiene al implementar un sistema de administración de fármacos dirigido a los organismos en cultivo, ya que el antibiótico encapsulado debe ser capaz de mantener su actividad cuando sea expuesto a un medio marino, que es el hábitat natural de las bacterias pertenecientes al género *Vibrio*. *In vitro* se demostró que la encapsulación del antibiótico, no afectó su actividad antimicrobiana.

La Tabla 3 muestra el resumen de los valores de CMI obtenidos en este estudio para OTC, los cuales estuvieron dentro de los intervalos de concentración inhibitoria reportados para bacterias del género *Vibrio*.

Tabla 3: Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los antibióticos encapsulados y de forma libre probados en una cepa de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653

Cepa bacteriana	Antibiótico probado	Tipo de administración	CIM (µg/mL)
<i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653	OTC	Microesferas	0.5
		Libre	0.5
<i>V. mimicus</i> 602 ATCC 33653	Gentamicina	Microesferas	8
		Libre	8

Un estudio realizado por Chanratchakool y col.(1995) reportó valores de CMI para OTC de 0.39 a 100 µg/mL para bacterias de *Vibrio*. Por otro lado, Santiago y col. (2009) publicaron para cepas de *Vibrio sp.* aisladas de agua, sedimento, hepatopáncreas y músculo de camarón valores de CMI para OTC en un intervalo de 0.75 a 100 µg/mL. Por tanto, el valor de CMI para OTC obtenido en este estudio, se encontró dentro de lo reportado para este género bacteriano. Morris y col. (1985) realizaron pruebas para determinar la CMI por microdilución en 93 cepas de *Vibrio aisladas de esteros*, correspondiendo una de ellas a *V. mimicus*, la cual fue inhibida con gentamicina a una concentración de 2 µg/mL. Este resultado fue menor al encontrado en nuestra investigación.

Es común que las bacterias aisladas de los sistemas de cultivo desarrollen resistencia a los antibióticos, esto está estrechamente relacionado con la frecuencia en el uso que se hace de estos fármacos en la industria acuícola (Santiago, 2009), requiriéndose en ocasiones altas concentraciones de antibióticos para lograr una inhibición en el crecimiento bacteriano.

## CONCLUSIONES

La cepa de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 fue sensible a los antibióticos cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, oxitetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim, resultados que son congruentes con la ATCC (American Type Culture Collection).

La oxitetraciclina encapsulada en microesferas de albúmina tuvo un efecto mayor en la inhibición del crecimiento de *V. mimicus* 602 ATCC 33653 comparado con el antibiótico en forma libre. En el caso de gentamicina el efecto inhibitorio fue menor con el antibiótico encapsulado.

Los resultados mostraron que el proceso de encapsulación de ambos antibióticos no afectó su actividad antimicrobiana. Por lo tanto, la encapsulación de este fármaco podría ser una alternativa que coadyuve en el control de las infecciones bacterianas que se presentan en la industria camaronícola.

## REFERENCIAS

- Aguilera, C., Herrera, C., Ponce, J. (2010). Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmónidos. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 38(2):227-233.
- Anónimo. (1997). World Aquaculture Society. Abstract 464, of the Annual international conference and exposition of the World Aquaculture Society and the National Aquaculture Conference and exposition of National Aquaculture Association; Feb. 19-23; Seattle, WA.
- Auró, A. A., Ocampo, C. L. (2006). El libro del camarón. Uso de Fármacos en la Camaronicultura. México D.F. Cap. 9. Pág. 241-247.
- Ausina R. V. (2006). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. México D.F. Cap. 11. Pág. 127-129
- Álvarez, J., Austin, B., Álvarez, A., Agurto, C. (2000). Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela. *Veterinaria Tropical*. 25(1):5-27.
- Avivi, S., Nitzan, R. D., Gedanken, A., (2003) An Easy Sonochemical Route for the Encapsulation of Tetracycline In Bovine Serum Albumin Microspheres. *Journal of the American Chemistry Society*. (9)125 NO. 51: 15713.
- Bravo L., Cabrera R., Cabrera L.E., Ramírez M., Castañeda N. Fernández A., Garrigó E., Silva M. (2004). Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes en Cuba. *Revista Española de Quimioterapia*. 17(2):200-201.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Revista Colombia Médica*. 38(2):149-158.
- Calderón, J. L., Ávila, E., Rivera, G. (2010). Confluencia de la Nanotecnología y Biomedicina en la Neuroprotección. *BioTecnología*. 14(2):30-42.
- Calvo, J., Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica*. 27(1):44-52.

