

Laura Gabriela Miranda Calderon

Control farmacocinético en la
liberación de antimicrobianos
desde apósitos avanzados y
desde nanopartículas dirigidas:
Evaluación de su eficacia
bactericida en heridas tópicas
infectadas

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel
Irusta Alderete, Silvia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CONTROL FARMACOCINÉTICO EN LA
LIBERACIÓN DE ANTIMICROBIANOS DESDE
APÓSITOS AVANZADOS Y DESDE
NANOPARTÍCULAS DIRIGIDAS: EVALUACIÓN DE
SU EFICACIA BACTERICIDA EN HERIDAS
TÓPICAS INFECTADAS

Autor

Laura Gabriela Miranda Calderon

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel
Irusta Alderete, Silvia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2024



“Control farmacocinético en la liberación de antimicrobianos desde apósitos avanzados y desde nanopartículas dirigidas: Evaluación de su eficacia bactericida en heridas tópicas infectadas”

Esta Tesis Doctoral se presenta al programa de doctorado del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza (España) para cumplir con los requisitos necesarios para obtener el título de Doctor:

Laura Gabriela Miranda Calderón

Zaragoza, 2023



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

INMA
INSTITUTO DE NANOCIENCIA
Y MATERIALES DE ARAGÓN



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

Dra. Silvia Irusta Alderete, Profesora Titular de Universidad y el **Dr. Manuel Arruebo Gordo**, Catedrático de Universidad, ambos profesores de la Universidad de Zaragoza en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente y miembros del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA),

CERTIFICAN

que la presente memoria titulada,

“Control farmacocinético en la liberación de antimicrobianos desde apósitos avanzados y desde nanopartículas dirigidas: Evaluación de su eficacia bactericida en heridas tópicas infectadas”

Ha sido desarrollada y escrita bajo su dirección por **Dña. Laura Gabriela Miranda Calderón** en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente y en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). En consecuencia, autorizamos y aprobamos su presentación.

Para que así conste, firmamos este documento en Zaragoza a 24 de agosto de 2023.

Fdo. Silvia Irusta Alderete

Fdo. Manuel Arruebo Gordo

*Para Narcita,
por darme un amor que acompaña, perdura y cura.*

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis doctoral representa el resultado de un gran esfuerzo en el que el apoyo invaluable de numerosas personas ha sido crucial. Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han acompañado en este increíble viaje.

En primer lugar, quiero expresar mi profunda gratitud hacia mis directores de Tesis, la Dra. Silvia Irusta y el Dr. Manuel Arruebo. Su invaluable apoyo no solo me brindo la oportunidad de trabajar codo a codo con ellos, sino que también me introdujo en el increíble mundo de la investigación, permitiéndome contribuir de manera significativa a los frutos de su incansable labor investigadora. De igual manera quiero agradecer a la Dra. Gracia Mendoza, por todas sus valiosas aportaciones y guía a través de estos años. A los tres, les estoy agradecida no solo por su papel académico, sino también por su comprensión y apoyo que han sido esenciales tanto en mi crecimiento profesional y personal. Por esta oportunidad tan valiosa y por abrirme las puertas, estaré eternamente agradecida.

Gran parte del conocimiento que he adquirido se los debo a personas que no han tenido ningún reparo en compartir sus conocimientos científicos. Por esta razón, quiero expresar mi sincero agradecimiento a Cris Y. por ser siempre un faro en la oscuridad, no solo en el laboratorio si no también fuera de él, y por compartir conmigo tus brillantes ideas. También quiero agradecer a Teresa, Sara y Kike por guiarme, confiar en mí y por compartir siempre buenos momentos. En especial quiero agradecer a Guille por siempre respaldarme y nunca dejarme sola en el barro.

Igualmente, gracias a todos los técnicos que siempre tuvieron la mejor disposición y siempre me orientaron para obtener los mejores resultados, a Nuria por su paciencia y ayuda, a los técnicos del LMA: Marta, Gala y Mariano, por su ayuda, guía y las buenas risas. De la misma manera quiero agradecer a los doctores del NFP, en donde hice parte de mi tesis, la Dra. Reyes Mallada y el Dr. Víctor Sebastián por su contribución.

El día a día se torna mucho más ligero cuando compartes con personas excepcionales, en mis inicios en el NFP, tuve la fortuna de coincidir con cuatro maravillosas mujeres que me acogieron y ofrecieron sus mejores consejos, gracias Marta L, Roby, Bea y Cris Y. También quiero agradecer a mis colegas, todos los chicos de “La Sala” por los largos debates, los cafés y las comidas compartidas: Raúl, Nacho, Fatou, Ana, Miguel E., Javi B., Javi M., Sergio, Andrea, a los posdocs Lau, Miguel, Ekaterina y a mis dos chicas CIBA, con las que he creado momentos que se quedarán en la memoria por siempre a Iman y Moni, por todas las risas acumuladas mil gracias.

Agradecimientos

Durante estos años he conocido excelentes colegas que con el tiempo se han convertido en increíbles amigos que quedaran de por vida. Gracias infinitas a Cristóbal, gracias por ser un gran amigo siempre dispuesto a escuchar, apoyar y llevar la contraria, a Kissia por las interminables risas y las buenas charlas, a Arturo por compartir siempre esa chispa tan característica, a Isabel por siempre escuchar y ponerme los pies en la tierra, a Ángeles por ser siempre una alegría no importa como pinte el día.

Estando lejos de casa toca formar pequeñas redes de apoyo con aquellos que están dispuestos a mostrarte su cariño y apoyo incondicional, en este camino he encontrado una pieza fundamental, Natalia muchas gracias por estar, por alegrar mis días y ser mi confidente, pasaste de ser mi TFM que se le olvido diluir a ser una de las hermanas que me dio la vida, el amor que se ha creado es incondicional. Gracias a Ana, Belén y Cris R, por ser ese hermoso circulo de amigas que apoyan, quieren, ríen, hablan honestamente y escuchan abiertamente.

Por Zaragoza he encontrado una familia, gracias a Ana C., Jessi, Karlita, Karen, Alfonso, Billy, Iván por crear recuerdos invaluable y siempre estar ahí en las buenas, en las malas y en las ideas locas. Un agradecimiento especial a Lau y Simón por ser la familia lejos de casa rodeándonos de mucho cariño y a Erick por ser un amigo implacable que siempre está al tiro del cañon.

A través de muchos kilómetros, nunca he dejado de sentir el apoyo y el interminable amor de mis amigos de toda la vida: Zaci, gracias por no dejar que la distancia aminore nuestras hermosas charlas, nuestras anécdotas, nuestras muestras de cariño, eres indispensable. A Jesús por siempre estar, amar y por seguir compartiendo conmigo. Agradezco a Gris, Ile, Erik, Victor, Ali, Eli y Chivis, porque han sido personas muy importantes en mi camino hasta aquí, han sido incondicionales y tenerles en mi camino me da fuerza y alegría necesaria para seguir. A Mar, por ser luz en mi oscuridad.

Finalmente quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida y que sin ellas no hubiera sido posible llegar hasta aquí: mis padres, que siempre me han rodeado del amor más puro que existe, que me han dado las alas para volar libremente, estar lejos de ustedes ha sido la tarea más difícil pero el calor de su amor me acompaña a donde quiera que vaya, les debo todo. A mi tía Norma y mi familia en general porque, aunque no entienden muy bien que hago nunca me ha faltado el amor, ni el apoyo, ni los buenos deseos, ni las sonrisas, ni los abrazos calurosos cuando nos vemos. Mi eterno agradecimiento a Jesús, por ser mi amor, mi aliento, mi cobija, mi compañía y mis alegrías, sostener tu mano me da la fuerza que necesito, sin ti este viaje no hubiera sido lo mismo.

RESUMEN E ÍNDICE DE LA TESIS

Summary and Thesis Outline

RESUMEN E ÍNDICE DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral, titulada “*Control farmacocinético en la liberación de antimicrobianos desde apósitos avanzados y desde nanopartículas dirigidas: Evaluación de su eficacia bactericida en heridas tópicas infectadas*”, se ha desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza (España), dentro del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). Para su implementación, se ha colaborado con miembros del grupo de investigación de Partículas y Películas Nanoestructuradas (NFP, *Nanostructured Films and Particles*) perteneciente a la Universidad de Zaragoza y con miembros del grupo de Materiales Avanzados en Biomedicina (AMiB, *Advance Materials in Biomedicine*) perteneciente al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). La investigación que se expone a continuación ha sido desarrollada bajo la codirección de la Dra. Silvia Irusta y el Dr. Manuel Arruebo. La investigación fue financiada por la beca CVU: 710618 otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) del Gobierno Mexicano. Además del apoyo prestado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (código de subvenciones CTQ2017-84473-R y PID2020-113987RB-I00). También se contó con el apoyo del CIBER-BBN que es una iniciativa financiada por el VI Plan Nacional de I+D+i 2008-2011, Iniciativa Ingenio 2010. Las acciones de CIBER están financiadas por el Instituto de Salud Carlos III (España) con la ayuda del Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

En esta Tesis Doctoral, se han empleado diversas estrategias con el objetivo de desarrollar sistemas de liberación de antimicrobianos basados en polímeros biocompatibles para abordar la naturaleza polimicrobiana de las infecciones tópicas y el creciente problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos. El enfoque principal es lograr la liberación de agentes antibacterianos de una manera óptima para mejorar su eficacia en el tratamiento de infecciones en heridas tópicas.

Para ello, se han diseñado sistemas que proporcionan una liberación sostenida de los agentes antibacterianos, permitiendo una actividad antimicrobiana eficaz durante un período prolongado de tiempo. La elección de polímeros se basó en su capacidad para interactuar de manera segura con los tejidos, minimizando la potencial

toxicidad y los efectos adversos en el entorno de la herida. Se compararon sistemas compuestos por nanofibras formando apósitos cargados con tres agentes terapéuticos diferentes: antibióticos (rifampicina y ciprofloxacino), antisépticos sintéticos (clorhexidina) y antisépticos naturales (timol) presentes en aceites esenciales de tomillo y de orégano entre otras plantas. Además, para potenciar la eficacia de los antibióticos y reducir las concentraciones necesarias para producir una inhibición en el crecimiento bacteriano, se investigó el direccionamiento del antimicrobiano a través de un anticuerpo específico que reconoce una bacteria patógena o mediante la sinergia de dos antibióticos en un mismo apósito.

La tesis se estructura en cinco capítulos descritos brevemente a continuación:

- El **Capítulo I** corresponde a la introducción, donde se abordan los conceptos generales relacionados con las heridas tópicas y su proceso de cicatrización. Se examinan las características de las heridas agudas y crónicas, así como los factores que influyen en el proceso regenerativo, incluyendo aspectos fisiológicos y las potenciales infecciones causadas por patógenos. Con relación a las infecciones, se profundiza en la evolución temporal de una infección y la potencial formación del biofilm bacteriano, incluyendo el microbioma presente en las heridas infectadas y se exploran los diferentes tratamientos utilizados para curar dichas heridas, tales como antisépticos, antibióticos, compuestos naturales y los nanomateriales empleados para la liberación de estos fármacos como sistemas de liberación controlada. Además, se enuncian los objetivos generales de esta tesis.
- En el **Capítulo II** se aborda la incorporación de: Rifampicina (RIF), Clorhexidina (CHX) y Timol (THY) en apósitos elaborados con fibras electrohiladas de copolímeros de metacrilato ácido, Eudragit® L100-55 y S100, cuya respuesta está condicionada por el pH del medio, así como un copolímero pH-independiente, Eudragit® RS100. Se detalla la caracterización fisicoquímica de los apósitos y se evalúa su capacidad de liberación de los compuestos contenidos en la fibras en disoluciones con diferentes valores de pH, ya que el pH de una herida varía según la carga bacteriana presente. Asimismo, se analiza la

actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* GFP y *Escherichia coli* S17, tanto de los compuestos libres como de los apósitos cargados con los mismos. Para evaluar dicha actividad, se determinan la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC). Finalmente, se realiza un estudio de citocompatibilidad de estos apósitos frente a macrófagos murinos J774, al igual que frente a los fármacos libres.

- El **Capítulo III** aborda la incorporación de dos antibióticos, la rifampicina (RIF) y el ciprofloxacino (CIP), en un apósito compuesto por dos estructuras distintas preparadas mediante técnicas electrohidrodinámicas. Las fibras del polímero Eudragit® RS100 cargadas con RIF fueron decoradas con partículas también de Eudragit® RS100, cargadas con CIP. El objetivo principal de esta estrategia es lograr una reducción de las dosis de antibióticos necesarias para el control bacteriano aprovechando la posible sinergia entre los mismos y las distintas cinéticas de liberación de los antibióticos desde las fibras y desde las partículas. Para ello se llevó a cabo inicialmente la determinación del Índice de Concentración Inhibitorio Fraccional (FICI) para conocer si existe dicha sinergia cuando se encuentran en forma libre. Posteriormente, se realizaron evaluaciones biológicas para determinar la actividad antimicrobiana a través de la determinación de la MIC y la MBC, tanto del apósito cargado como de los fármacos libres. Asimismo, se analiza la capacidad de los antibióticos para inhibir la formación de biofilms y su capacidad de disrupción sobre biofilms preformados. Además, se examina la citocompatibilidad de los antibióticos combinados y de los mismos incorporados en el apósito utilizando queratinocitos humanos (HaCaT), fibroblastos humanos (NHDF-Ad) y macrófagos murinos (ATCC-TIB-67™). Este análisis permite evaluar el impacto de los antibióticos en la viabilidad y funcionalidad de estas células clave en el proceso de cicatrización.
- En el **Capítulo IV** se llevó a cabo un análisis exhaustivo de la eficacia y selectividad de nanopartículas de PLGA funcionalizadas con un anticuerpo específico dirigido a los epítomos de *S. aureus* y cargadas con un antibiótico (RIF)

Resumen e índice de la tesis

respecto de las mismas partículas sin direccionar. La actividad antimicrobiana se evaluó en bacterias planctónicas, sésiles e intracelulares. Además, se utilizaron modelos de cocultivo de *E. coli* y *S. aureus* para demostrar la selectividad del agente de direccionamiento seleccionado. Asimismo, se empleó un modelo de macrófagos humanos infectados para demostrar la capacidad de dirigirse a las células bacterianas intracelulares. En este capítulo se seleccionó la RIF como antibiótico modelo para analizar exclusivamente la eficacia de las nanopartículas dirigidas en comparación con las no funcionalizadas en escenarios tan complejos como aquellos en los que el patógeno bacteriano infecta a las células humanas y permanece en su interior como patógeno persistente.

- El **Capítulo V** presenta las conclusiones generales obtenidas en esta Tesis Doctoral.

Por último, se incluyen tres anexos:

- **Anexo I**, contiene los reactivos utilizados, la descripción de las técnicas y equipos de caracterización empleados para la síntesis y caracterización de los materiales estudiados en esta Tesis Doctoral.
- **Anexo II**, describe las optimizaciones seguidas durante la deposición de las fibras del capítulo II, junto a las cinéticas de liberación de cada fármaco contenido en los apósitos del Capítulo II.
- **Anexo III**, señala las contribuciones a congresos y la lista de publicaciones científicas derivadas directa o indirectamente de esta Tesis.

SUMMARY AND THESIS OUTLINE

This Doctoral Thesis, entitled "*Pharmacokinetic control in the release of antimicrobials from advanced dressings and targeted nanoparticles: Evaluation of their bactericidal efficacy in infected topical wounds*", has been developed in the Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies of the University of Zaragoza (Spain). For its elaboration, a scientific collaboration was established between the Nanostructured Films and Particles (NFP) research group and the Advanced Materials in Biomedicine (AMiB) research group, the later belonging to the Biomedical Research Center of Aragon (CIBA). The research herein presented has been conducted over a period of four years (2019 - 2023), under the co-supervision of Dr. Silvia Irusta and Dr. Manuel Arruebo, and has been funded by the CVU scholarship: 710618 provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) of the Mexican Government. In addition, financial support has been provided by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (grant number CTQ2017-84473-R). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008-2011, Ingenio 2010 Initiative, and CIBER's actions are funded by the Carlos III Health Institute (Spain) with the help of the European Regional Development Fund.

This Doctoral Thesis compiles diverse strategies to develop biocompatible polymer-based systems to address polymicrobial topical infections and the increasing issue of bacterial resistance. The main objective is to deliver antibacterial agents in an optimal manner to increase their efficacy, thereby reducing the risk of antimicrobial resistance. To accomplish this, different approaches involving the design of suitable polymeric systems have been explored. These systems are designed to sustainably release antibacterial agents, ensuring prolonged and effective antimicrobial activity.

The selection of biocompatible polymers is based on their ability to safely interact with tissues, minimizing potential toxicity and adverse effects in the wound environment. In this context, systems composed of nanofiber-based dressings loaded with three different therapeutic agents, namely antibiotics (rifampicin and ciprofloxacin), synthetic antiseptics (chlorhexidine), and antiseptics present in essential oils (thymol), were compared on the evaluation of their antimicrobial action.

Additionally, systems were designed to enhance the efficacy of antibiotics at low concentrations to minimize resistance. This was achieved through a specific antibody targeting to Gram-positive bacteria or through the synergistic combination of two antibiotics within a single dressing, thereby reducing the required concentration to bacterial elimination.

To facilitate reading and improve the comprehension, and to offer a detailed analysis of the work conducted, the thesis is structured into five chapters, which are briefly described as follows:

- **Chapter I** corresponds to the introduction, which addresses fundamental concepts related to the physiology of topical wounds and their healing process. It explores the characteristics of both acute and chronic wounds, as well as the factors influencing their healing process, including physiological aspects and potential infection caused by pathogens. Regarding infections, it delves into the progression of an infection and biofilm formation, including the description of the wound's microbiome in infected wounds. Furthermore, it examines various treatment modalities to promote wound healing, such as antiseptics, antibiotics, natural compounds, and nanomaterials employed for drug delivery. The general objectives of this thesis are also stated.
- **Chapter II** focuses on the incorporation of therapeutic agents, specifically Rifampicin, Chlorhexidine, and Thymol, into dressings composed of copolymeric fibers derived from methacrylic acid, Eudragit® L100-55 and S100. The response of these dressings is influenced by the surrounding pH, while a pH independent copolymer, Eudragit® RS100, is also investigated. This chapter provides a comprehensive characterization of the dressings and evaluates their antimicrobial release capacity at different pH values. Furthermore, it analyzes their ability to exert antibacterial activity against GFP-expressing *S. aureus* and against *E. coli* S17, analyzing both the free therapeutic agents and equivalent doses of the loaded dressings. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) are determined to evaluate such activity. Finally, a cytocompatibility study of these drug-loaded dressings is

conducted using J774 murine macrophages, as well as the equivalent doses of the free drugs.

- **Chapter III** addresses the incorporation of two antibiotics, Rifampicin (RIF) and Ciprofloxacin (CIP), into a dressing that features two distinct structures prepared using electrohydrodynamic techniques. Specifically, fibers based on Eudragit® RS100 polymer loaded with RIF were decorated with particles, also of Eudragit® RS100, loaded with CIP. The main objective of this strategy is to achieve a sustained release of the antibiotics. Initially, the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) is determined to assess the potential synergy between those free antibiotics, thereby evaluating whether their antibacterial activity is enhanced when combined. Subsequently, biological evaluations are conducted to analyze the antimicrobial activity by determining the MIC and MBC against *S. aureus* and *E. coli*, both for the loaded dressing and for the equivalent doses of the free drugs. Additionally, the ability of the antibiotics to inhibit biofilm formation and their disruptive capacity against preformed biofilms are analyzed. Furthermore, the cytocompatibility of the antibiotic combination and the antibiotics incorporated in the dressing are examined using human HaCaT keratinocytes, human fibroblasts (NHDF-Ad), and murine macrophages (ATCC-TIB-67™). This analysis allows for an assessment of the antibiotics impact on the viability and functionality of these crucial cells involved during the healing process.
- **Chapter IV** presents a comprehensive analysis of the efficacy and selectivity of PLGA nanoparticles functionalized with selective antibodies carrying antibiotics, specifically targeting *S. aureus* in its different states: planktonic, sessile, and intracellular, to evaluate the effectiveness of targeted antibiotic therapy in these distinct environments. Co-culture models of *E. coli* and *S. aureus* are used to demonstrate the selectivity of the chosen targeting agent. Moreover, a model of infected human macrophages is employed to demonstrate the ability of the developed nanoparticles to target intracellular bacterial cells. In this

chapter, RIF is selected as a model antibiotic to exclusively analyze the effectiveness of targeted nanoparticles compared to non-functionalized ones.

- **Chapter V** presents the general conclusions obtained in this Doctoral Thesis.

Finally, three appendices are included:

- **Appendix I** contains the reagents used, the description of the techniques and characterization equipment employed for the synthesis and characterization of the materials developed in this Doctoral Thesis.
- **Appendix II** describes the optimizations carried out during fiber deposition described in Chapter II, along with the antimicrobial release kinetics and mathematical models used.
- **Appendix III** highlights the contributions to conferences and the list of scientific publications directly or indirectly derived from this Doctoral Thesis.

ÍNDICE

RESUMEN E ÍNDICE DE LA TESIS.....	XI
SUMMARY AND THESIS OUTLINE.....	XV
ÍNDICE.....	XIX
LISTADO DE ACRÓNIMOS	XXIII
Capítulo I Introducción general y objetivos	1
I.1 Heridas tópicas.....	3
I.1.2 Heridas agudas y crónicas	5
I.1.3 Variaciones del pH en las diferentes etapas de curación de una herida	6
I.2 Infecciones en heridas crónicas	8
I.2.1 Evolución cinética de una infección.....	8
I.2.2 Biofilm	10
I.2.3 Patógenos y microbioma en heridas infectadas.....	11
I.3 Tratamientos farmacológicos para la curación de heridas	15
I.3.1 Antisépticos.....	15
I.3.2 Antibióticos	16
I.3.3 Alternativas a los antibióticos.....	18
<i>I.3.3.1 Aceites esenciales.....</i>	<i>18</i>
I.4 Sistemas de liberación de fármacos para heridas tópicas	20
I.4.1 Nanomateriales para liberación de fármacos en heridas.....	20
I.4.2 Apósitos	22
<i>I.4.2.1 Apósitos cargados con bactericidas.....</i>	<i>26</i>
<i>I.4.2.2 Electrohilado</i>	<i>29</i>
I.4.3 Nanopartículas en tratamiento de infecciones	31
<i>I.4.3.1 Nanopartículas poliméricas.....</i>	<i>32</i>
I.5 Objetivos	34
Capítulo II Estudio de la carga y liberación de agentes terapéuticos en apósitos electrohilados sensibles al pH para heridas	37
II.1 Introducción	39
II.2 Objetivo	43
II.3 Síntesis de apósitos electrohilados y su caracterización.....	43

II.3.1 Síntesis de apósitos y su caracterización.....	43
II.3.6 Análisis biológicos <i>in vitro</i>	44
II.4 Resultados y discusión.....	46
II.4.1 Caracterización morfológica de los apósitos.....	46
II.4.2 Encapsulación de agentes antibacterianos.....	49
II.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	50
II.4.4 Espectroscopía Raman.....	52
II.4.5 Efecto del pH en la morfología de los apósitos.....	54
II.4.6 Liberación de agentes antimicrobianos.....	55
II.4.7 Actividad antibacteriana.....	57
II.4.8 Citocompatibilidad.....	62
II.5 Conclusiones.....	66
Capítulo III Apósito de liberación controlada con combinación de antibióticos sinérgicos.....	67
III.1 Introducción.....	69
III.2 Objetivo.....	72
III.3 Síntesis de apósitos y su caracterización.....	73
III.3.1 Análisis biológicos <i>in vitro</i>	74
III.4 Resultados y discusión.....	74
III.4.1 Caracterización fisicoquímica de los materiales.....	74
III.4.2 Actividad antibacteriana.....	80
III.4.2.1 Actividad bactericida de los antibióticos libres.....	80
III.4.2.2 Sinergia de antibióticos.....	81
III.4.2.3 Actividad bactericida del sistema.....	82
III.4.2.4 Evaluación de la actividad antibiofilm del sistema RIF-CIP/RS100.....	83
III.4.2.5 Citotoxicidad celular.....	86
III.5 Conclusiones.....	87
Capítulo IV Nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos para la liberación selectiva de antibióticos en modelos polimicrobianos y en infecciones intracelulares.....	89
IV.1 Introducción.....	91
IV.2 Objetivo.....	94
IV.3 Síntesis de partículas y su caracterización.....	95

IV.3.1 Síntesis de copolímero, nanopartículas, funcionalización y caracterización ...	95
IV.3.2 Caracterización biológica.....	96
IV.4 Resultados y discusión	97
IV.4.1 Caracterización de las nanopartículas	97
IV.4.2 Actividad bactericida	102
IV.4.3 Citocompatibilidad de nanopartículas y actividad bactericida en un modelo de infección <i>in vitro</i>	112
IV.5 Conclusiones	115
Capítulo V Conclusiones y perspectivas generales	117
Conclusiones generales	119
Anexo I.....	123
AI.1 Materiales y Métodos	125
AI.1.2 Materiales	125
AI.1.3 Técnicas de síntesis de materiales	126
<i>AI.1.3.1 Electrohilado y electrospraying</i>	<i>126</i>
<i>AI.1.3.2 Síntesis del copolímero de PLGA-PEG-biotina</i>	<i>127</i>
<i>AI.1.3.3 Síntesis de nanopartículas sin cargar y cargadas con RIF mediante nanoprecipitación.....</i>	<i>128</i>
<i>AI.1.3.4 Funcionalización de NPs con anticuerpo anti-Staphylococcus aureus.....</i>	<i>128</i>
AI.1.4 Técnicas de caracterización fisicoquímica.....	129
<i>AI.1.4.1 Viscosidad</i>	<i>129</i>
<i>AI.1.4.2 Efecto del pH.....</i>	<i>129</i>
<i>AI.1.4.3 Caracterización morfológica</i>	<i>129</i>
<i>AI.1.4.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier</i>	<i>130</i>
<i>AI.1.4.5 Espectroscopía Raman</i>	<i>130</i>
<i>AI.1.4.6 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....</i>	<i>130</i>
<i>AI.1.4.7 Dispersión dinámica de la luz y Potencial zeta.....</i>	<i>131</i>
<i>AI.1.4.8 Carga del fármaco y eficiencia de encapsulación</i>	<i>131</i>
<i>AI.1.4.9 Evaluación de la cinética de liberación.....</i>	<i>132</i>
<i>AI.1.4.10 Bicinchoninic Acid (BCA)</i>	<i>133</i>
AI.1.5 Evaluación biológica.....	134
<i>AI.1.5.1 Cultivo de bacterias</i>	<i>134</i>
<i>AI.1.5.2 Actividad bactericida</i>	<i>134</i>

<i>AI.1.5.3 Actividad bactericida en cocultivo bacteriano</i>	135
<i>AI.1.5.4 Ensayo de Susceptibilidad Antimicrobiana en Disco</i>	135
<i>AI.1.5.5 Estudio de sinergia mediante la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI)</i>	136
<i>AI.1.5.6 Formación y disrupción del biofilm</i>	136
<i>AI.1.5.7 Citotoxicidad</i>	138
<i>AI.1.5.8 Modelo de infección</i>	139
AI.1.6 Análisis estadístico.....	140
Anexo II	141
Anexo III	149
AIII.1 Publicaciones	151
AIII.2 Congresos	152
REFERENCIAS	153

LISTADO DE ACRÓNIMOS

AE	Aceites Esenciales
CFU	Unidades Formadoras de Colonias (del inglés <i>colony forming units</i>)
CHT	Cloruro de Hexadeciltrimetilamonio
CHXD	Clorhexidina
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Tomografía Computarizada
DLS	Espectroscopía de Dispersión de Luz (del inglés <i>dynamic light scattering</i>)
DL	Carga Fármaco (del inglés <i>drug loading</i>)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiencia de Encapsulación
EPS	Matriz Compuesta de Sustancias Poliméricas Extracelulares (exopolisacáridos)
FICI	Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (del inglés <i>fractional inhibitory concentration index</i>)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (del inglés <i>Green fluorescent protein</i>)
GS	Sulfato de Gentamicina
H-NMR	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (del inglés, <i>proton- nuclear magnetic resonance</i>)
ISQ	Infecciones en el Sitio Quirúrgico
L100-55	Eudragit® L100-55
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria (del inglés <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MBC	Concentración Mínima Bactericida (del inglés <i>minimum bactericidal concentration</i>)
MOIs	Multiplicidades de Infección (del inglés, <i>multiplicity of infection</i>)

Listado de acrónimos

MRSA	<i>S. aureus</i> Resistente a la Meticilina (del inglés <i>methicillin resistant S. aureus</i>)
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCL	Policaprolactona
PCL_PEG	Copolímero Dibloque de Policaprolactona y Polietilenglicol
PDI	Índice de Polidispersidad (del inglés <i>polydispersity index</i>)
PHMB	Polihexametileno Biguanida
PVA	Acetato de Polivinilo
PVP	Polivinilpirrolidona
RIF	Rifampicina
RS100	Eudragit® RS100
S100	Eudragit® S100
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (del inglés <i>scanning electron microscopy</i>)
THY	Timol
TFA	Ácido Trifluoroacético
UP	Úlceras por Presión
UPD	Úlceras del Pie Diabético
UVP	Úlceras Venosas de la Pierna
UV-Vis	Espectroscopia de Absorción de Ultravioleta visible
PBS	Tampón Fosfato Salino
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPM	Revoluciones por Minuto
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento (del inglés <i>ultrahigh pressure liquid chromatography</i>)

Capítulo I
INTRODUCCIÓN GENERAL y
OBJETIVOS

I.1 Heridas tópicas

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y cumple una función vital como barrera protectora contra diferentes agresiones, como bacterias, xenobióticos y frente a la deshidratación. Sin embargo, cuando la estructura y el funcionamiento de esta barrera se ve dañada por diferentes factores, por ejemplo: fricción, traumas, procedimientos quirúrgicos, enfermedades como la diabetes o quemaduras, entre otros, se genera una herida tópica, la cual, dependiendo de la gravedad de la lesión, puede resultar en un desequilibrio fisiológico sustancial o incluso producir una discapacidad significativa, afectando la calidad de vida de la persona afectada¹. Por ello, es importante la investigación orientada a reducir el tiempo de cicatrización de la herida evitando así complicaciones e infecciones y que, al mismo tiempo, la piel regenerada cuente con las mismas funciones y apariencia estética.

I.1.1 Proceso de curación de heridas tópicas

Las fases de curación de una herida se pueden clasificar en 4 grandes bloques que se enumeran a continuación (Fig. 1):

1. Hemostasia (Fig. 1A): Es un proceso que comienza inmediatamente después de la lesión con el objetivo principal de detener la hemorragia mediante el estrechamiento de los vasos sanguíneos y la activación de las plaquetas y la formación de la fibrina para formar un coágulo en el lugar de la lesión. El coágulo sirve como andamiaje para las células implicadas en la fase inicial de inflamación, además de proteger al sistema vascular y al funcionamiento de los órganos vitales².
2. Inflamación (Fig. 1B): Esta fase comienza en las primeras 24 horas después de la lesión, donde los mastocitos liberan enzimas y aminas (ej., histamina) como mediadores de la inflamación que causan dolor, enrojecimiento e hinchazón. Los macrófagos, neutrófilos y monocitos son importantes para eliminar potenciales patógenos, impurezas y restos de células dañadas. Además, liberan citoquinas y factores de crecimiento que activan la regeneración del tejido en las siguientes fases³.

3. **Proliferación (Fig. 1C):** Esta fase comienza al tercer día después de producirse la lesión, y su objetivo principal es crear una barrera protectora para evitar el acceso de agentes nocivos y permitir que los procesos regenerativos sean adecuados. Los procesos clave de esta fase incluyen la angiogénesis, la migración de fibroblastos y la creación de una matriz extracelular provisional, que proporciona soporte para la epitelización⁴.
4. **Maduración/Remodelación (Fig. 1D):** Durante esta fase final, los miofibroblastos, una subpoblación de fibroblastos, desempeñan un papel esencial en la cicatrización de heridas. Estas células se contraen y producen colágeno, fortaleciendo el tejido recién formado. Los miofibroblastos también son responsables de la producción de matriz extracelular, que proporciona un andamiaje crucial para la reparación del tejido dañado. La maduración del tejido granular conduce a la organización de la nueva epidermis, culminando en el proceso de cicatrización⁴.

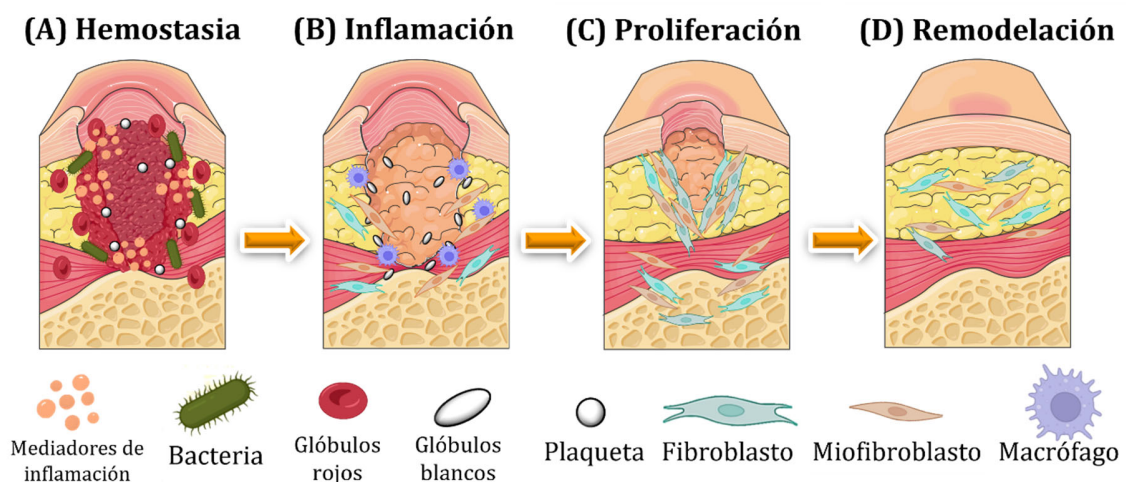


Fig. 1 Etapas del proceso de curación de heridas.

Cada etapa dentro del proceso es diferente, pero para que la curación se lleve a cabo con éxito debe haber una correcta secuencia y superposición entre cada una de las fases lo que conlleva a una curación en un corto período de tiempo.

I.1.2 Heridas agudas y crónicas

La curación de una herida implica procesos complejos y coordinados a nivel celular, molecular y humoral. Cuando todas las fases anteriormente descritas ocurren fisiológicamente de manera exitosa y en el orden correcto, a la lesión se le conoce como herida aguda y en la mayoría de los casos, estas heridas no necesitan intervención hospitalaria⁵ produciéndose una regeneración perfecta del tejido. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la curación de las heridas conduce a la formación de cicatrices dada una elevada respuesta fibrótica, y en otros casos, debido a distintas causas, el proceso de curación se alarga en el tiempo y puede conducir a la generación de heridas crónicas.

Una herida se considera crónica si no muestra mejoría después de 4 semanas. Esta condición se debe a un estado de inflamación patológica que resulta en un proceso prolongado, descoordinado y en ocasiones incompleto de curación⁶, lo que puede resultar en cicatrización deficiente o disfunción anatómica de la zona lesionada. Las úlceras de pie diabético (UPD), úlceras venosas en la pierna (UVP), úlceras por presión (UP), infecciones en el sitio quirúrgico (ISQ), abscesos y úlceras traumáticas⁷ son algunos de los tipos más prevalentes de heridas crónicas. Además, factores negativos internos y externos, como trastornos metabólicos, deficiencias en el sistema inmunológico, lesiones vasculares, circulación sanguínea deficiente, diabetes, mala alimentación, edad avanzada, inactividad o un tratamiento inadecuado, pueden obstaculizar la progresión adecuada del proceso de curación de la herida, aumentando la cronificación. Cuando una herida se encuentra en un estado de inflamación patológica, como en el caso de las úlceras diabéticas³, la alta concentración de glucosa en la sangre puede prolongar la inflamación y afectar a la liberación adecuada de factores de crecimiento necesarios para una cicatrización adecuada. Esto puede resultar en retrasos en la curación de la herida y aumentar el riesgo de infección, lo que complica aún más el tratamiento. Las heridas crónicas no solo impactan negativamente en la calidad de vida del paciente, sino que también representan un problema de salud pública. A nivel mundial, la prevalencia global de diabetes en personas de 20 a 79 años se estimó en un 10.5% en 2021, lo que equivale a 536.6 millones de personas⁸. En

Europa, específicamente, la cantidad de personas con diabetes supera los 55 millones, de las cuales aproximadamente 8 millones presentan un riesgo potencial de desarrollar úlceras en los pies debido a su condición. Lamentablemente, la ineficacia en el tratamiento de estas úlceras contribuye a un alarmante número de amputaciones de extremidades inferiores, estimadas en alrededor de 450,000 casos anuales, con un coste económico que oscila entre 2-2.5 mil millones de euros⁹.

Estas heridas crónicas son una preocupación creciente para los profesionales de la salud, debido a que otras patologías crónicas asociadas, como la hipertensión venosa y la diabetes, están en aumento debido al envejecimiento de la población y representan un alto coste para los sistemas de salud pública. Para favorecer la curación y cicatrización de una herida es necesario no solo poner atención en el tratamiento y cuidados si no también considerar otras patologías potencialmente pre-existentes además de abordar los aspectos fisiológicos presentes en el ambiente de las lesiones, como el pH¹⁰.

I.1.3 Variaciones del pH en las diferentes etapas de curación de una herida

Dentro del proceso de curación de una herida existen diferentes factores fisiológicos que pueden influenciar este proceso, uno de ellos es el pH¹¹. Normalmente, la piel tiene un pH entre 4 y 6^{11,12}, que es óptimo para la salud de la piel en términos de hidratación, mantenimiento de la microbiota natural, descamación natural y función como barrera cutánea¹³, aunque puede variar según la localización anatómica y la edad de la persona.

Se ha descrito que cuando ocurre una lesión, las heridas agudas pueden presentar un proceso de acidosis fisiológica (Fig. 2A), provocada por la generación de ácidos orgánicos, como el ácido láctico, ayudando a la producción de colágeno y a la proliferación de fibroblastos durante el proceso de cicatrización^{14,15}. Por el contrario, en las heridas crónicas se ha observado un desplazamiento en el pH hacia unas condiciones más alcalinas¹⁶ (pH >7) que persiste por mucho tiempo (Fig. 2B). Aunque este fenómeno no ha sido completamente corroborado y se necesiten muchos más datos recogidos de manera sistemática¹¹, resulta de gran interés debido a que este cambio en

el pH puede ser un indicador temprano de infección en la herida¹⁷ o puede provocar efectos que impidan la curación correcta de la misma. Este aumento de la alcalinidad puede deberse a la presencia de microorganismos, especialmente anaeróbicos, que generan subproductos, como el amoníaco y las poliaminas, que pueden tener un impacto adverso en la oxigenación del tejido de la herida, y, además, mediante el proceso de necrosis, contribuyen a crear un entorno más alcalino en la herida¹⁶.

Durante el proceso de curación de una herida, el pH puede variar según la fase en la que se encuentre. Se han realizado estudios que demuestran que el pH promedio durante la fase de hemostasia es de 5.7 ± 0.5 , mientras que, durante la fase de inflamación y proliferación, los valores de pH aumentan a 6.9 ± 1 y 7.6 ± 0.2 , respectivamente¹⁸. Estos datos indican una clara diferencia en el pH de una herida en una fase temprana en comparación con una fase crónica, a menos que se produzca la reepitelización durante la fase inflamatoria, la cual reduce el pH¹⁸.

Los valores altos de pH pueden tener varios efectos en el proceso de curación de la herida. Por un lado, pueden aumentar la probabilidad de infección, ya que muchos microorganismos patógenos requieren un ambiente alcalino ($\text{pH} > 6$) para proliferar, mientras que ambientes ácidos inhiben su crecimiento¹². Por otro lado, algunas enzimas relacionadas con la degradación del tejido, como la elastasa o la plasmina, tienen números de recambio elevados a pHs mayores que 7, lo cual puede ser perjudicial para la reconstrucción del tejido^{11,12}.

Una variación en el pH puede también afectar la efectividad de los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones. El pH puede tener varios efectos en la actividad de los antibióticos, como alterar su eficacia al modular las interacciones moleculares del fármaco o afectar a los sitios específicos donde el antibiótico debe actuar, lo que puede hacer que las bacterias sean más o menos tolerantes a los antibióticos¹⁶.

Como se ha dicho anteriormente, aunque se dispone de una amplia información, los cambios en el pH en el interior de una herida aún no son concluyentes y requieren de más estudios sistemáticos. Sin embargo, varios investigadores han sugerido que la

medición del pH puede ser una herramienta útil tanto en el diagnóstico de las infecciones tóxicas como en el tratamiento de la herida ^{11,19,20}.