- Chanratchakool, P., Pearson, M., Limsuwan, C., Roberts, R. J. (1995). Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricius*. *Journal of fish diseases*. 18(1):79-82.
- Crespo, M. P. (2002). La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica*. 33(4):179-193.
- Daza, P. R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22(3):57-67.
- Davis, B. R., Fanning, G. R., Madden J.M., Steigerwalt A. G., Bradford H. B., Smith H. L. Brenner D. J. (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal Clinical Microbiology*. 14:631-639.
- Edlund, U., Albertsson, A. C. (2002). Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Advances in Polymer Science*. 157:67-112.
- García, R. J. A., García, S. E. (1997). Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: *Eficacia in vivo Eficacia in vitro*. Madrid-Barcelona, España. Ed. Doyma, S.A. Pág. 39-50.
- Ghizlane, E. K. (2006). Farmacocinética y eficacia de oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovinos. Depleción tisular.[Tesis]. Universidad Autónoma de Barcelona. Departament de Farmacologia, Terapéutica i de Toxicologia Facultat de Veterinaria. Bellaterra, España. Pág.9-11.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Guerra, F. A. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Ed. Páez-Osuna, F. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. Mazatlán, Sin. México. Pág. 273-274.
- González, E., Tercero, A. J. J., Quiñonez, R. E. I., Vázquez, S. C. (2005). El hermano pequeño del cólera *Vibrio mimicus*. *Revista Digital Universitaria*. 6(4):2-8. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art34.htm>.
- Hasan, N. A., Grim, C. J., Haley, B. J., Chun, J., Alam, M., Taviani, E. Hoq, M, Munk, A. C., Saunders, E., Brettin, T. S., Bruce, D. C., Challacombe, J. F., Detter, J. C., Han, C. S., Xie, G., Nair, G. B., Huq, A., Colwell, R. R. (2010). Comparative genomics of clinical and environmental *Vibrio mimicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(49):21134-21139.

- Haswani, D. K., Netthey, H., Oettinger, C., D'Souza, M. J. (2006). Formulation, characterization and pharmacokinetic evaluation of gentamicin sulphate loaded albumin microspheres. *Journal of Microencapsulation*. 23(8): 875–886.  
<http://karlaliz27.blogspot.mx/>
- [http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt5\\_nanomedicina.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt5_nanomedicina.pdf)
- <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>
- [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182004000400007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182004000400007&script=sci_arttext)
- Huth, M. E., Ricci, A. J., Cheng, A. G. (2011). Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *International Journal of Otolaryngology*. 2011: 1-19.
- Junco, D. R., Pita, M. S., Weng, Z. A., Rubalcaba, S. C., González, M. G., Díaz, O. E., Rodríguez, M. S. (2006). Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 6:150-159.
- Kirby, W. M. Bauer, A. W. Sherris, J. C. Jurck, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 451:493-496.
- Kramer P. A. (1974). Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63:1646–1647.
- Le, T. X., Munekage, Y., Kato, S., (2005). Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Centre for Natural Resources and Environmental Studies* 349(1-3):95-105.
- Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(3):441-456.
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., Q. R. (2010). Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental Microbiology*. 76(11):3444-51.
- Mansour, H. M., Sohn, M., Al-Ghananeem, A., DeLuca, P. P. (2010). Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 3298-3322.
- Mathew, S. T., Devi, S. G., Sandhya, K. V. (2006). Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration. *AAPS Pharmaceutical Scientists Technology*. 8(1):14-22.

- Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bellot, H., Domínguez, M., Zemelman, R., Ramírez, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia Revista Chilena de Infectología. 21(4):330-338.
- Mendoza, A. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 54(1):18-27.
- Mira, J., Garcia, P. (1998). Vibrios de origen marino en patología humana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 15(7):383-388.
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica, 27(3):178-188.
- Morales, C. M. S. (2004). Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. Ed. Trillas. México, D.F. Cap. 5. Pág. 81-82.
- Morales, M. S., Ruiz, A., Moura, A. P., Solís, V. T., Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXI. 5:434- 446.
- Morris Jr, J. G., Tenney, J. H., Drusano, G. L. (1985). Antimicrobial agents. species to norfloxacin and six other. Antimicrobial agents and chemotherapy. 28:442-445.
- NCCLS (2003). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 6<sup>th</sup> Edition, M7-A6. NCCLS, Villanova, Pa, USA. Document M32P
- Patil, G. V. (2003). Biopolymer Albumin for Diagnosis and in Drug Delivery. Drug Development Research. 58:219-247.
- Rocha, D.S (2011). Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e preliminar de virulencia entre cepas de *vibrio* spp. isoladas da agua e sedimento do estuario do rio acarau, Ceara, Brasil. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Ceara, Centro de Ciencias Agrarias. Ceara, Brasil. Pág14-28.
- Roque, A., Molina, A. A., Bolán, M. C., Gómez, G. B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents. 17:383-387.
- Rendón, L., Balcázar, J. L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. Revista AquaTIC. 19:27-33.
- Rodríguez, I. C., Cerezo, A., Salem, I. I. (2000) Sistemas de liberación Bioadhesivos. ArsPharmaceutica. 41(1): 115-128.

- Sáez, V., Hernández, E., Angulo, L. S. (2004). Mecanismos de Liberación de Fármacos desde Materiales Polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(1):55-70.
- Santiago, H. M.L., Espinosa, P. A., Bermúdez, A. M.C. (2009). Uso de Antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3):22-32.
- Santiago-Hernández, M. L. (2009). Acumulacion de Oxitetraciclina (OTC) en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y pruebas de sensibilidad en bacterias tipo *Vibrio* aisladas de un sistema de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. Pág.4-14.
- Siepmann, J., Siepmann, F. (2006). Microparticles used as drug delivery systems. *Program Colloid Polymeric Science*. 133:15–21.
- Tang, C. M., Moxon, E. R., (2001). The impact of microbial genomics on antimicrobial drug development. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2:259-269.
- Tendencia, E. A., De la Peña, L. D., (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*. 195:193-204.
- Tercero J. J., Gonzáles, E., Quiñónez, E. I., Vázquez, C. (2007). Efecto citotóxico de *Vibrio mimicus* aislado de alimentos. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25-29 de Junio. Morelia Michoacán, México.
- Thompson, F. L., Lida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3):403-31.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., M. Balladares, B. Gomez-Gil, Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J. (1999). Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6):2592–2597.