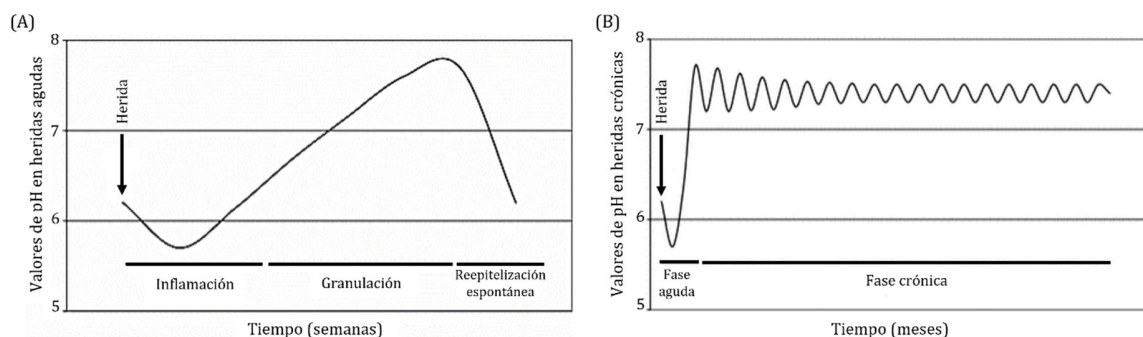


Fig 2. Variaciones del pH en (A) heridas agudas y (B) heridas crónicas. (Adaptada de Scheneider et al.)¹¹

Se han realizado investigaciones que han establecido una correlación entre el pH superficial de la piel y los patrones de colonización bacteriana. Los estudios han demostrado que a niveles de pH ácido (pH 4.7), la bacteria comensal *S. epidermidis* presenta un crecimiento óptimo, mientras que la bacteria *S. aureus* experimenta una fuerte inhibición de su crecimiento en comparación de cuándo se encuentra en un medio alcalino (pH 7.9)²¹. Estos hallazgos resaltan la importancia del pH cutáneo en la regulación de la colonización bacteriana y su potencial impacto en la salud de la piel. En un estudio realizado por Sim *et al.*²² se demostró que el tratamiento con tampones de ácido cítrico y fosfórico fue más efectivo que el uso de una solución salina de hidróxido de sodio para favorecer la reepitelización en un modelo *in vivo*. Específicamente, al séptimo día de tratamiento, se observó una mayor regeneración epitelial en los animales tratados con los tampones de ácido cítrico y fosfórico en comparación con los tratados con la solución salina de hidróxido de sodio.

I.2 Infecciones en heridas crónicas

I.2.1 Evolución cinética de una infección

Uno de los principales problemas de las heridas agudas es el contacto directo con agentes microbianos y su proliferación dentro del área afectada lo cual puede conllevar a una posible infección²³. Aun cuando las bacterias comensales son una parte

común en la microbiota cutánea hay que considerar que, en las heridas, se ha establecido el límite de 10^5 CFU/mL de bacterias como el límite entre la colonización y una infección clínicamente relevante que pueda afectar negativamente la cicatrización de la herida²⁴.

Cuando una herida permanece abierta, se encuentra más expuesta al ambiente y su interacción con los microorganismos puede ser descrita en tres etapas (Fig. 3)²⁵: contaminación, colonización e infección. La contaminación se refiere a la presencia de microorganismos en la herida abierta que aún no han comenzado a replicarse. Sin embargo, una vez que encuentran un medio favorable, comienzan a proliferar, lo que lleva a la etapa de colonización. Aunque la presencia de un pequeño número de microorganismos generalmente no afecta a los procesos de inflamación y cicatrización de la herida²⁶.

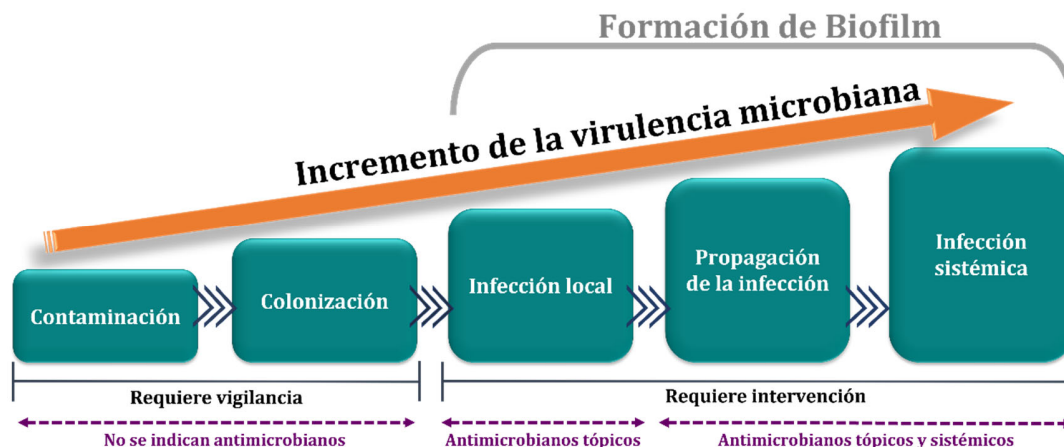


Fig. 3 Etapas y tratamientos de la infección en heridas.

Con el tiempo, si los microorganismos migran a una zona más profunda de la herida, la colonización progresa a una infección local, lo que puede prolongar la fase inflamatoria de la curación de la herida y provocar daño en el tejido²⁷. Es importante tener en cuenta que la contaminación en las heridas es polimicrobiana, lo que significa que contiene no solo bacterias, sino también hongos y otros microorganismos. Más adelante, se abordará en detalle la presencia de estos distintos microorganismos y su impacto en el proceso de cicatrización. Esta acción microbiana desencadena una respuesta inmunológica con síntomas como enrojecimiento, inflamación, calor y dolor.

Es importante señalar que clasificación en estas etapas sigue debatiéndose, ya que no todas las infecciones en heridas crónicas progresan a través de todas las etapas, y que la velocidad y la gravedad de la progresión de la infección pueden variar dependiendo de factores como el tipo de microorganismo involucrado, la respuesta inmunológica del paciente y la presencia de otros problemas de salud²⁸.

I.2.2 Biofilm

La presencia y replicación de las células bacterianas pueden desencadenar la producción de una matriz compleja protectora, llamada biofilm, que está presente en la mayoría de las heridas crónicas, que provoca que las heridas infectadas sean más difíciles de tratar²⁹. El biofilm se define como una comunidad estructurada de células microbianas firmemente adheridas a una superficie e incrustadas en una matriz compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Esta matriz comprende exopolisacáridos, ácidos nucleicos (ADNe y ARNe), proteínas, lípidos y otras biomoléculas³⁰. La presencia del biofilm protege a las bacterias de cualquier agente antimicrobiano e incluso del sistema inmune del hospedador, evitando el efecto de los cambios fisiológicos que podrían ser beneficiosos para la erradicación de la infección y la correcta cicatrización de la herida^{16,31}.

El desarrollo de un biofilm comprende cinco etapas claramente definidas y que se esquematizan en la Fig. 4. En la primera etapa (Fig. 4A), las células bacterianas se adhieren de manera reversible a la superficie a través de apéndices móviles como los flagelos. Posteriormente, esta adhesión se vuelve irreversible en una segunda etapa (Fig. 4B), lo que marca un punto crítico en el proceso. En la tercera y cuarta etapa (Fig. 4C y 4D), se produce una propagación de las bacterias en el interior de la EPS, formando microcolonias y evidenciando la maduración del biofilm. En la última etapa (Fig. 4E), el centro de la microcolonia se rompe mediante un proceso de autólisis, liberando células bacterianas dispersas que tienen la capacidad de colonizar nuevas zonas y así reiniciar el ciclo de desarrollo del biofilm. Estas etapas son esenciales para producir una matriz de polisacáridos densa que actúa como una barrera protectora y complica la eliminación del patógeno³²⁻³⁴.

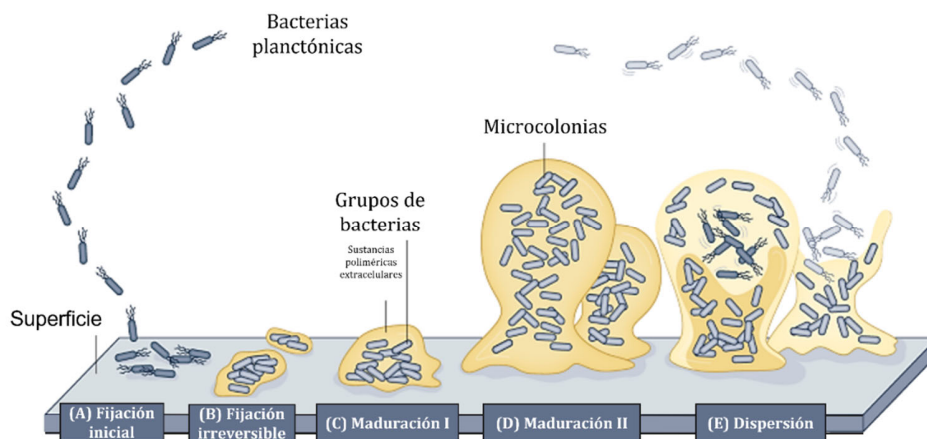


Fig. 4 Etapas de desarrollo de biofilm (Adaptada de Sauer et al.)³⁵

Una vez que se ha formado el biofilm, algunos patógenos promueven la inflamación causando mayor daño al tejido permitiendo que la infección local se propague al sistema, lo que puede provocar complicaciones graves como sepsis, shock séptico, fallo orgánico e incluso la muerte^{36,37}.

I.2.3 Patógenos y microbioma en heridas infectadas

La superficie cutánea aloja una comunidad de microorganismos residente conocida como microbiota comensal, la cual desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la salud humana. Sin embargo, en el caso de heridas crónicas, es común encontrar una colonización de comunidades polimicrobianas en la zona afectada, que pueden ser patogénicas y que pueden variar en composición dependiendo de la naturaleza de la herida. Estas comunidades polimicrobianas suelen estar compuestas principalmente por bacterias, hongos y virus, los principales especímenes de cada tipo de microorganismo se presentan en la tabla 1.

Como se mencionó previamente, estos microorganismos pueden coexistir y, en algunos casos, incluso establecer relaciones simbióticas que favorecen la infección de la herida. Por ejemplo, en el caso de *Candida spp.*, cuando la herida alcanza un pH alcalino, el hongo cambia a su fenotipo de micelio³⁸, el cual está asociado con la formación de biofilm. Cuando se une a la bacteria *S. aureus*, se forma una adhesión de hifas, lo que resulta en un biofilm sinérgico más denso, protegiendo aún más a la bacteria contra agentes antimicrobianos³⁹.

Tabla 1. Lista de patógenos asociados con infecciones de heridas crónicas (modificado de Church *et al.*, 2006⁴⁰⁻⁴²)

Grupo	Patógenos
Bacterias aerobias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (incluyendo <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina) <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Estafilococos coagulasa negativos</i> <i>Enterococcus spp.</i> (incluyendo enterococos resistentes a la vancomicina) <i>Streptococcus pyogenes</i>
Bacterias aerobias Gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> Especies de <i>Enterobacter</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aeromonas spp.</i>
Bacterias anaerobias	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Bacteroides spp.</i> <i>Peptococcus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Fusobacterium spp.</i>
Hongos	<i>Candida spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Alternaria spp.</i> <i>Rhizopus spp.</i> <i>Mucor spp.</i> <i>Candida parapsilosis</i>
Virus	Virus del herpes simple Citomegalovirus Virus del papiloma humano (VPH)

Otro ejemplo es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), la cual, mediante la producción de alginatos, puede fortalecer un biofilm formado por múltiples especies. Por este mecanismo puede establecer una relación simbiótica y contribuir a la formación de biofilms más robustos en heridas crónicas u otras condiciones propicias para la infección⁴³. Aunque la presencia de diferentes microorganismos y sus relaciones

simbióticas son relevantes en las infecciones en heridas crónicas, en esta tesis se abordará únicamente la infección por bacterias. También se excluyen las relaciones establecidas entre esta microbiota comensal y el sistema inmunitario del hospedador, relaciones que están ampliamente descritas en varios artículos de revisión^{44,45}.

Aunque, como ya se mencionó anteriormente, hay muchas bacterias comensales que son parte fundamental de la microbiota del cuerpo humano, es importante destacar que una gran proporción de las infecciones son causadas por bacterias comensales o exógenas, especialmente cuando hablamos de heridas crónicas, lo que subraya la necesidad de investigar en su tratamiento y prevención. Este conocimiento es fundamental para abordar la problemática de las infecciones bacterianas en la práctica clínica y desarrollar estrategias eficaces para su control.

La composición de la microbiota comensal de la piel no siempre coincide con la que se encuentra en las heridas, y se ha establecido una correlación entre la presencia abundante de bacterias aeróbicas y la demora en la cicatrización de las heridas⁴⁶. En las infecciones de heridas crónicas, se pueden identificar diferentes tipos de bacterias, siendo las más frecuentes entre las aeróbicas Gram-positivas las de la familia *Staphylococcus* (*aureus* y *epidermis*), *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus faecalis*, y las anaerobias Gram-positivas como *Fingoldia* y *Peptoniphilus*. Asimismo, la presencia de bacterias Gram-negativas es predominante en las infecciones de heridas crónicas, destacando especies como *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter*⁴⁷⁻⁴⁹. Sin embargo, la composición microbiológica de la herida varía de acuerdo a factores como la ubicación anatómica y la humedad de la zona lesionada. Por ejemplo, los sitios que contienen muchas glándulas sebáceas a menudo presentan una carga bacteriana más alta⁵⁰. Además, la microbiota presente en la herida no es estática sino dinámica⁵¹, lo cual complica mucho más su tratamiento. Finalmente, una gran cantidad de bacterias no son cultivables por los métodos estándar por lo que su identificación clínica queda limitada a no ser que se usen técnicas moleculares (ej., PCR)⁵².

La formación de biofilm en las heridas crónicas es de suma importancia, ya que, como se ha dicho anteriormente, la resistencia de la matriz extracelular dificulta la

acción de los agentes antibacterianos, como los antibióticos. Entre las especies encontradas en los biofilms de heridas crónicas están *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, siendo las más frecuentes *P. aeruginosa*, las especies de estafilococos y *E. coli* ⁵³.

La formación del biofilm es un proceso que también facilita a las bacterias el desarrollo de resistencia a los antibióticos debido a que en estas condiciones sésiles las bacterias son más susceptibles a desarrollar mutaciones espontáneas que favorecen mecanismos de resistencia como consecuencia de la evolución mediante selección natural⁵⁴. Este fenómeno implica que los microorganismos mutados adquieran la capacidad de sobrevivir o resistir los efectos de los antibióticos a dosis que teóricamente los eliminarían, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones⁵⁵. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal causa del desarrollo de esta resistencia es el uso inadecuado, excesivo y en ocasiones innecesario de los antibióticos⁵⁶.

La resistencia a los antibióticos puede surgir a través de varios mecanismos: mutaciones genéticas, transmisión horizontal de genes de resistencia, producción de enzimas que inactivan los antibióticos, cambios de permeabilidad de la membrana celular, expulsión del antibiótico fuera de la célula, modificación del sitio de acción del antibiótico, entre otros.⁵⁷ Estos mecanismos son posibles debido a la habilidad de las bacterias para mutar rápidamente y transferir ADN, lo que les permite evadir o neutralizar los efectos bactericidas de los antibióticos. Estas mutaciones pueden ocurrir de manera natural o ser adquiridas a través de la transferencia de genes entre microorganismos, lo que facilita la propagación de la resistencia⁵⁸.

Considerando la complejidad de las heridas crónicas y los diversos factores presentes, entre ellos, la presencia de una mezcla de patógenos en la herida, la formación de biofilm y el riesgo de presentar o generar bacterias resistentes a antibióticos, resulta de vital importancia seleccionar un tratamiento adecuado que se ajuste a las condiciones específicas de la zona afectada. Es primordial que dicho tratamiento sea eficaz con el fin de garantizar una óptima y rápida recuperación de la herida.

I.3 Tratamientos farmacológicos para la curación de heridas

Cuando se genera una herida, el primer paso fundamental en su cuidado es realizar una limpieza profunda y posteriormente cubrirla con un apósito. Sin embargo, si la herida persiste sin cicatrizar durante más de 4 semanas, a pesar de estos cuidados iniciales, se clasifica como una herida crónica, como se mencionó previamente, y requiere enfoques terapéuticos más específicos.

Antes de aplicar agentes externos, la mayoría de las heridas crónicas se someten a un proceso de desbridamiento, que implica la eliminación de las áreas de piel que presentan inflamación o necrosis. Posteriormente, se pueden utilizar distintos tratamientos tales como la aplicación de apósitos específicos, de antisépticos, antibióticos, vendajes de compresión, terapia hiperbárica de oxígeno, terapia electromagnética, terapia de presión negativa e incluso implantes de piel, en caso de que la herida tenga gran extensión y se considere poco probable que cierre por sí sola^{23,59}. En esta tesis nos centraremos en los principales compuestos farmacológicos que son utilizados para controlar las infecciones en heridas crónicas: antisépticos, antibióticos y compuestos bactericidas que pueden ser sistémicos o tópicos.

I.3.1 Antisépticos

Durante el procedimiento clínico de cuidado de una herida, para su limpieza se utiliza medio salino como enjuague inicial para eliminar contaminantes y restos de tejido, aunque no posee acción antibacteriana. Sin embargo, con el objetivo de prevenir infecciones, se emplean antisépticos, que son sustancias químicas capaces de inhibir o reducir la proliferación de microorganismos causando un daño mínimo al tejido vivo⁶¹. Para que un antiséptico se considere eficiente debe actuar contra el mayor número y variedad de microorganismos posibles, difundir a través de la materia orgánica presente en la herida, como exudados, y no lesionar los tejidos⁶². Como limitación, los antisépticos no son selectivos y eliminan los microorganismos patógenos, pero también parte de las células del hospedador, sin embargo, éste posee procesos regenerativos que hacen que esas células puedan ser reemplazadas fácilmente.

Entre los antisépticos utilizados para la limpieza de heridas, los dos más comunes son la clorhexidina (CHXD) y la iodopovidona (también conocida como polividona yodada), seguidos por el peróxido de hidrógeno, el hipoclorito diluido y algunos compuestos conteniendo plata. Es importante tener en cuenta que el uso constante de ciertos compuestos, como la CHXD, puede tener efectos perjudiciales en el tejido de la herida⁶³⁻⁶⁵, especialmente a nivel celular sobre fibroblastos y queratinocitos, además de crear potencialmente resistencia bacteriana⁶⁶. Dicha resistencia es poco frecuente ya que los antisépticos presentan múltiples mecanismos de acción antimicrobiana por lo que la probabilidad de que las bacterias desarrollen múltiples mecanismos de resistencia se minimiza. Los mecanismos de acción de los antisépticos son causar daño a la membrana celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la replicación de su ADN y la desactivación de las bacterias a través de la oxidación y alteración de sus enzimas, entre otros^{63,67}.

I.3.2 Antibióticos

Entre los antibióticos sistémicos en caso de infección bacteriana severa se encuentran las penicilinas, como la amoxicilina; las cefalosporinas, como la cefalexina; los aminoglucósidos, como la gentamicina; los macrólidos, como la eritromicina; y las quinolonas, como el ciprofloxacino. Sin embargo, a pesar de que estos antibióticos son en su mayoría de amplio espectro, la aplicación de antibiótico sistémico para el tratamiento de una infección en una herida puede presentar efectos adversos, como una mayor probabilidad de que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos y la dificultad de acceder al lugar infectado, especialmente en presencia de biofilm^{68,69}.

En cambio, los antibióticos tópicos son más utilizados para heridas infectadas debido a que la administración directa sobre la herida asegura una mayor concentración del antibiótico en contacto directo con la infección, y reduce la propagación del antibiótico en el sistema y, por lo tanto, los efectos secundarios⁷⁰. Sin embargo, excepto en algunos casos muy específicos, el tratamiento con antibióticos tópicos sobre heridas está desaconsejado. Algunos de los antibióticos tópicos utilizados son la neomicina, clindamicina, mupirocina, ácido fusídico y polimixina B. Sin embargo, su efectividad se ve reducida cuando la herida ha desarrollado un biofilm, ya que,

además del efecto impermeabilizante, las bacterias dentro del biofilm se encuentran en un estado metabólico latente y algunos de estos antibióticos son más efectivos contra bacterias metabólicamente activas. Por lo tanto, la aplicación de agentes anti-biofilm junto con la aplicación de antibióticos tópicos puede tener un mayor valor terapéutico en el tratamiento de infecciones^{68,71,72}.

El mecanismo de acción de los antibióticos se basa en la interrupción de procesos esenciales tanto internos como estructurales en la célula bacteriana. Estos procesos incluyen la inhibición de la síntesis de la pared celular (los antibióticos betalactámicos y glucopéptidos), la inhibición de la síntesis de proteínas (los aminoglucósidos y tetraciclinas), la interferencia con la síntesis de ácido nucleico (las quinolonas y sulfonamidas), el bloqueo del metabolismo bacteriano (las sulfonamidas y trimetoprimas) y la disrupción de la membrana celular (las polimixinas).

En estos procesos, los antibióticos interrumpen la capacidad de la bacteria para obtener los nutrientes necesarios para su supervivencia, replicación y transmisión de su material genético. Como se ha mencionado, los antibióticos como las polimixinas alteran la membrana celular bacteriana, causando la liberación de los componentes celulares y finalmente provocando la muerte de la bacteria^{57,73,74}.

Es importante destacar que, como es bien sabido, los antibióticos actúan de manera selectiva sobre las bacterias, ya que, en su mayoría, estos medicamentos no afectan a las células humana a las dosis de uso. Esto los hace una herramienta valiosa en el tratamiento de las infecciones bacterianas por lo que es fundamental su uso adecuado para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana y asegurar su eficacia a largo plazo.

Sin duda, los antibióticos y antisépticos son herramientas valiosas en el tratamiento y prevención de infecciones causadas por microorganismos, como las bacterias. Sin embargo, debido al aumento de la resistencia bacteriana y a la necesidad de desarrollar enfoques más efectivos y sostenibles, la investigación de nuevas estrategias para la eliminación de microorganismos o para lograr una liberación controlada de los fármacos antimicrobianos es primordial.

I.3.3 Alternativas a los antibióticos

Debido a la creciente problemática de la resistencia bacteriana y la estimación de que para el año 2050 ésta podría causar hasta 10 millones de muertes anuales⁷⁵, es imperativo desarrollar alternativas en la lucha contra las infecciones causadas por microorganismos. Entre las nuevas estrategias en estudio, destacan, entre otros, los fármacos antimicrobianos derivados de fuentes naturales, como los péptidos antimicrobianos, el quitosano y los retinoides, así como los compuestos obtenidos de plantas, tales como el cinamaldehído, la curcumina, el ascorbato y los tocoferoles, los cuales han demostrado potencial para combatir infecciones resistentes a los antibióticos tradicionales⁷⁶. Además, la terapia con bacteriófagos, que utiliza virus que infectan y destruyen bacterias específicas, ha recuperado el interés de la comunidad científica como una opción viable para el tratamiento de infecciones bacterianas⁷⁷. En esta tesis doctoral, nos centraremos en el uso de compuestos presentes en aceites esenciales, que han demostrado ser eficaces antibacterianos actuando como antisépticos.

I.3.3.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) son compuestos químicos orgánicos sintetizados por plantas como metabolitos secundarios con fines de señalización y defensa, estos compuestos químicos naturales se han utilizado desde la antigüedad debido a sus propiedades antisépticas, bactericidas, antifúngicas y aromáticas por lo que se utilizan ampliamente en la industria cosmética, la industria alimentaria y la industria farmacéutica^{78,79}. Además, su uso medicinal es amplio debido a que también poseen propiedades analgésicas, sedantes, antiinflamatorias y anestésicas, lo que los hace útiles en el tratamiento de diversas afecciones⁸⁰.

Los AEs han sido objeto de una amplia investigación científica, y se ha demostrado que tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus^{80,81}.

Un ejemplo de ello es el cinamaldehído que se ha demostrado que inhibe la formación de biofilm de diversas bacterias como por ejemplo de *P. aeruginosa*⁸². Por otro lado, se ha investigado el uso de AEs en el tratamiento de infecciones sobre heridas

tópicas, por ejemplo, el aceite esencial de tomillo, que contiene dos compuestos mayoritarios timol y carvacrol⁸³, con propiedades antimicrobianas y antioxidantes favorables para la curación de heridas. Algunos estudios han demostrado que pueden ayudar a combatir las infecciones de heridas, disminuyendo la colonización de patógenos, promoviendo la cicatrización, y reduciendo la inflamación^{84,85}. Algunos de los principales AEs utilizados para el tratamiento de heridas crónicas están recopilados en la Tabla 2.

Tabla 2. Aceites esenciales: propiedades y aplicaciones^{86,87}

Aceite Esencial	Propiedades	Aplicación Bactericida	Microorganismos objetivo
Aceite de Cajuput (Melaleuca cajuputi)	Antibacteriano	Inhibe el crecimiento de diversas bacterias	<i>Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Corynebacterium diphtheriae, Enterococcus faecium, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Klebsiella spp.</i>
Aceite de Canela (Cinnamomum verum)	Antibacteriano, Antiviral	Inhibe el crecimiento de bacterias y virus	<i>Bacillus cereus, Bacillus subtilis, E. coli, Salmonella typhi, Listeria monocytogenes, Candida albicans</i>
Aceite de Clavo (Syzygium aromaticum)	Antiviral	Inhibe el crecimiento de virus	Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1)
Aceite de Eucalipto (Eucalyptus globulus)	Antibacteriano, Antiviral	Inhibe el crecimiento de bacterias y virus	<i>E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, Candida albicans</i>
Aceite de Salvia (Salvia officinalis)	Antibacteriano, Antiviral	Inhibe el crecimiento de bacterias y virus	<i>E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhi, S. aureus, Candida albicans</i>
Aceite de Árbol de Té (Melaleuca alternifolia)	Antibacteriano, Antiviral	Inhibe el crecimiento de bacterias y virus	<i>S. aureus, E. coli, S. mutans, Listeria monocytogenes, Candida albicans</i>

Aceite de Incienso (Boswellia carteri, Frereana & Sacra)	Antiinflamatorio	Mejora el sistema inmunológico, alivia el dolor y la inflamación	<i>S. aureus, E. coli, P aeruginosa, K. pneumonia</i>
Aceite de Lavanda (Lavandula angustifolia)	Calmante, Antibacteriano	Acelera la cicatrización de heridas, disminuye el estrés oxidativo	<i>S. aureus, P. aeruginosa, Candida albicans</i>
Aceite de Menta (Mentha piperita)	Antibacteriano, Antiviral	Inhibe el crecimiento de bacterias y virus, eficaz contra bacterias resistentes a antibióticos	<i>E. coli, P. aeruginosa, S. enterica, S. aureus</i>
Aceite de Tomillo (Thymus sp.)	Antibacteriano	Tratamiento de lesiones cutáneas, actúa	<i>S. aureus, Klebsiella pneumoniae</i>
Aceite de Pino (Pinus sylvestris)	Antibacteriano	Tratamiento de infecciones	<i>S. aureus, E. coli, C. albicans</i>
Aceite de Hinojo (Foeniculum vulgare)	Antibacteriano	Tratamiento de infecciones	<i>Salmonella enteritidis y S. typhimurium</i>

I.4 Sistemas de liberación de fármacos para heridas tópicas

I.4.1 Nanomateriales para liberación de fármacos en heridas

Como se ha dicho anteriormente, el empleo de agentes bactericidas o con propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano y de la formación del biofilm representa una estrategia valiosa en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones incluyendo heridas tópicas infectadas. No obstante, en términos de administración de los mismos, se busca constantemente investigar y desarrollar métodos más eficaces y controlados que permitan una liberación localizada de estos agentes antibacterianos, con el fin de potenciar sus efectos terapéuticos minimizando

sus efectos secundarios. Para ello, la nanotecnología ha emergido como una prometedora área para aportar soluciones, con la utilización de diferentes materiales (Fig. 5) como las partículas nanométricas como sistemas de liberación controlada, hidrogeles, la síntesis de copolímeros y la formación de apósitos nanoestructurados mediante técnicas de electrohilado con polímeros innovadores⁸⁸. La encapsulación de fármacos en nanopartículas permite, entre otras ventajas, ofrecer liberación controlada o sostenida de los principios activos contenidos en ellas, direccionar el fármaco hacia las zonas necesitadas de terapia, cruzar barreras biológicas, aumentar la solubilidad y biodisponibilidad, reducir efectos secundarios en tejidos sanos, mejorar la farmacocinética respecto a la dosis equivalente del mismo fármaco en su estado libre, aumentar el tiempo de vida media en sangre, etc. Por otro lado, el electrohilado permite obtener fibras poliméricas a escala nanométrica que muestran una elevada relación superficie/volumen, la cual facilita la liberación de principios activos contenidas en ellas, permite controlar la porosidad, la orientación de las nanofibras sintetizadas, permite encapsular principios activos de una manera no-térmica y eficaz, y, entre otras cosas, proporciona estabilidad a principios activos encapsulados en dichas nanofibras.



Fig. 5 Principales tipos de nanomateriales utilizados en el tratamiento de curación de heridas.

La nanotecnología se enfoca en la síntesis, estructura y dinámica de materiales, estructuras y dispositivos de tamaño nanométrico (hasta 100 nm)⁸⁹, lo cual implica una relación superficie/volumen elevada en los nanomateriales, lo cual es favorable para diversas aplicaciones biomédicas incluyendo la terapia y el diagnóstico,

proporcionando además propiedades mecánicas, magnéticas, ópticas y catalíticas específicas debido a los fenómenos superficiales⁹⁰. El tamaño y la forma de estos materiales son propiedades cruciales que influyen en su eficacia biológica, incluyendo su capacidad de carga y liberación de fármacos, permeabilidad y respuesta celular, siendo el desarrollo de apósitos y de nanopartículas dos de los sistemas más prometedores en la liberación de fármacos y, concretamente para el tratamiento de heridas⁹¹.

I.4.2 Apósitos

Los apósitos han sido ampliamente utilizados como tratamiento en heridas para mantener una cobertura que actúe como barrera mecánica y frente a xenobióticos, mantener el ambiente local y permitir la absorción de exudados y la transpiración. Estos apósitos se clasifican según su función y localización en la herida⁹². En este sentido, se distinguen dos tipos de apósitos: los primarios, que tienen un contacto directo con la herida y los secundarios, que se utilizan para proteger al apósito primario o para la absorción de exudados. Debido a su contacto directo con el tejido lacerado las características que deben tener los apósitos son de vital importancia para que permitan que el proceso de cicatrización siga su curso correctamente e incluyen:

- a) Biocompatibles a nivel celular con el tejido, sin causar ningún tipo de citotoxicidad, reacción cutánea o inflamación.
- b) Capacidad de absorber exudados para mantener la herida en un ambiente con la humedad adecuada.
- c) Flexibilidad para adecuarse al movimiento de la piel, pero lo suficientemente resistente para asegurar tiempos largos en contacto con la herida.
- d) Porosidad para permitir el intercambio de oxígeno y agua con el ambiente.
- e) Adicionalmente, diversas propiedades bioquímicas apropiadas pueden ser convenientes por ejemplo que contengan compuestos antibacterianos, compuestos que puedan facilitar la adhesión celular, que sean antioxidantes, anestésicos, regenerativos, etc.⁹³⁻⁹⁵

Estas últimas características buscan no solo mejorar las propiedades intrínsecas de los apósitos, sino además son capaces de modificar las características fisiológicas de la herida para optimizar la curación a través de la aceleración de la debridación, fomentando la reepitelización, controlando los niveles de exudado y la carga bacteriana. A este tipo de apósitos que contienen principios activos en su formulación se les conoce como apósitos avanzados⁹². Existen diferentes de apósitos, algunos disponibles comercialmente, los cuales se muestran en la Tabla 3, entre los tipos de apósitos cabe destacar:

1. Apósitos de película semipermeable: están hechos de poliuretano poroso transparente y adherente, lo cual les permite el intercambio de vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, a la vez que son impermeables a las bacterias. Aunque las primeras películas de poliuretano no se utilizaban en heridas con alta exudación debido a su capacidad limitada de absorción y riesgo de maceración de la herida, los apósitos de película semipermeable actuales son altamente elásticos y flexibles, adhiriéndose a la piel sin requerir adhesivo adicional y son transparentes, lo que permite inspeccionar la herida sin retirar el apósito. Se recomiendan para heridas superficiales y poco profundas con baja exudación⁹⁶.
2. Apósitos de espuma: son una opción de tratamiento no oclusivo para heridas exudativas, compuestos por una espuma de hidrofiliidad controlada con bordes adhesivos. Son adaptables a la forma de la herida, y su capacidad de absorción varía según el grosor de la espuma. Son adecuados para úlceras en las piernas y heridas con exudación de moderada a alta, y se utilizan como apósitos primarios debido a su alta capacidad de absorción y permeabilidad al vapor de agua, evitando la necesidad de apósitos secundarios^{97,98}.
3. Hidrogeles: son materiales hidrofílicos insolubles hechos de polímeros sintéticos como los poli(metacrilatos) y la polivinilpirrolidona (PVP). Tienen un alto contenido de agua (70-90%) que ayuda a la formación de tejido de granulación y epitelio en un ambiente húmedo. La propiedad elástica de los hidrogeles permite una fácil aplicación y retirada sin dañar la herida una vez que haya sanado. Además de que proporciona un efecto calmante y refrescante al bajar la

temperatura de las heridas. Se utilizan para heridas crónicas secas, heridas necróticas, úlceras por presión y quemaduras. Sin embargo, cuando se tiene una herida muy infectada o con drenaje abundante no es recomendable utilizar este tipo de apósitos porque, por su alto contenido acuoso, puede causar proliferación bacteriana. Por otro lado, pueden usarse en cualquier etapa del proceso de cicatrización ya que son no irritantes, no reactivos con los tejidos biológicos y permeables a los metabolitos⁹⁸⁻¹⁰⁰.

4. *Hidrocoloides*: Son apósitos compuestos por una capa interna coloidal y una capa externa impermeable al agua líquida, como el exudado de una herida. Están hechos de agentes formadores de gel como carboximetilcelulosa, gelatina y pectina, junto con otros materiales como elastómeros y adhesivos. Se utilizan comúnmente en heridas con exudado de leve a moderado, como úlceras por presión, quemaduras menores y heridas traumáticas. Al entrar en contacto con el exudado de la herida, forman geles que proporcionan un ambiente húmedo y ayudan a proteger el tejido de granulación, pero generalmente se utilizan como vendas secundarias en donde los apósitos hidrocoloides se colocan sobre el apósito primario y se adhieren a la piel circundante^{96,101}.
5. *Alginatos*: son derivados de sales de sodio y calcio de algas marinas por lo que son absorbentes y biodegradables. Forman un gel hidrofílico que limita los exudados de la herida y minimiza la contaminación bacteriana. Algunos estudios sugieren que los alginatos pueden acelerar la cicatrización al activar a los macrófagos y producir una señal pro-inflamatoria. Sin embargo, no son adecuados para heridas secas debido a que necesitan exudados para formar un gel hidrofílico y funcionar correctamente. En el caso de quemaduras de tercer grado y heridas graves con exposición ósea, los alginatos pueden no proporcionar el nivel de protección y cobertura necesarios, ya que estas heridas suelen requerir un cuidado más especializado y enfoques terapéuticos específicos para promover una adecuada cicatrización y prevenir infecciones^{101,102}.

Tabla 3. Apósitos comerciales disponibles²³

Tipos de vendaje	Productos comerciales	Notas
Gasas	Curity™, Xeroform™, Chlodine™	Económicas, secan la herida, pueden causar lesiones al cambiarse
Película semipermeable	Bioclusive™, Blisterfilm™, Cutifilm™, Opsite™ Hartmann™	Oclusivas, retienen la humedad, solo para heridas no exudativas
Hidrocoloides	Aquacel™, Comfeel™, DuoDERM, Granuflex™, Tegisorb™	Largos intervalos entre cambios atrapan fluidos, oclusivos, no recomendados para heridas infectadas
Hidrogel	Aquacel™, Carrasyn™, Curagel, Nu-Gel™, Purilon™, Restore™	Rehidratan heridas secas, fáciles de retirar/cambiar, pueden causar sobrehidratación
Espumas	3M Esponja adhesiva®, Allevyn™, Lyofoam™, Tielle™, Aquacel™	Moderadamente absorbentes, aislantes
Alginatos	Algisite™, Kaltostat™, Sorbsan™, Comfeel Plus™, Tegaderm™, Askina®, Aquacel™	Altamente absorbentes, hemostáticos
Sustitutos de piel	Integra™, Biobrane™, Alloderm™, Dermagraft™, Aquacel™	Promueven el ambiente húmedo en la herida, protegerla de contaminantes externos, absorben el exudado y promueven la proliferación celular y la formación de tejido nuevo

Con partículas metálicas	Acticoat™, Aquacel Ag™, Mepilex Ag™, Silvercel™, Biatain Ag™ y PolyMem™	Proporciona una acción antimicrobiana para el tratamiento de heridas infectadas
--------------------------	---	---

1.4.2.1 Apósitos cargados con bactericidas

Debido a que, como se ha mencionado anteriormente, las heridas crónicas en su mayoría presentan infecciones bacterianas se han desarrollado apósitos que contengan agentes bactericidas. Entre los más utilizados se encuentran los que contienen plata en su composición, ya que se sabe que este elemento actúa como antiséptico y tiene un amplio espectro antimicrobiano y existen estudios que demuestran que reduce la inflamación y promueve la cicatrización en heridas¹⁰³. No obstante, la concentración requerida para que la plata tenga un efecto bactericida efectivo depende del ambiente en el que se encuentra la herida, y puede ser considerablemente más elevada en comparación con las necesarias usando antibióticos convencionales. Además, su uso conlleva la inducción de daño oxidativo en la membrana y orgánulos de las células eucariotas, así como una respuesta inflamatoria¹⁰⁴. El uso de apósitos que contienen plata se recomienda principalmente en situaciones de profilaxis o en el tratamiento de heridas con sospecha de infección leve, donde la herida se encuentra en una fase de colonización. Sin embargo, es importante ser cauteloso en la administración de dosis elevadas, dado que existen estudios que sugieren la posibilidad de que ciertas bacterias puedan desarrollar resistencia a la plata. Por consiguiente, es importante llevar a cabo una investigación más exhaustiva para determinar la formulación adecuada de estos apósitos en función de las características específicas de cada tipo de herida^{105,106}.

También existen apósitos que contienen otros compuestos como Polihexametileno biguanida (PHMB), que es un antiséptico que se utiliza principalmente en soluciones de limpieza para lentes de contacto o toallitas húmedas, sin embargo, en los últimos años ha llamado la atención de los profesionales de la salud para el tratamiento de infecciones. A una concentración de 0.3% ha demostrado ser no citotóxico y no causar irritación, además de ser efectivo contra un amplio espectro de bacterias, incluso aquellas resistentes a antibióticos y hongos¹⁰⁷. Eberlein *et al.* comparó

los resultados del tratamiento con apósitos de biocelulosa conteniendo PHMB frente a apósitos conteniendo plata, demostrando que los apósitos de PHMB son más eficaces e incluso más rápidos eliminando la carga bacteriana (*S. aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Klebsiella*) encontrada en pacientes con úlceras infectadas¹⁰⁸. Aunque el PHMB presenta muy buenas propiedades tanto bactericidas como para facilitar el cierre de heridas, no es ampliamente utilizado en el cuidado de heridas, lo que sugiere que se requiere más investigación para aprovechar completamente las propiedades del PHMB¹⁰⁹.

Existen además apósitos que contienen yodo, ya que es un compuesto efectivo contra infecciones bacterianas. Sin embargo, su eficacia contra biofilm no es completamente clara, ya que algunos artículos científicos muestran que parece ser efectivo únicamente contra bacterias planctónicas^{110,111}. También existen estudios en donde diferentes tipos de apósitos están cargados con antisépticos, antibióticos o con la combinación de ellos. Contardi *et al.*¹¹² fabricaron un apósito de doble capa en donde la primera capa estaba compuesta por PVP conteniendo el antiséptico Neomercurocromo™, mientras que la siguiente capa era de PVP con ácido hialurónico conteniendo ciprofloxacino. Este sistema mostro ser efectivo contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, además de no ser citotóxico y ser beneficioso en el cierre de heridas. Mi *et al.* desarrollaron un apósito de doble capa que combinaba el antibiótico sulfadiazina con plata para lograr una liberación del fármaco más controlado, logrando que el efecto bactericida se prolongue durante 1 semana¹¹³. Por otro lado, Tamahkar *et al.*¹¹⁴ crearon un sistema de multicapas con alcohol polivinílico, gelatina y ácido hialurónico con el objetivo de controlar y sostener la liberación de ampicilina. La liberación del antibiótico contenido alcanzó el 50% durante las primeras 24 h, seguida de una liberación constante y controlada durante los siguientes 5 días. Además, el sistema no presento citotoxicidad frente a fibroblastos.

Uno de los compuestos antimicrobianos que también ha sido objeto de estudio es la CHXD, conocido por su amplio espectro de acción contra bacterias, incluyendo aquellas resistentes a los antibióticos. Para evaluar el potencial de un apósito innovador impregnado con CHXD, Chittor *et al.*¹¹⁵ realizaron un estudio piloto utilizando un

modelo in vivo de herida porcina incisional. Las heridas tratadas con el apósito de CHXD mostraron una notoria ausencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), lo que sugiere una actividad antimicrobiana significativa. En contraste, las heridas tratadas con el control de placebo o la gasa no antimicrobiana presentaron una considerable proliferación de MRSA. Además, Aubert-Viard *et al.*¹¹⁶ describen la modificación de un textil no tejido de poliéster mediante la incorporación de cloruro de hexadeciltrimetilamonio (CHT) en la superficie del material. Luego, se aplicó un recubrimiento capa a capa utilizando dicloruro de piridinio (PCD) y CHXD, lo que resultó en una mayor capacidad de carga y liberación sostenida de CHXD según el número de capas. Se encontró que un tratamiento térmico posterior fue efectivo para estabilizar el sistema multicapa y controlar la liberación de CHXD durante varias semanas. Se demostró una actividad antibacteriana in vitro durante este periodo, mostrando efectividad contra las cepas de *E. coli* y *S. aureus*.

La administración tópica de antibióticos en heridas es crucial cuando hay infección¹¹⁷. Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencias bacterianas como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, los apósitos de liberación controlada ofrecen ventajas significativas en el tratamiento de infecciones durante la curación de heridas, ya que permiten la liberación controlada del fármaco, una elevada concentración localizada en la herida, evitándose así su distribución sistémica^{118,119}.

Aunque estos apósitos presentan características beneficiosas para el tratamiento de heridas, es necesario llevar a cabo investigaciones exhaustivas *in vivo* debido a la complejidad y especificidad de cada tipo de herida. Además, la evidencia científica que demuestre que los materiales avanzados utilizados en estos apósitos son superiores a los apósitos convencionales (no medicados) todavía es limitada, poco concluyente y requiere más estudios científicos y ensayos clínicos sistemáticos¹²⁰.

Existen diferentes maneras de fabricar apósitos, pero para este trabajo nos centraremos en la técnica de electrohilado para la creación de matrices basadas en nanofibras poliméricas.

1.4.2.2 Electrohilado

Los apósitos basados en nanofibras ofrecen varias características favorables para el tratamiento de heridas. Estas características incluyen una distribución homogénea en el diámetro de las fibras, lo cual asegura una estructura uniforme; un área superficial alta, que proporciona una amplia superficie de contacto; la posibilidad de controlar la resistencia de las fibras, lo que permite ajustar sus propiedades mecánicas según las necesidades específicas; su buena elasticidad, lo que facilita su adaptación a la forma de la herida; su porosidad adecuada, la cual permite el intercambio de CO₂ y vapor de agua y evita la maceración de la herida y la capacidad de cargar diferentes compuestos, lo que permite la incorporación de agentes terapéuticos adicionales en el apósito¹²¹.

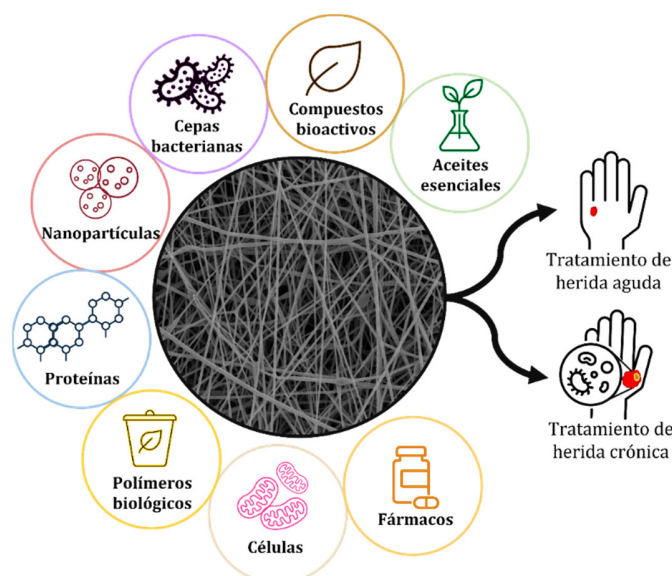


Fig. 6 Compuestos aptos para su carga en fibras electrohiladas.

La técnica más comúnmente utilizada para la fabricación de nanofibras es el electrohilado (*electrospinning*) (Fig. 7A), la cual se basa en la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico para lograr que una solución polimérica se deposite en forma de fibras, evaporándose el disolvente durante la deposición¹²². Los parámetros clave a tener en cuenta durante este proceso incluyen la concentración del polímero a electrohilar, el voltaje aplicado, el caudal de la solución polimérica y la distancia entre la punta de la aguja inyectora y el colector. Esta técnica permite obtener estructuras que

pueden utilizarse como apósitos en el tratamiento de heridas. Estas estructuras de nanofibras creadas mediante electrohilado imitan la matriz extracelular de fibras de colágeno y pueden ser fabricadas a partir de una amplia gama de compuestos poliméricos sintéticos y naturales con propiedades multidimensionales¹²³.

Las nanofibras producidas mediante el proceso de electrohilado demuestran una destacada capacidad de absorción de fluidos, lo que establece un entorno humidificado propicio para la promoción de la cicatrización de heridas. Adicionalmente, su permeabilidad facilita la eficaz difusión de oxígeno y otros gases esenciales, contribuyendo a mantener un ambiente propicio para el proceso de recuperación. Asimismo, la porosidad y tortuosidad adecuadas de estas nanofibras evitan la entrada de agentes patógenos externos, garantizando un entorno aséptico y libre de contaminantes. Además, esta tecnología versátil ha demostrado ser altamente efectiva para la carga y liberación controlada de diversos tipos de componentes (Fig. 6), tales como fármacos, proteínas, moléculas bioactivas, aceites esenciales, nanopartículas^{101,123}, cepas bacterianas, como probióticos^{124,125} y células madre para su uso en heridas tópicas, ya que la adición de las células madre alrededor del sitio de la herida promueve vías de señalización para factores de crecimiento que regulan la reconstrucción del tejido¹²⁶. De particular interés son las nanofibras cargadas con compuestos presentes en los aceites esenciales, debido a que además de poseer propiedades antibacterianas, pueden favorecer la adhesión, crecimiento y proliferación celular gracias a su alta compatibilidad con la matriz extracelular humana¹²⁷⁻¹²⁹.

Las nanofibras por si solas son insuficientes en muchos casos para actuar como bactericida y además promover la curación de la herida, es por ello que es primordial la carga de agentes terapéuticos en el caso de tratar heridas infectadas crónicas que no cicatrizan. Por ejemplo, se ha demostrado que las nanofibras modificadas con factores de crecimiento epidérmico humano recombinante y gentamicina son efectivas en la cicatrización de úlceras de pie diabético, actuando como depósitos de liberación sostenida de dicho antibiótico para prevenir la infección bacteriana y, al mismo tiempo, acelerar la cicatrización de la herida gracias a la presencia de la proteína¹³⁰. La funcionalización de las nanofibras con aminoácidos y péptidos antimicrobianos

también ha mostrado ser un método eficaz para la fabricación de modelos de apósitos avanzados para heridas. Las nanofibras electrohiladas liberan los fármacos antimicrobianos lentamente para asegurar una eficacia terapéutica duradera¹³¹. Zhu *et al.* demostraron que el uso de grafeno y fibroína de seda impregnados con ciprofloxacino mejora la eficacia antimicrobiana y la cicatrización de heridas generadas por quemaduras¹³² potencializando la efectividad del antibiótico con las propiedades antimicrobianas, mecánicas y de superficie del grafeno. Previamente, dentro del grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral se ha evaluado la eficacia de apósitos de policaprolactona (PCL) cargados con timol (THY) como agente antibacteriano contra diversas bacterias Gram-positivas, así como su capacidad para inhibir la formación de biofilms y tratar infecciones intracelulares⁸³. Se han observado resultados prometedores en cuanto a la reducción de la carga bacteriana en heridas, enfatizando en la importancia del contacto directo entre los apósitos con los patógenos¹³³. Además, se ha evaluado la capacidad de los apósitos electrohilados cargados con THY, tirosol y escualeno para reducir la inflamación *in vitro*, obteniéndose resultados alentadores en el tratamiento de heridas tópicas⁸⁵.

Las nanofibras poliméricas se han identificado como una opción prometedora en el campo del tratamiento de heridas. Sin embargo, es importante destacar que existen otros sistemas, como las nanopartículas, que también poseen características interesantes para abordar la cicatrización de heridas liberando principios activos que favorecen el proceso regenerativo.

I.4.3 Nanopartículas en tratamiento de infecciones

En el campo de las aplicaciones biomédicas, se utilizan principalmente dos tipos de nanopartículas (NPs): nanopartículas orgánicas (como polímeros o liposomas) y nanopartículas inorgánicas (como metálicas, de carbono, puntos cuánticos y nanopartículas cerámicas)¹³⁴. Para que una nanopartícula sea adecuada para su uso en biomedicina, debe cumplir con ciertas características, como ser biocompatible, no ser inmunogénica y ser estable en un entorno fisiológico¹³⁵.

Las nanopartículas se utilizan para dos funciones principales en el tratamiento de heridas: a través de sus propiedades intrínsecas, ayudar al cierre de heridas o como

vectores para la liberación de agentes terapéuticos contenidos en ellas¹³⁶. La efectividad de estas nanopartículas depende de su tamaño, funcionalización en su superficie y potencial zeta, que influyen en su capacidad de unión a receptores y en la penetración a través de barreras celulares. Además, su comportamiento biológico, incluyendo biodistribución e interacción con biomoléculas, está relacionado con su estructura química y su porosidad¹³⁷⁻¹³⁹. Las nanopartículas pueden adquirir diferentes estructuras:

Las nanoesferas poliméricas porosas son capaces de encapsular fármacos y además permitir la adhesión de sustancias activas en su superficie, mejorando así sus propiedades farmacéuticas en términos de estabilidad y biocompatibilidad¹⁴⁰.

Las nanocápsulas son estructuras que encapsulan compuestos activos en su interior hueco, generalmente acuoso, permitiendo una liberación controlada a lo largo del tiempo. Además, las nanocápsulas pueden mejorar la penetración de los mismos en tejidos como la dermis¹⁴¹.

En el proceso de cicatrización de heridas se utilizan principalmente tres tipos de nanopartículas: nanopartículas metálicas e inorgánicas, nanopartículas basadas en lípidos y nanopartículas poliméricas. Esta últimas dos han demostrado contribuir al proceso de cierre de una herida debido a que pueden proteger a los agentes terapéuticos de la degradación por el ambiente en una herida, como el pH, la temperatura, la presencia de enzimas, etc. Además permiten una liberación de estos agentes de manera sostenida y controlada logrando así que la dosis de fármaco se mantenga a una concentración efectiva para el tratamiento de potenciales infecciones en la herida^{134,139,142}.

1.4.3.1 Nanopartículas poliméricas

Debido a la amplia gama de características químicas y propiedades funcionales que presentan, los polímeros han sido ampliamente utilizados en el campo biomédico. Esto se debe en parte a que algunos de ellos son altamente biocompatibles y tienen una baja respuesta inmunológica siendo más estables en general que los sistemas lipídicos (i.e., liposomas, partículas lipídicas, etc.)^{143,144}. Existen dos tipos principales de polímeros: los sintéticos, como el ácido poliláctico (PLA), PVA, PCL y el ácido poliláctico-

co-glicólico (PLGA)¹⁴⁵; y polímeros naturales, como el quitosano, el alginato de sodio, la celulosa, el ácido hialurónico y el colágeno. Ambos tipos de polímeros se utilizan en la preparación de biomateriales en diversas formas, como nanopartículas, apósitos, esponjas e hidrogeles.

Entre las diferentes formas de nanopartículas poliméricas, las nanoesferas y las nanocápsulas son dos de las estructuras más utilizadas como se ha mencionado anteriormente¹⁴⁶. Las nanopartículas poliméricas pueden ser generadas mediante dos enfoques distintos: a partir de polímeros preformados o mediante la polimerización directa de monómeros utilizando diversas técnicas de polimerización, ya sea de manera clásica o mediante múltiples reacciones. En el caso de los polímeros preformados, se pueden emplear procedimientos como la evaporación de solvente, *electrospraying*, precipitación, diálisis y tecnologías de fluidos supercríticos. Por otro lado, las nanopartículas poliméricas pueden ser generadas de manera directa a partir de la polimerización de monómeros mediante diversas técnicas, entre las cuales destacan la micro-emulsión, nanoemulsión, emulsión libre de surfactante y polimerización interfacial¹⁴⁷. En esta investigación, nos centraremos especialmente en el *electrospraying*, la emulsión y la nanoprecipitación, explorando sus particularidades para el propósito de nuestra tesis:

- I. *Electrospraying* (Fig. 7A); Este método de obtención de micro y nanopartículas implica la disolución del polímero y los compuestos activos en un disolvente adecuado y su posterior descomposición en gotas finas mediante la aplicación de un campo eléctrico intenso. El disolvente se evapora, dejando en el colector las nanopartículas sólidas. Para obtener nanopartículas hay diferentes parámetros a tener en cuenta: como la concentración del polímero, el voltaje y la distancia de la aguja al colector¹⁴⁸.
- II. Emulsión (Fig. 7B): Para crear una emulsión, se utiliza un compuesto soluble en el medio orgánico (ej., acetato de etilo) en el que se disuelven polímeros o compuestos activos. Luego, esta mezcla se emulsiona con una fase acuosa inmiscible que contiene un estabilizador para evitar que las gotas se agreguen entre sí y se deja evaporar el disolvente orgánico¹⁴⁹.

- III. Nanoprecipitación (Fig. 7C): Para este método el polímero y los compuestos activos se disuelven en un medio orgánico (ej., acetona) y se añaden a una solución acuosa con la que es miscible, la acetona se deja evaporar y las nanopartículas quedan dispersas en una suspensión acuosa¹⁵⁰.

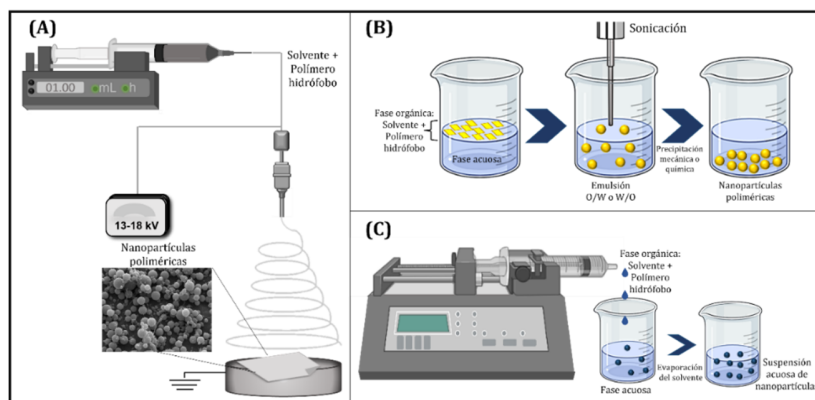


Fig 7. Métodos de síntesis de nanopartículas (A) *Electrospinning/electrospraying*, (B) *Emulsificación* y (C) *Nanoprecipitación*.

I.5 Objetivos

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de sistemas terapéuticos poliméricos para la liberación de antimicrobianos en el tratamiento de infecciones sobre heridas tópicas. Para este objetivo, se abordaron diversos aspectos como la adaptación de los materiales a las características de la herida, la erradicación de bacterias patógenas, la inhibición de formación del biofilm bacteriano y la minimización de la citotoxicidad frente a células eucariotas.

En primer lugar, se evaluó la eficacia de apósitos poliméricos fabricados mediante electrohilado cargados con tres agentes biocidas modelo (antibiótico: Rifampicina; antiséptico: Clorhexidina y componente mayoritario presente en el aceite esencial de tomillo y orégano: Timol) en tres co-polímeros metacrílicos de nombre comercial Eudragit® (L100, S100 y RS100) con diferentes comportamientos frente al pH. El objetivo fue el de analizar la posibilidad de ajustar el perfil de liberación de los biocidas contenidos en los apósitos desarrollados en función del pH de la herida con el fin de asegurar una dosificación óptima para prevenir o inhibir el crecimiento de microorganismos relevantes en infecciones tópicas. Para ello, se utilizaron diversas

técnicas de cultivo de microorganismos y ensayos de viabilidad celular, con el fin de establecer la efectividad de los diferentes agentes y su combinación en el control de la proliferación bacteriana manteniendo una reducida citotoxicidad frente a células humanas.

Con el propósito de obtener una liberación controlada de dos antibióticos (Rifampicina y Ciprofloxacino) lo que permite reducir la frecuencia de dosificación y maximizar su efectividad en la erradicación de microorganismos patógenos, se desarrolló un sistema de administración basado en el polímero Eudragit RS100 (un copolímero de acrilato de etilo y de metil metacrilato con grupos amonio cuaternarios). El diseño del apósito electrohilado incluyó dos morfologías poliméricas distintas y se emplearon diferentes técnicas de formulación para conseguir una capa de fibras que contuviera Rifampicina (RIF) decoradas con partículas que cargaran Ciprofloxacino (CIP) para tener dos perfiles de liberación de los antibióticos, uno inicial rápido que eliminase una potencial contaminación accidental tras la formación de la herida y otro sostenido en el tiempo para facilitar la profilaxis y la potencial colonización durante el proceso regenerativo. Se evaluó la actividad antimicrobiana del apósito comparándolo con la combinación de ambos antibióticos en su estado libre para demostrar su mayor eficacia atribuible a la liberación sostenida de los fármacos contenidos en el apósito.

Debido a la naturaleza polimicrobiana en las heridas tópicas infectadas descrita y con el objetivo de reducir las resistencias a antibióticos, se buscó obtener una selectividad específica del antibiótico RIF hacia *S. aureus* a través de la síntesis de nanopartículas poliméricas de PLGA_PEG (copolímero dibloque de poliláctico-co-glicólico y de polietilenglicol) funcionalizadas con anticuerpo policlonal anti-*Staphylococcus Aureus*. Además, con esta estrategia de direccionamiento, se buscó mejorar la eficacia del antibiótico, reduciendo la concentración necesaria para la erradicación de la bacteria planctónica, incluso a nivel de infección intracelular ya que dicho patógeno pasa parte de su ciclo celular infectando células humanas intracelularmente (*small colony variants*). Adicionalmente, se planteó como objetivo de esta tesis el demostrar que las partículas cargadas con el antibiótico y conjugadas con

el anticuerpo fuesen óptimas para la inhibición y disrupción del biofilm incluso en presencia de otras bacterias.

Capítulo II

**ESTUDIO DE LA CARGA Y
LIBERACIÓN DE AGENTES
TERAPÉUTICOS EN APÓSITOS
ELECTROHILADOS SENSIBLES AL
pH PARA HERIDAS**

II.1 Introducción

Como se mencionó previamente la cicatrización de heridas es un proceso fisiológico complejo que puede ser interrumpido por infecciones cutáneas, resultando en heridas crónicas¹⁵¹. La cronicidad puede deberse a un tratamiento inadecuado o a condiciones patofisiológicas preexistentes. Si la herida es crónica, seguirá mostrando signos de inflamación, hiperproliferación tisular y un borde de herida continuo¹⁵². La cicatrización de heridas crónicas es un proceso que requiere un tratamiento más agresivo¹⁵³. El tratamiento de las heridas crónicas infectadas que no curan sigue siendo un desafío sanitario, y los costes directos e indirectos asociados con estas heridas son altos. El envejecimiento de la población y el aumento global de patologías como la diabetes podrían empeorar aún más la carga social y sanitaria actual¹⁵⁴. Por ejemplo, como ya se mencionó, en Europa, hay más de 55 millones de pacientes que sufren diabetes, de los cuales entre el 19 y el 34% son vulnerables a desarrollar úlceras del pie diabético durante su vida y aproximadamente el 20% de las infecciones moderadas o graves de pie diabético resultan en amputaciones de extremidades inferiores¹⁵⁵. Casi el 33% de los pacientes con lesión en la médula espinal desarrollan úlceras por presión, lo que revela una prevención inadecuada de las heridas crónicas por presión¹⁵⁶. Por todo esto, es necesario crear un tratamiento eficiente y que se adecue a las necesidades de las heridas crónicas. Uno de los tratamientos más comunes es el uso de antisépticos tópicos, como el dihidrocloruro de octenidina, la polihexanida, los iodóforos, la CHXD, la sulfadiazina de plata y combinaciones de estos. Estos antisépticos tienen ventajas importantes, como su potencial limitado para contribuir al desarrollo de resistencia bacterianas debido a sus múltiples mecanismos no específicos de acción antimicrobiana, su amplio espectro de actividad, su fácil penetración a través del tejido necrótico, del tejido fibrótico y de los biofilms bacterianos, y su bajo coste¹⁵⁷. Sin embargo, algunos de estos antisépticos también tienen limitaciones significativas como se mencionó en el apartado I.3.1¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. La CHXD (Tabla 4) es un agente antimicrobiano que se utiliza en la desinfección en higiene bucal y heridas y en la prevención de infecciones asociadas a procedimientos quirúrgicos. Actúa mediante la interacción con la membrana celular de las bacterias, causando una alteración en su permeabilidad y en

su función lo que conlleva a la pérdida de contenido citoplasmático y por ende a la muerte celular¹⁶⁰. La CHXD tiene actividad contra Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y virus, además se ha demostrado que tiene persistencia en la piel y mucosas, lo que permite una desinfección prolongada. A pesar de su amplio uso, la CHXD puede presentar algunas limitaciones como su toxicidad a nivel celular y el desarrollo de resistencias bacterianas, que, aunque son poco comunes y poco probables, como se ha mencionado anteriormente, sí que han sido reportadas¹⁶¹.

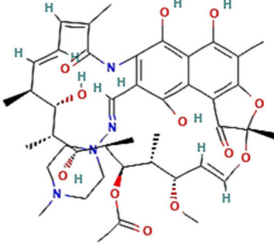
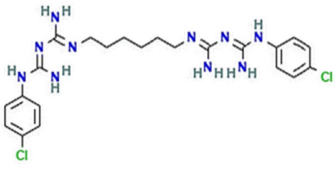
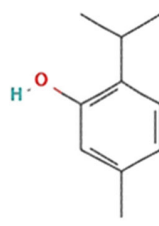
Aunque los antibióticos tópicos presentan el riesgo de desarrollar resistencias bacterianas, son una opción efectiva cuando se observa un aumento de la carga microbiana, especialmente cuando hay indicios de formación de biofilm que pueden llevar a una infección sistémica¹⁶². Es importante destacar que algunos antibióticos tópicos, como la mupirocina, clindamicina, polimixina, neomicina, ácido fusídico, entre otros, desarrollan resistencias bacterianas rápidamente¹⁶², por lo tanto, su uso debe ser monitoreado cuidadosamente.

La RIF (Tabla 4) es un antibiótico de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en particular *S. aureus*. Su mecanismo de acción se basa en la supresión selectiva de la síntesis de ARN bacteriano mediante la unión a la subunidad β de la ARN polimerasa, lo que interrumpe la transcripción del ADN bacteriano y la síntesis de proteínas necesarias para la fisión binaria y la supervivencia de las bacterias¹⁶³. La RIF se usa comúnmente para tratar la tuberculosis, meningitis y otras infecciones¹⁶⁴, pero su biodisponibilidad se reduce en medios fisiológicos debido a su baja solubilidad, lo que requiere concentraciones altas a nivel sistémico¹⁶⁵.

El THY (Tabla 4) es un compuesto orgánico presente en ciertos aceites esenciales como el del tomillo y el del orégano. Tiene propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes que lo hacen útil en diversas aplicaciones médicas y farmacéuticas como en el tratamiento de infecciones de la piel. El THY actúa como un agente antimicrobiano al dañar la membrana celular de las bacterias Gram-negativas, lo que conduce a una liberación del contenido intracelular como los lipopolisacáridos y daña el equilibrio homeostático¹⁶⁶. En el caso de bacterias Gram-positivas altera su

membrana citoplasmática dañando la bicapa lipídica interfiriendo con su crecimiento y fisión binaria¹⁶⁷.

Tabla 4. Propiedades moleculares y fisicoquímicas de los fármacos a utilizar en los apósitos. Datos obtenidos de PubChem®

Rifampicina	
	Peso molecular: 823.06 g/mol
	Punto de fusión: 183-188°C
	pH en disolución acuosa: 6.0-8.0
	Hidrosolubilidad (25°C): pH 4.3- 1.3 mg/mL pH 7.3- 2.5 mg/mL
	Soluble en: Cloroformo (CHCl ₃), acetato de etilo (AcEt), metanol, dimetilsulfóxido (DMSO)
Clorhexidina	
	Peso molecular: 505.45 g/mol
	Punto de fusión: 134-136°C
	pH en solución acuosa: 5.5-7.0
	Hidrosolubilidad (20°C): 0.8 g/l
	Soluble en: CHCl ₃ , DMSO, Dimetilformamida (DMF)
Timol	
	Peso molecular: 150.22 g/mol
	Punto de fusión: 48-51°C
	pH en solución acuosa: 6.0-7.0
	Hidrosolubilidad (20°C): 900 mg/L
	Soluble en: Etanol (EtOH), DMF, DMSO, CHCl ₃

Como ya se comentó en el capítulo anterior, las heridas crónicas presentan pH alcalino a diferencia del pH neutro de las heridas agudas o el pH ácido de la piel intacta¹⁶⁸. Por lo tanto, es interesante desarrollar apósitos cargados con bactericidas con capacidad de respuesta al pH y que además presenten una liberación rápida o sostenida para coincidir con la cinética de crecimiento bacteriano en la zona de la herida.

Con este objetivo se han seleccionado tres polímeros basados en polimetacrilatos de origen sintético (Eudragit®). Esta familia de polímeros se caracteriza por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para ser procesados en forma de tabletas, capsulas y películas. Se utilizan principalmente como materiales gastroresistentes para el suministro enteral de fármacos protegiendo al principio activo de la degradación ácida y enzimática del estómago. Los polímeros Eudragit® tienen, por lo tanto, la ventaja de proteger los fármacos de la degradación química y biológica, mejorar su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad, así como proporcionar una liberación controlada y prolongada de los fármacos. Se dividen en tres categorías; Eudragit® L, Eudragit® S y Eudragit® E. Para este capítulo se abordarán tres tipos específicos de Eudragit®:

Eudragit® L100-55 (L100-55): copolímero aniónico de metacrilato de amonio cuaternario, metacrilato de metilo y metacrilato de trimetiloaminoetilo. La proporción de grupos carboxilo libres respecto al éster, en su estructura química, es de 1:1, conteniendo unidades de etilacrilato hidrofílicas lo cual lo hace soluble en soluciones con un pH mayor a 5.5 e insoluble a pH <5.5¹⁶⁹. El recubrimiento con Eudragit® L100-55 se utiliza a menudo en formulaciones que requieren liberación prolongada en el tiempo¹⁷⁰.

Eudragit® S100 (S100): copolímero aniónico derivado de ácido metacrílico y metacrilato de metilo en una proporción de 1:2. Es soluble a pHs mayores que 7 debido a sus grupos ácidos carboxílicos libres, y es insoluble en ácidos y soluciones acuosas. El recubrimiento con Eudragit® S100 puede proporcionar resistencia a la humedad, estabilidad química, protección contra la degradación enzimática y retardo en la liberación del fármaco contenido en su estructura. Por ello se utiliza, principalmente,

como una cobertura secundaria para fortalecer la encapsulación del fármaco y asegurar una liberación dirigida¹⁷¹.

Eudragit® RS100 (RS100): copolímero compuesto por monómeros de etil-acrilato, metil-metacrilato y un bajo contenido de éster de ácido metacrílico con grupos amonio cuaternarios, es insoluble en soluciones acuosas a cualquier pH y por tanto la liberación de los compuestos cargados es independiente del mismo. Principalmente se utiliza como matriz de liberación retardada para fármacos que requieren una liberación sostenida en el tracto gastrointestinal, lo que ayuda a mejorar la biodisponibilidad y la eficacia del fármaco al evitar la rápida eliminación del mismo. Además, este polímero puede proteger el fármaco de la degradación por factores ambientales, como la luz y la humedad¹⁷².

II.2 Objetivo

El objetivo de este capítulo es desarrollar apósitos con una cinética de liberación de antimicrobianos que se ajuste a las necesidades temporales y de pH específicas de la herida. Para ello se han desarrollado apósitos mediante electrohilado de los copolímeros Eudragit® L100-55; Eudragit® S100 y Eudragit® RS100 cargados con un antiséptico (CHXD), un antibiótico de amplio espectro (RIF) y con un antimicrobiano de origen natural (THY).

II.3 Síntesis de apósitos electrohilados y su caracterización

II.3.1 Síntesis de apósitos y su caracterización

Se prepararon diversas soluciones de Eudragit® L100, S100 y RS100 con diferentes porcentajes de polímero para ser sometidas a electrohilado utilizando distintos parámetros. El objetivo fue encontrar las condiciones óptimas que permitieran obtener fibras libres de defectos como discontinuidades o grumos (*beads*), mantener un cono de Taylor estable y asegurar un flujo continuo del polímero sin sufrir problemas de secado debido a la rápida evaporación del disolvente.

Las soluciones óptimas de Eudragit® L100-55 y S100 (30% w/v) fueron las que se prepararon disolviendo los polímeros correspondientes en una mezcla de DMF:EtOH (4:1) con agitación durante toda la noche a 600 rpm y a temperatura ambiente (27 °C).

La solución óptima de Eudragit® RS100 (30% w/v) se obtuvo utilizando como disolvente CHCl₃. Para la síntesis de los apósitos cargados con RIF, CHXD y THY, se añadió la cantidad adecuada del agente terapéutico, (2.5%, 5% y 20% w/w, respectivamente, con relación al peso del polímero) a las diferentes soluciones de Eudragit® L100-55, S100 y RS100, estas concentraciones, de acuerdo con optimizaciones anteriores, no afectaban a la morfología de las fibras. Posteriormente se mezclaron durante 30 minutos. Se prepararon apósitos de los tres polímeros cargados con cada uno de los agentes bactericidas seleccionados.

Tras la preparación de las soluciones, se midió viscosidad de las mismas y se procedió a llevar a cabo el proceso de electrohilado, cuyos detalles, procedimiento y equipo empleado se encuentran detallados en el Anexo I. Los apósitos electrohilados fueron caracterizados morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se evaluó el efecto del pH de las soluciones en la morfología de los apósitos, y se determinó la carga de cada fármaco (DL) y su eficiencia de encapsulación (EE) mediante espectrofotometría UV-Vis. También se llevaron a cabo observaciones mediante las espectroscopias Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y Raman para detectar la presencia de los fármacos a través de las vibraciones de sus moléculas. Por último, se realizó un análisis *in vitro* para medir la liberación de fármacos en soluciones con diferentes valores de pH. Todos los detalles, incluyendo la preparación de las muestras y las condiciones experimentales, están descritos en el Anexo I.

II.3.6 Análisis biológicos *in vitro*

Una vez hechas las caracterizaciones físico-químicas se procedió a evaluar su actividad biológica, todos los procedimientos y técnicas utilizadas se encuentran detallados en el Anexo I.

Se evaluó la actividad antibacteriana contra la cepa de *S. aureus* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), como modelo de bacteria Gram-positiva, y contra *E. coli* S17 como modelo de bacteria Gram-negativa. Ambas bacterias se enfrentaron a distintas cantidades de RIF (0-1 ppm para *S. aureus* y 0-60 ppm para *E. coli*) y THY (20-250 ppm para ambas bacterias) disueltos en 2% de DMSO. Además, se determinaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC)

para las membranas electrohiladas cargadas con RIF y THY según el método de prueba estándar ASTM E-2180-18¹⁷³. Cuando se analizaron muestras de Eudragit® RS100, se agregó un 2% de Tween® 80 al medio de cultivo debido a su alta naturaleza hidrofóbica para facilitar la liberación del fármaco. No fue necesario utilizar Tween® 80 al medir la liberación del fármaco de los polímeros Eudragit® L100-55 y S100 debido a su mayor hidrofiliidad.

La capacidad antibacteriana de los apósitos cargados con CHXD también fue evaluada contra *S. aureus* y *E. coli*, pero utilizando el test de susceptibilidad antimicrobiana en disco según lo descrito en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de EE. UU. ya que con la prueba previamente utilizada para RIF y THY, el antimicrobiano no difundía adecuadamente para llegar a todo el agar dentro del pocillo y se observó una gran heterogeneidad en comparación con los resultados mostrados por el antimicrobiano libre. Este fenómeno no se observó para RIF o THY, probablemente debido a la alta naturaleza volátil del THY, lo que hizo posible llegar a todo el pocillo y disolverse desde la fase de vapor en el agar sólido y debido a la alta eficacia antimicrobiana de la RIF.

Además, se llevó a cabo una evaluación de la citocompatibilidad de los apósitos de Eudragit® L100-55, S100 y RS100 cargadas con RIF, CHXD y THY en macrófagos murinos J774 ATCC-TIB-67™. Para ello, se añadió la cantidad necesaria de apósitos para alcanzar una concentración de 4 mg/mL de cada apósito (Eudragit® L100-55, S100 y RS100) cargados con RIF, CHXD y THY a cada cultivo de macrófagos (2 mL). Por otro lado, se adicionaron los compuestos libres en concentraciones de 40 µg/mL (RIF), 8 µg/mL (CHXD) y 250 µg/mL (THY), de acuerdo con los valores de MBC (concentración bactericida mínima) obtenidos para los apósitos cargados con los antimicrobianos. Es decir, se evaluó el efecto potencialmente citotóxico de los compuestos sobre las células a las dosis necesarias para eliminar bacterias. Todos los procedimientos y detalles de las técnicas descritas anteriormente se encuentran detallados en el Anexo I.

II.4 Resultados y discusión

II.4.1 Caracterización morfológica de los apósitos

Las imágenes obtenidas por microscopía SEM de los apósitos de Eudragit® cargados y sin cargar de los antimicrobianos se muestran en la Fig. 8. Los resultados obtenidos de las pruebas de optimización se detallan en el Anexo II. Los apósitos finales obtenidos utilizando soluciones de los polímeros con una concentración del 30% w/v presentaron diámetros homogéneos y ausencia de grumos (*beads*).

La cantidad de antibacteriano que puede añadirse en cada caso a la disolución de polímero para la obtención de los apósitos depende de la naturaleza del compuesto. Mientras que solo se pudo añadir un 2.5% w/w de RIF a la solución de polímero para obtener un cono de Taylor estable durante el electrohilado, se pudieron añadir hasta 5% w/w de CHXD y un contenido de hasta un 20% w/w de THY a las correspondientes soluciones poliméricas orgánicas y obtener apósitos electrohilados sin defectos, es decir, diámetros homogéneos y sin grumos (*beads*) ya que los compuestos antimicrobianos cambian la conductividad y la viscosidad de las disoluciones a electrohilar.

Hubo una diferencia importante en los diámetros resultantes de las fibras en los apósitos, las de Eudragit® L100-55, tienen un diámetro de $0.32 \pm 0.07 \mu\text{m}$, mientras que los diámetros medios de las fibras electrohiladas basadas en Eudragit® S100 y RS100 son de $1.167 \pm 0.246 \mu\text{m}$ y $1.751 \pm 0.395 \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 8, Tabla 5).

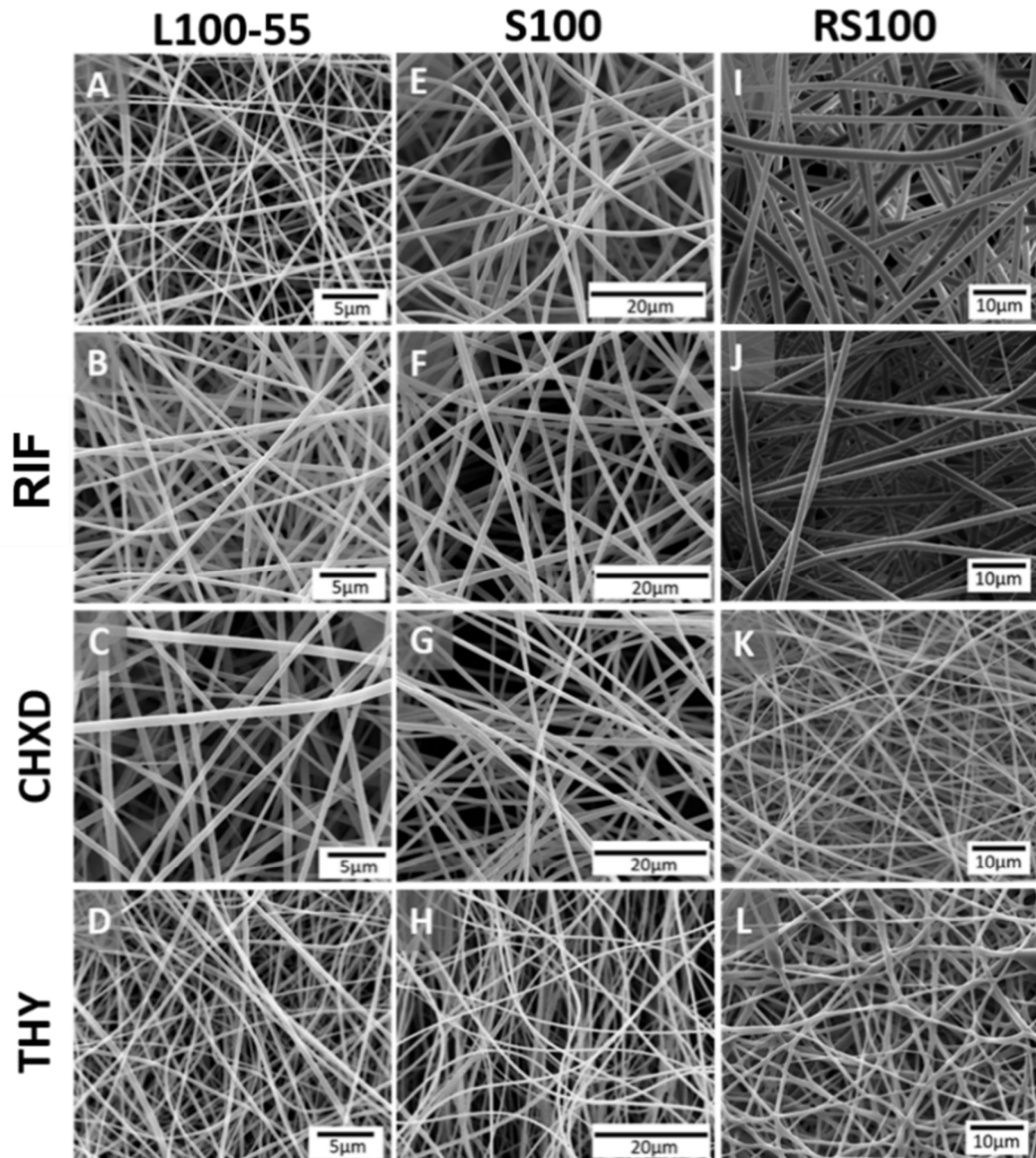


Fig. 8 Imágenes de SEM de apósitos electrohilados de Eudragit®: (A) L100-55, (B) L100-55/RIF, (C) L100-55/CHXD, (D) L100-55/THY, (E) S100, (F) S100/RIF, (G) S100/CHXD, (H) S100/THY, (I) RS100, (J) RS100/RIF, (K) RS100/CHXD, (L) RS100/THY.

Tabla 5. Diámetro promedio de las fibras (N = 200), carga del antimicrobiano encapsulado y eficiencia de la encapsulación

Polímero Eudragit®	Fármaco	Diámetro (µm)	Voltaje (kV)	Viscosidad (mPa.s)	D.L. (% w/w) ^a	E.E. (%)
L100-55	--	0.32 ± 0.07	17.6	643	-	-
	RIF	0.45 ± 0.09	17.8	645	2.1	95 ±7
	CHXD	0.31 ± 0.09	15.7	680	1.6	34 ±3
	THY	0.30 ± 0.07	17.1	632	2.8	16 ±2
S100	-	1.16 ± 0.24	20.3	937	-	-
	RIF	0.53 ± 0.08	14.2	936	2.3	94±5
	CHXD	0.85 ± 0.11	18.3	956	1.5	32±2
	THY	0.65 ± 0.09	17.8	940	11.0	64±3
RS100	-	1.75 ± 0.39	14.7	125	-	-
	RIF	1.76 ± 0.39	9.8	128	2.2	90±2
	CHXD	1.17 ± 0.27	16.5	105	1.5	31±2
	THY	1.85 ± 0.36	11.2	153	5.2	31±8

^a Relativo al peso del polímero.

La importante diferencia entre los diámetros de las fibras Eudragit® L100-55 y S100 podría atribuirse a la diferente viscosidad de las soluciones de electrohilado iniciales (Tabla 5), ya que el aumento de la viscosidad produce fibras con diámetros mayores¹⁷⁴. A medida que aumenta la viscosidad, las fuerzas viscoelásticas se convierten en el factor dominante obteniéndose fibras con mayores diámetros. Como se mencionó antes, la alta volatilidad del cloroformo requirió el uso de una aguja coaxial que alimentaba solo el disolvente en la aguja exterior para evitar obstrucciones. El uso de un disolvente diferente y una aguja coaxial cambia por completo las condiciones de electrohilado y las fibras obtenidas tienen diámetros mayores. Además, la conductividad de la solución influye fuertemente en el proceso de electrohilado, ya que a medida que aumenta la conductividad de la solución, el diámetro de la fibra disminuye

y viceversa¹⁷⁵. La conductividad inferior del CHCl_3 en comparación con la del DMF:EtOH explicaría los mayores diámetros de fibra obtenidos para las fibras de Eudragit® RS100.

La adición de los agentes antimicrobianos a Eudragit® L100-55 modificó sólo ligeramente la viscosidad de la solución y el voltaje requerido, y como consecuencia, los diámetros de fibra obtenidos fueron similares a los obtenidos para los polímeros no cargados. En cambio, se obtuvo un resultado diferente con la adición de los antimicrobianos a las soluciones de electrohilado basadas en Eudragit® S100. El aumento del voltaje necesario para producir un cono Taylor estable después de la adición de los antimicrobianos correspondientes produjo un aumento en la velocidad con la que la solución polimérica llegaba al colector, lo que resultó en mayores diámetros de fibra ya que el tiempo de elongación de la fibra fue menor.¹⁷⁶ El voltaje necesario para producir fibras homogéneas de Eudragit® S100 cargadas con RIF disminuyó de 20.3 a 14.2 kV razón por la cual se obtuvo un menor diámetro. El efecto del voltaje aplicado también se pudo apreciar en las fibras de Eudragit® S100 cargadas de CHXD y THY. La viscosidad parece ser el parámetro principal que rige la morfología de las fibras de Eudragit® RS100, ya que el diámetro de las fibras disminuyó con la adición de CHXD y aumentó para las fibras cargadas de THY. Es importante señalar que las fibras de Eudragit® RS100 cargadas con THY eran muy frágiles y quebradizas y colapsaron al recogerlas del papel de aluminio.

II.4.2 Encapsulación de agentes antibacterianos

En el caso de los apósitos cargados con RIF, la eficiencia de encapsulación (EE) fue siempre superior al 90%. También se encontraron anteriormente EE altas, superiores al 75%, para RIF encapsulado en ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) mediante electrohilado, estas eficacias fueron atribuidas a las fuertes interacciones supramoleculares entre RIF y el polímero¹⁷⁷. Por otro lado, la EE de CHXD fue de alrededor del 32% para todos los polímeros y como consecuencia, la carga del fármaco nunca superó el 1.6% w/w. Para THY, la EE depende del polímero encapsulante y fue tan alta como 64.3% para Eudragit® S100 y tan baja como 16% para Eudragit® L100-55, mientras que para Eudragit® RS100 fue del 31%. La diferencia de la EE entre los tres fármacos para cada polímero podría estar relacionada con sus diferentes propiedades

físicas. La presión de vapor insignificante de la RIF puede explicar la alta eficiencia de carga observada para este fármaco en el proceso de electrohilado, ya que su pérdida durante la evaporación del solvente es despreciable. Por otro lado, la CHXD tiene una presión de vapor más elevada ($2 \cdot 10^{-14}$ mm Hg a 25°C), aunque sigue siendo baja, lo que podría ocasionar una evaporación parcial durante la formación de las fibras, resultando en una menor eficiencia de carga. Además, el THY es altamente volátil, y la mayor distancia entre la punta del electrohilado y el colector (18.5 cm) utilizada en este caso podría contribuir a una menor eficiencia de carga en las fibras L100-55 en comparación con las fibras S100 y RS100.

Sin embargo, la distancia entre la punta del electrohilado y el colector no es el único factor que afecta la eficiencia de carga, ya que al utilizar la misma distancia (15 cm), la eficiencia de carga para S100 fue el doble que la obtenida para RS100. Es posible que los diferentes solventes utilizados para obtener las soluciones de electrohilado también influyan en estas eficiencias de carga. La baja viscosidad de la solución de cloroformo que contiene el copolímero Eudragit RS100 probablemente facilite una mayor migración del THY hacia la superficie de las fibras y, como se ha informado previamente para sistemas similares¹⁷⁸, pueda dar lugar a una pérdida del fármaco.

II.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La presencia de los agentes antimicrobianos en los apósitos, así como la posible interacción entre los polímeros y los compuestos, se analizaron mediante FTIR (Fig. 9).

La presencia de RIF en los apósitos de Eudragit® L100-55 pudo ser confirmada por la vibración a 1240 cm^{-1} que aparece en el espectro de los apósitos cargados, y que se atribuye a las vibraciones de los grupos C-O-C en la molécula de RIF¹⁷⁹. Además, se observan desplazamientos en la región característica de las bandas relacionadas con el estiramiento de los grupos C=O del polímero. La intensidad de la banda asignada a los grupos de ácido carboxílico (1703 cm^{-1}) disminuyó en comparación con la banda de estiramiento C=O debido a los grupos carboxílicos esterificados (1726 cm^{-1}), lo que sugiere interacciones ácido-base entre Eudragit® L100-55 y RIF¹⁸⁰. En el espectro de los apósitos cargados con CHXD, las bandas en 1530 y 1492 cm^{-1} podrían atribuirse a las vibraciones de flexión N-H de las aminas secundarias y los grupos imina¹⁸¹. Esta última

banda aparece a 1485 cm^{-1} en el espectro de la CHXD, el desplazamiento observado en el espectro de las fibras cargadas indica algunas interacciones supramoleculares entre el polímero y los grupos N-H del antiséptico. La presencia de THY en el espectro de Eudragit® L100-55 cargado con THY se demostró con la aparición de una banda débil a 942 cm^{-1} relacionada con la vibración de flexión fuera de plano $=\text{CH}$ ¹⁸².

Para Eudragit® S100 cargado con RIF, no hay señales que puedan asociarse a la presencia de RIF, aun cuando el contenido del antibiótico es similar a la del polímero Eudragit® L100-55. Esto se debe a que la señal característica de la RIF (1240 cm^{-1}) se superpone con la señal del polímero a 1239 cm^{-1} , atribuida a la flexión del grupo amino C-C-NH⁺¹⁸⁰. Por otro lado, las bandas a 1532 y 1577 cm^{-1} que aparecen en los apósitos cargados con CHXD podrían estar relacionadas con las vibraciones de flexión de N-H de los grupos de aminas secundarias e iminas como se ha mencionado anteriormente¹⁸³. El desplazamiento de estas bandas indicaría una interacción entre el antimicrobiano y la matriz polimérica. Varias bandas relacionadas con el THY pueden ser observadas en los apósitos de Eudragit® S100 cargados con THY, confirmando la presencia del antibacteriano. También hay una superposición de bandas en los apósitos de Eudragit® RS100 cargados con RIF, lo que dificultó la observación de las bandas relacionadas con la presencia del antimicrobiano en los apósitos cargados.

La banda a 1531 cm^{-1} causada por la vibración de flexión de los grupos N-H de la CHXD se pudo observar en los apósitos cargados y nuevamente aparecieron bandas atribuidas a THY en los apósitos de Eudragit® RS100 cargados con THY. Es importante señalar que en todos los espectros cargados de THY hubo desplazamientos evidentes de las bandas atribuidas al antimicrobiano, lo que sugiere fuertes interacciones supramoleculares entre THY y la matriz polimérica.

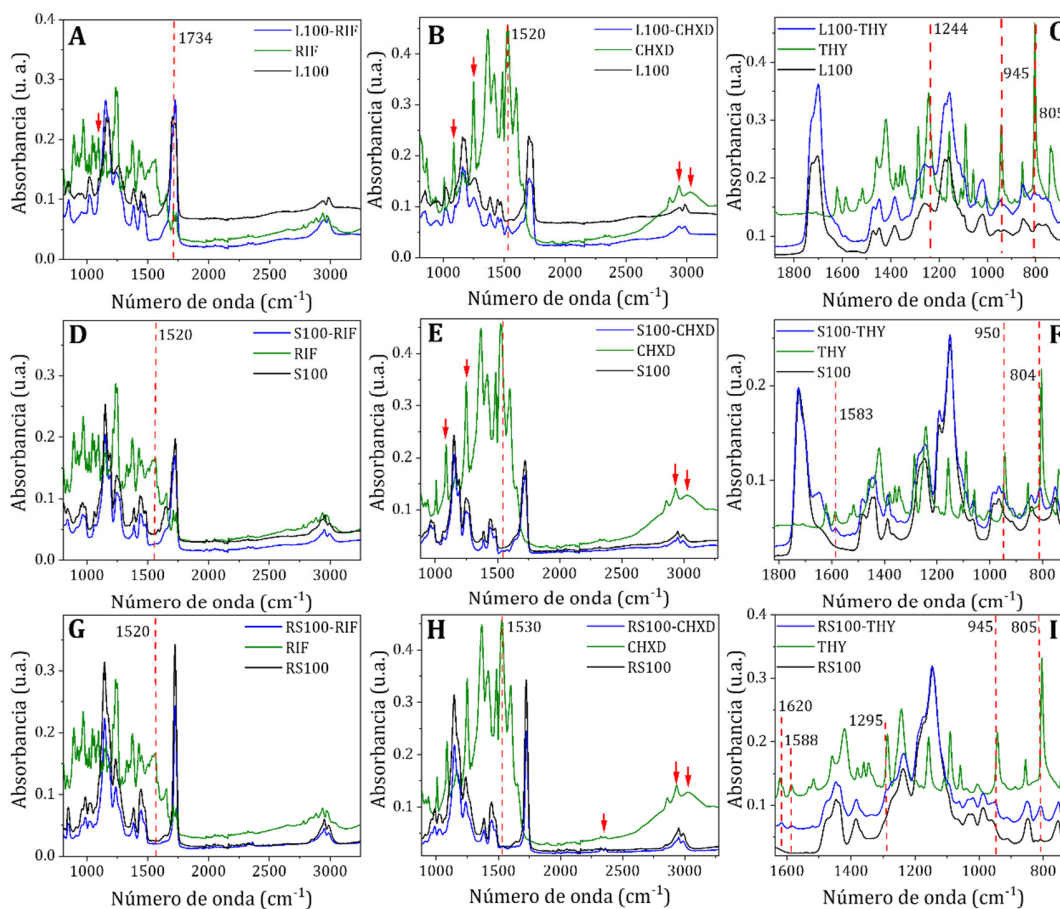


Fig. 9 Espectros FTIR de apósitos de Eudragit® sin cargar y cargados, A), B) and C) Apósitos L100; D), E) and F) Apósitos S100; G), H) and I) Apósitos RS100.

II.4.4 Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de Eudragit® L100-55, S100 y RS100 cargados y no cargados se muestran en la Fig. 10. Se pueden observar bandas a 1331 y 1570 cm^{-1} asignadas a vibraciones de estiramiento C-C en las moléculas de RIF en los apósitos cargados en Eudragit® L100-55 y S100. En los apósitos de Eudragit® RS100, una banda a 1340 cm^{-1} , asignada a modos normales con contribuciones de vibraciones de estiramiento C-C, C-N y C-O confirmó la presencia de RIF ¹⁸⁴.

En Eudragit® L100-55 y S100 cargados con CHXD se observó la banda característica de CHXD a 1604 cm^{-1} . Esta banda se desplaza en comparación con la de CHXD pura, lo que sugiere una interacción del antiséptico con el polímero ¹⁸⁵. La banda

observada a 1294 cm^{-1} en el espectro de la fibra cargada también se relacionó con la molécula de CHXD¹⁸⁶. El modo normal de vibración a 1604 cm^{-1} presente en el espectro de CHXD corresponde a grupos clorofenilo¹⁸⁷. En los espectros de Eudragit® RS100 cargado de CHXD no se encontraron estas vibraciones lo que sugiere que el entrelazamiento de las cadenas poliméricas de Eudragit® RS100 no permite que el fármaco tenga las vibraciones de la molécula libre.

La banda a 740 cm^{-1} , característica de las moléculas de THY y asignada a un movimiento combinado de estiramiento de CC (anillo) y flexión de CCC (anillo) se pudo observar en los espectros de los apósitos de Eudragit® S100 y RS100 cargadas con THY, pero en el espectro correspondiente a Eudragit® L100-55 cargado de THY, ese modo se superpone con el pico a 755 cm^{-1} que se asocia a las vibraciones CC del polímero¹⁸⁸. Sin embargo, el pico a 1270 cm^{-1} asignado a la combinación de estiramiento C-C y C-O, así como la flexión de HCC y el pico a 1622 cm^{-1} relacionado con el estiramiento del anillo de THY, confirman la presencia del compuesto antimicrobiano en los apósitos cargados¹⁸⁹.

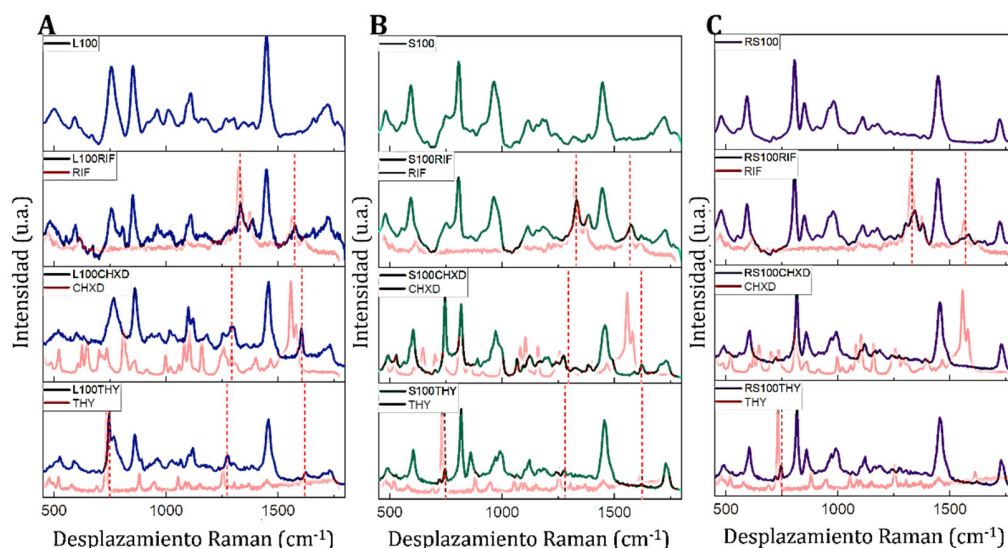


Fig. 10 Espectros Raman de Eudragit® (A) L100-55; (B) S100 y (C) RS100.

II.4.5 Efecto del pH en la morfología de los apósitos

El efecto de diferentes pHs (5.5, 7.4 y 8.2) en la morfología de los apósitos fue analizado por SEM (Fig. 11). Como se esperaba, la sensibilidad al pH del polímero de Eudragit® L100-55 fue confirmada, viéndose afectado incluso a pH 5.5. Bajo esas condiciones las fibras perdieron su forma cilíndrica y disminuyó su diámetro. Como se esperaba¹⁹⁰, gotas de tampón a pH 7.4 en la matriz de este polímero produjeron la fusión de las fibras y a pH 8.2 se fusionaron completamente. Por otro lado, aunque en teoría el polímero Eudragit® S100 es soluble a pH>7, los apósitos no parecieron ser afectados a pH 7.4, probablemente porque la deposición de unas pocas gotas de tampón en las matrices no fue suficiente para llevar a cabo la desprotonación completa de sus grupos carboxílicos, pero a pH 8.2, las fibras comenzaron a perder su forma cilíndrica. Eudragit® RS100 es un polímero que no es afectado por el pH y, como consecuencia, los apósitos no sufrieron ningún cambio morfológico después de ser expuestos a pH 5.5, 7.4 y 8.2, a pesar de que en este caso los apósitos estuvieron completamente sumergidos en los tampones correspondientes. Probablemente se necesitarían tiempos de inmersión más largos para observar la erosión de la matriz.

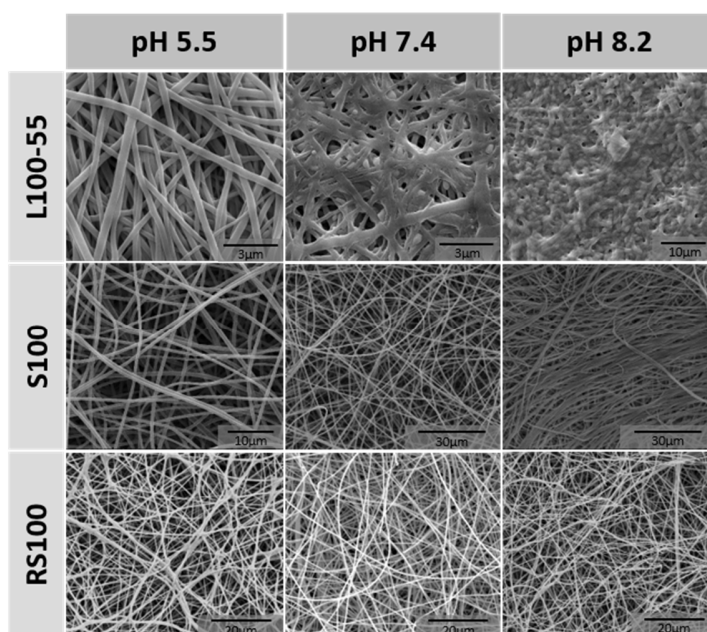


Fig. 11 Efecto del pH en la morfología de los apósitos poliméricos preparadas caracterizado mediante SEM.

II.4.6 Liberación de agentes antimicrobianos

La RIF se liberó completamente del polímero Eudragit® L100-55 a todos los pHs estudiados, aunque los resultados de FTIR sugirieron interacciones ácido-base entre el fármaco y el polímero, la disolución del polímero desencadenaría la liberación completa de toda la RIF cargada después de 24 h (Tabla 6). El mismo comportamiento se pudo observar en los apósitos poliméricos basados en Eudragit® S100, a pH 7.4, cuando los apósitos comenzaron a verse afectados por el pH, la liberación de RIF alcanzó el 100%, mientras que en un tampón ácido solo se liberó el 25% de la RIF cargada después de 24 h de contacto. Por otro lado, la liberación de los apósitos de Eudragit® RS100 no depende del pH, porque, como se mencionó anteriormente, este polímero mantiene su estructura a cualquier pH.

La liberación de CHXD de los apósitos de Eudragit® L100-55 se incrementó con un aumento de pH alcanzando el 100% de liberación a pH 8.3. En este caso, la interacción entre el polímero y los grupos N-H del fármaco evitaría la liberación repentina y completa a pHs más bajos. La liberación de CHXD de los apósitos de Eudragit® S100 presentó un comportamiento completamente diferente, se observó un aumento esperado de la liberación cuando el pH cambió de 5.5 a 7.4, en cambio, al llevar el pH a 8.2 se produjo una disminución en la cantidad de fármaco liberado. Este efecto podría estar relacionado con la ionización de la CHXD liberada en la disolución a este pH, ya que es mayor que el pKa de la CHXD, lo que causaría su readsorción en la superficie de los apósitos, como se ha observado anteriormente para otros fármacos¹⁹¹. Además, durante el proceso de disolución del Eudragit® S100, debido al debilitamiento del enlace por puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, más grupos carboxílicos podrían ser accesibles para interactuar con las moléculas catiónicas de CHXD¹⁹². La liberación acumulativa de CHXD del apósito de Eudragit® RS100 alcanzó el 88% a pH > 7.4, mientras que en pH 5.5 la liberación fue del 64%.

Tabla 6. Liberación de los agentes antimicrobianos cargados en los apósitos correspondientes después de 24 h en buffers a diferentes pHs

Polímero Eudragit®	Antimicrobiano	Liberación del fármaco a 24h (%)		
		pH 5.5	pH 7.4	pH 8.2
L100-55	RIF	100 ± 0.5	100 ± 2	100 ± 3
	CHXD	13 ± 2	40 ± 5	100 ± 4
	THY	100 ± 15	100 ± 10	100 ± 16
S100	RIF	25 ± 5	100 ± 2	100 ± 5
	CHXD	30 ± 3	72 ± 7	34 ± 9
	THY	30 ± 6	35 ± 1.7	43.6 ± 3.1
RS100	RIF	55 ± 0.2	49 ± 0.2	69 ± 0.2
	CHXD	64 ± 2	88 ± 8	100 ± 7
	THY	-	-	-

El THY, al igual que la RIF, se liberó completamente del Eudragit® L100-55 debido a la disolución del polímero después de 24 h inmerso en el medio. Sin embargo, la liberación de THY de los apósitos de Eudragit® S100 aumentó lentamente con el pH y solo se liberó el 43.6% del fármaco en el pH más alto evaluado. Este comportamiento podría deberse a las interacciones supramoleculares entre THY y el polímero de Eudragit® S100, como sugieren los resultados de FTIR. Como se mencionó antes, los apósitos de Eudragit® RS100 cargados con THY eran demasiado quebradizos para evaluar la liberación del fármaco, por lo que se descartaron para estudios posteriores.

El pH de la superficie de la piel varía entre 4 y 6, pero aumenta gradualmente con la profundidad. Esto podría explicar los valores de pH bastante altos, cercanos a la neutralidad, encontrados inmediatamente después de la destrucción de la integridad de la piel en una herida aguda¹⁹³. Durante la curación y el restablecimiento del estrato córneo intacto, la herida, una vez cicatrizada, vuelve a un pH ácido¹⁹⁴. Por otro lado, en

las heridas crónicas, los valores de pH varían en el rango de 5.5 a 8.6, debido al llamado cambio alcalino¹⁹⁵. La alcalinidad de la herida sería causada por el CO₂ disuelto, una reducción en la concentración de oxígeno y, posiblemente, por la acumulación de aniones alcalinos del metabolismo bacteriano. Se postuló en esta tesis que los diferentes valores de pH encontrados en las heridas requieren de apósitos cargados con antimicrobianos que tengan capacidad de respuesta al pH. Deberían estar cargados con antisépticos y antibióticos que se liberen con distintas cinéticas para lograr una coincidencia perfecta entre la liberación del antimicrobiano y las condiciones de cada tipo de herida.

En este escenario, se desarrollaron diferentes membranas electrohiladas cargadas con antimicrobianos para ser potencialmente utilizadas como apósitos en heridas con el objetivo de lograr un tratamiento con éxito de las heridas infectadas. Como se ha mencionado, las heridas crónicas se caracterizan por tener un pH alcalino en comparación con el pH neutro de las heridas agudas o el pH ácido de la piel intacta¹⁶⁸. Por lo tanto, de acuerdo con las cinéticas de liberación observadas en esta tesis doctoral (Tabla 13, Anexo II) en la profilaxis contra el desarrollo de infecciones sobre piel intacta con un pH de 5.5, se recomendaría el uso de apósitos compuestos de RIF cargado en Eudragit® L100-55, que liberaría el antibiótico inmediatamente eliminando cualquier bacteria patógena potencial presente en la piel. En el tratamiento de heridas crónicas infectadas (es decir, con un pH alcalino), se recomendaría el uso de apósitos compuestos de CHXD cargado en Eudragit® L100-55 porque liberaría el antiséptico de manera sostenida, alcanzando un máximo en condiciones alcalinas (Tabla 6). Finalmente, en el tratamiento de heridas agudas (es decir, con pH neutro), se recomendarían apósitos compuestos de Eudragit® S100 cargado con RIF, que mostrarían una liberación sostenida alcanzando un máximo a pH neutro (Tabla 6).

II.4.7 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los tres compuestos libres estudiados se evaluó contra *S. aureus* GFP y *E. coli* S17 para obtener los valores de MIC y MBC que se compararán más tarde con los obtenidos para los apósitos cargados con dichos antimicrobianos (Tabla 7). Para analizar la respuesta bactericida de los apósitos

cargados con antimicrobianos, se sumergieron los apósitos en 2 mL de agar inoculado con 10^5 UFC/mL de cada microorganismo patógeno. La cantidad de fármaco liberado de los apósitos correspondientes en PBS en condiciones óptimas de pH (7.4) para el crecimiento bacteriano también se incluye en la Tabla 7 con fines comparativos.

En el caso de los apósitos cargados con RIF contra *S. aureus* GFP, se necesitaron de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de material para obtener una respuesta bactericida, dependiendo del polímero. Los controles realizados utilizando apósitos no cargados mostraron que no tienen ninguna actividad antibacteriana. En cuanto a la erradicación total de *S. aureus*, Eudragit® RS100 muestra los mejores resultados en función de la cantidad reducida de RIF que es necesario se libere ($1.06 \mu\text{g/mL}$) en comparación con la liberada por Eudragit® L100-55 y S100 ($2.1 \mu\text{g/mL}$ y $2.3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Este efecto se puede atribuir a la desintegración de los apósitos de Eudragit® RS100 en el medio de cultivo que conduce a una liberación súbita de RIF. Por otro lado, en comparación con *S. aureus*, se necesitaron mayores cantidades del fármaco libre contra *E. coli* para provocar una acción bactericida, ya que RIF no penetra de manera efectiva en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas¹⁹⁶.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de los antimicrobianos libres y de los apósitos cargados con RIF y THY

Bacteria	Fármaco	Apósitos Eudragit®	MIC		MBC	
			Concentración de membrana ($\mu\text{g/mL}$)	Fármaco liberado a 24 h ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de membrana ($\mu\text{g/mL}$)	Fármaco liberado a 24 h ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i> GFP	RIF	Libre	-	0.03	-	0.05
		L100-55	50	1.05	100	2.10
		S100	10	0.23	100	2.30
		RS100	50	0.53	100	1.06
	THY	Libre	-	50	-	250
		L100-55	200	5.6	600	16.8

		S100	1000	38.5	1500	57.75
<i>E. coli</i>	RIF	Libre		3	-	>12
		L100-55	250	5.25	2000	42.00
		S100	200	4.60	2000	46.00
		RS100	3000	32.34	>4000	>43.12
	THY	Libre	-	80	-	200
		L100-55	500	14	1500	42
		S100	500	19.25	1000	38.5

Como en *S. aureus*, Eudragit® S100 cargado con RIF mostró una mejor actividad inhibitoria contra *E. coli*. En esta línea, nuestros resultados previos sobre el uso de nanofibras de PCL decoradas con nanopartículas de PLGA que cargan RIF¹⁹⁷ también mostraron el mismo rango requerido de RIF liberada (3-48 µg/mL) para lograr una reducción significativa en el crecimiento bacteriano, siendo nuevamente necesaria una concentración más alta de RIF para erradicar las bacterias Gram-negativas en comparación con las Gram-positivas. Sin embargo, en el caso de la actividad bactericida contra *E. coli*, Eudragit® L100-55 cargado con RIF muestra una mayor acción en comparación con los otros polímeros, ya que requiere la menor carga de antimicrobiano (42 µg/mL) para lograr los niveles más altos de reducción bacteriana.

Aunque Eudragit® RS100 cargado con RIF tiene actividad antibacteriana con una cantidad de antimicrobiano liberado similar a la de Eudragit® S100 y L100-55 frente a *S. aureus*, se necesitó una mayor cantidad de apósito y antimicrobiano liberado para ejercer su actividad inhibitoria contra *E. coli*. Esto puede deberse al hecho de que los apósitos de Eudragit® RS100 no se ven afectados por el pH, lo que significa que incluso en contacto con el medio de cultivo mantienen su estructura permitiendo una liberación sostenida del antimicrobiano contenido en ellos. Para ambas bacterias, se requirió una cantidad mayor de antimicrobiano para provocar la inhibición y la acción bactericida cuando se cargó en los polímeros en comparación con la acción del antimicrobiano libre.

Esto podría deberse a que cuando se incorpora RIF en los apósitos poliméricos, hay menos antimicrobiano disponible inmediatamente para inhibir la ARN polimerasa, a pesar de la liberación súbita observada para los polímeros sensibles al pH utilizados. Un efecto similar fue observado por Gilchrist *et al.*¹⁷⁷, quienes demostraron que cuando se incorporó RIF en nanofibras de PLGA, sólo se alcanzaron concentraciones de MIC y no se logró un efecto bactericida.

Los resultados de la evaluación antibacteriana de los apósitos cargados con THY mostrados en la Tabla 7 indican una reducción en la concentración necesaria para producir efectos antibacterianos cuando se utiliza este antiséptico. Como se mencionó antes, el apósito de Eudragit® RS100 cargado con THY no pudo ser evaluado debido a su estructura frágil y quebradiza. Sin embargo, los apósitos de Eudragit® L100-55 y S100 mostraron un gran efecto antimicrobiano contra ambas bacterias a pesar de la baja cantidad de THY liberado. Contra *S. aureus*, se necesitaron cantidades mayores de apósito de Eudragit® S100 cargado con THY para obtener actividad inhibitoria (5 veces más) y bactericida (2.5 veces más) en comparación con el apósito de Eudragit® L100-55 cargado con THY. Por otro lado, Eudragit® L100-55, a pesar de la baja cantidad de THY liberado, mostró una excelente actividad inhibitoria y bactericida. Contra *E. coli*, Eudragit® L100-55 cargado con THY es el sistema más eficiente como inhibidor y bactericida; sin embargo, la diferencia entre este polímero y Eudragit® S100 cargado con THY no es tan importante como en el caso contra *S. aureus*. Ambos sistemas muestran una actividad antibacteriana superior en comparación con la mostrada por el compuesto libre, lo que sugiere que la combinación y procesamiento de THY con el polímero utilizado crea un ambiente donde el efecto antibacteriano del THY se mejora en gran medida. Aunque la aplicación de apósitos cargados con THY no reduce el pH del medio para crear un ambiente ácido, la disolución del apósito disminuye considerablemente el pH del medio. Juven *et al.*¹⁹⁹ mostraron que cuando hay valores bajos de pH, la molécula de THY no se disocia, lo que hace que el fármaco sea más hidrófobo, produciendo un ambiente adecuado para una mejor unión a las regiones hidrófobas de la membrana bacteriana y facilitando la disolución del antimicrobiano en la región lipídica de la misma. Estudios previos¹⁹⁹⁻²⁰¹ en nuestro grupo señalaron una

eficacia antimicrobiana superior de apósitos a base de Eudragit® en comparación con aquellos basados en PCL electrohilado, en los que la inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* se logró cuando se liberó THY en concentraciones en el rango de 70-220 µg/mL.

En el caso de los apósitos cargados con CHXD, como se mencionó antes, se utilizó el método de difusión en disco debido a la limitada difusión del fármaco cargado en los apósitos para llegar a todo el agar dentro del pocillo. Esta limitación impide que la bacteria crezca en el agar circundante, lo que a su vez dificulta alcanzar la MIC o MBC necesaria para evaluar la eficacia de los apósitos. Otros autores han demostrado previamente la importancia del contacto directo para provocar una actividad bactericida^{199,202}. Los discos de apósitos cargados con CHDX (12, 16 y 20 mm de diámetro) se utilizaron para medir la zona de inhibición contra *S. aureus* y *E. coli* (Fig. 12).

El peso promedio de cada disco fue de $\approx 2 \pm 0.15$ mg para los de 12 mm de diámetro, $\approx 2.5 \pm 0.1$ mg para los de 16 mm y $\approx 3.1 \pm 0.11$ mg para los de 20 mm. Los discos se dejaron en contacto con el agar durante 24 horas, lo que significa que los discos de Eudragit® L100-55 de 12 mm de diámetro liberaron 12 µg/mL de CHXD creando una zona de inhibición de 15.2 ± 1.5 mm contra ambos *S. aureus* y *E. coli*, mientras que los discos de 20 mm de diámetro que liberaron 16 µg/mL lograron una zona de inhibición de 21.6 ± 1.2 mm para ambas bacterias. En el caso de las muestras de Eudragit® S100, los discos de 12 mm liberaron 20 µg/mL creando una zona de inhibición de 12.5 ± 0.8 mm contra *S. aureus* y 14.6 ± 2 mm contra *E. coli*.

Mientras que para los discos de 16 mm la zona de inhibición se extendió hasta 17.3 ± 2.3 mm (*S. aureus*) y 18.5 ± 0.8 mm (*E. coli*); los discos de 20 mm de diámetro crearon una zona de inhibición de 21.6 ± 0.9 mm (*S. aureus*) y 23.7 ± 1.2 mm (*E. coli*). Los discos de Eudragit® RS100, por su parte, liberaron 29 µg/mL (12 mm) creando zonas de inhibición de 26 ± 2.1 mm contra ambos patógenos, 33 µg/mL (16 mm de diámetro) creando una zona de inhibición de 24.4 ± 0.15 mm para *S. aureus* y 32.4 ± 0.5 mm para *E. coli* y finalmente 40 µg/mL (20 mm de diámetro) creando una zona de inhibición de 36 ± 1.2 mm y 37 ± 1 mm para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. Según

la norma 195920-ASTM E2149-01²⁰³, todos los discos mostraron efectos antibacterianos, ya que la zona de inhibición supera 1 mm.

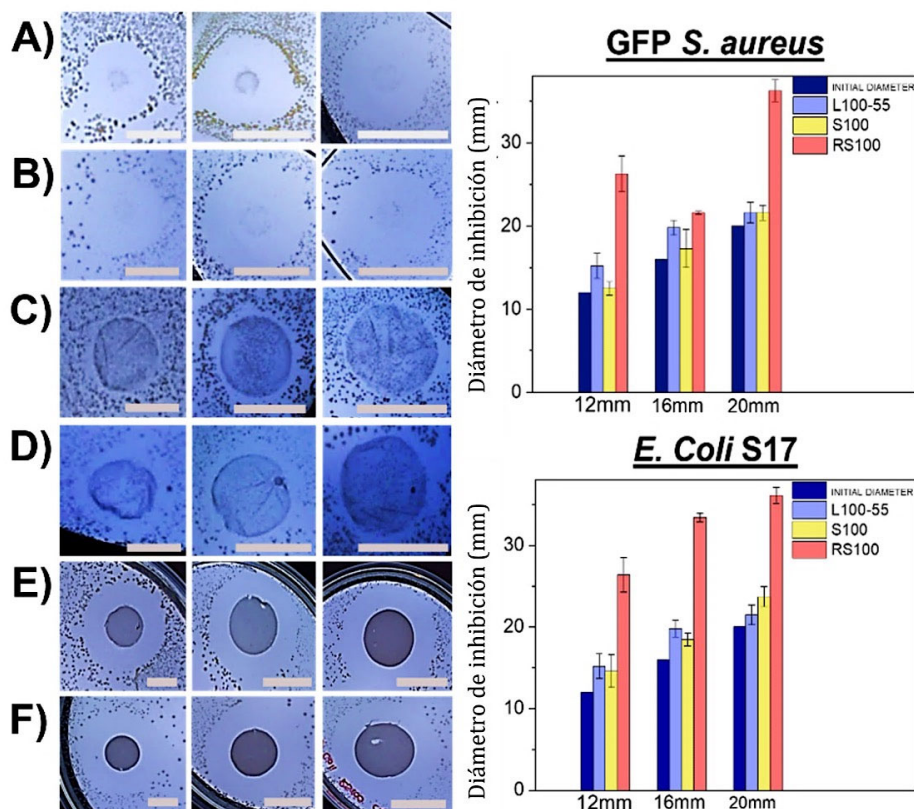


Fig. 12 Imágenes representativas de la prueba de difusión de discos antimicrobianos para Eudragit® L100-55/CHXD (A), S100/CHXD (C) y RS100/CHXD (E) contra *S. aureus* y Eudragit® L100-55/CHXD (B), S100/CHXD (D) y RS100/CHXD (F) contra *E. Coli* después de 24 h. Gráfico de las mediciones del disco y su efecto antimicrobiano. Escala: 10mm.

II.4.8 Citocompatibilidad

La citocompatibilidad de los apósitos sintetizados se evaluó, a nivel del metabolismo celular, en macrófagos J774 mediante el ensayo de viabilidad celular Cell Blue® Viability Assay Kit. Las células se expusieron a una concentración 4 mg/mL de los diferentes apósitos cargados con los fármacos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con células no tratadas (control para la evaluación de los antimicrobianos libres) o con células tratadas con los apósitos

correspondientes sin carga (control para la evaluación de los apósitos cargados con antimicrobianos).

Como se muestra en la Fig. 13, los antimicrobianos libres alcanzaron porcentajes bajos de viabilidad en las concentraciones cargadas en los apósitos, mostrando porcentajes inferiores al 60%, siendo la CHXD el fármaco que ejerció los efectos más citotóxicos en las células. El tratamiento de las células J774 con los apósitos cargados durante 24 h mostraron porcentajes de viabilidad superiores al 80% en el caso de RIF, siendo los apósitos de Eudragit® RS100 cargados con RIF los más citocompatibles, mostrando porcentajes similares a los obtenidos para la muestra de control (~100%). Los apósitos cargados con CHXD mostraron viabilidades superiores al 70%, excepto para el Eudragit® RS100 cargado con CHXD cuyo porcentaje fue ligeramente inferior (~65%).

Los apósitos cargados con THY mostraron los porcentajes de viabilidad más bajos (<70%), lo que indica que, a la concentración utilizada, este material cargado con THY es citotóxico (según el valor establecido por la norma ISO 10993-5), mientras que los apósitos cargados con RIF y CHXD cumplen con los requisitos de esta norma ISO.

Nuestros resultados revelaron una viabilidad celular significativamente mayor al utilizar apósitos cargados con antimicrobianos en comparación con el tratamiento celular con los compuestos libres, destacando la eficiencia de la encapsulación de fármacos para lograr una liberación sostenida y reducir la citotoxicidad.

RIF, como se ha mencionado anteriormente, es un antibiótico de amplio espectro bien conocido que se administra para tratar una amplia gama de infecciones bacterianas patógenas. Nuestros resultados mostraron una alta citocompatibilidad de los apósitos cargados con RIF a las concentraciones evaluadas, lo que indica su idoneidad para fines biomédicos, como también han demostrado estudios anteriores.

Estudios anteriores indican que la viabilidad celular de osteoblastos humanos en andamios tridimensionales de PCL cargados con diferentes concentraciones de RIF alcanzó valores cercanos a los obtenidos para la muestra control sin tratar después de 24 h de incubación, incluso cuando el andamio liberó más de 1 mg/mL del antibiótico,

una concentración mucho más alta que la de esta tesis ($\leq 42 \mu\text{g/mL}$)²⁰⁴. También se ha descrito la utilización de quitosano y proteínas derivadas de la matriz extracelular en diferentes proporciones para fabricar andamios cargados con RIF (0.5 mg por andamio), que mostraron baja citotoxicidad en las células HMEC-1, aunque los perfiles de liberación del antibiótico de los andamios no se muestran²⁰⁵.

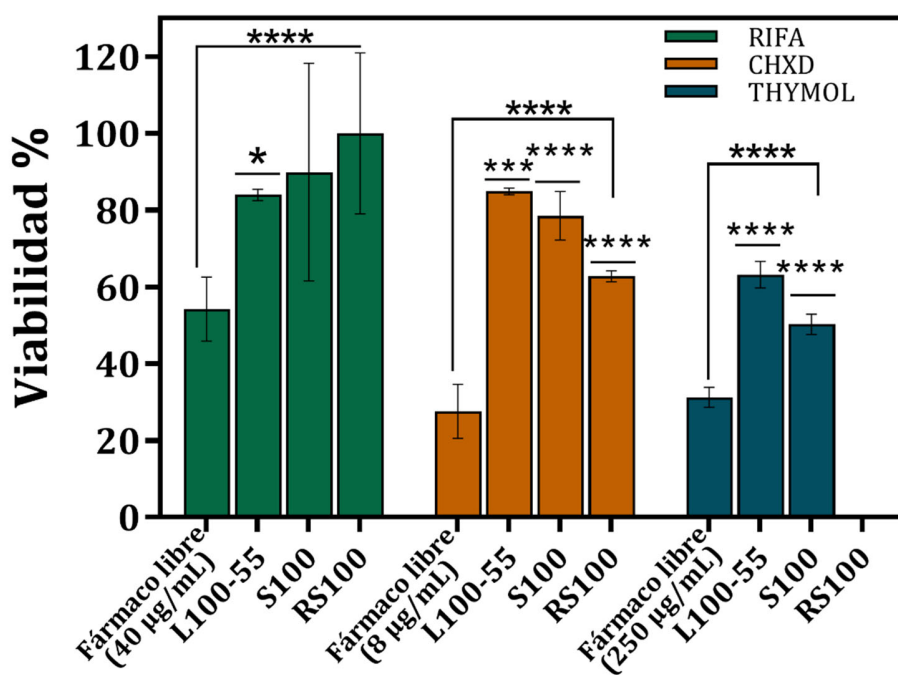


Fig. 13 Viabilidad celular en la línea J774 de apósitos cargados con RIF, CHXD y THY de Eudragit® L100-55, S100 y RS100 en comparación con la dosis equivalente del compuesto antimicrobiano libre. Se asignó una viabilidad del 100% a cada fármaco libre el de las células de control no tratadas y para cada fibra cargada, los apósitos no cargados se utilizaron como muestras de control para las membranas cargadas con antimicrobianos. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias estadísticas significativas entre el fármaco libre y los apósitos cargados se representan entre corchetes, mientras que las diferencias entre cada fibra analizada y la cargada se representan encima de cada columna de fibra analizada (* $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

Estudios previos en nuestro grupo mostraron resultados similares cuando osteoblastos humanos se sembraron directamente en andamios de PCL cargados con micropartículas de PLGA que contenían RIF, cuya liberación de fármaco fue significativamente mayor que la proporcionada por los apósitos actuales (96-148 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a $\leq 42 \mu\text{g}/\text{mL}$) debido al uso del polímero de degradación rápida PLGA¹⁹⁷. Los antisépticos THY y CHXD ejercieron efectos más perjudiciales, como se esperaba debido a su carácter antiséptico no selectivo. Los macrófagos J774 tratados con andamios de PCL cargados con THY durante 24 h también mostraron porcentajes de viabilidad bajos (<50%), pero superiores a los obtenidos en muestras tratadas con la dosis equivalente del compuesto libre¹⁹⁷. La liberación de THY de estos andamios (60-90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se encontraba dentro del rango del actual trabajo (27-194 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Anteriormente, otros andamios, hechos de tereftalato de polietileno modificado por quitosano reticulado con genipina cargados con CHXD se probaron en cultivos de células L132 y mostraron resultados similares a los nuestros, pero después de 3 días de incubación y con una liberación del antiséptico más alta durante las primeras 24 horas²⁰⁶. Además, los recubrimientos de CHXD en nanopartículas de sílice incorporadas en una formulación comercial de cemento óseo de polimetilmetacrilato (PMMA) (Cemex®) dieron lugar a porcentajes elevados de viabilidad (>70%) cuando se cultivaron células Saos-2 (línea celular derivada de osteosarcoma primario) con el medio liberado de estos complejos, aunque se observó una liberación del antiséptico baja²⁰⁷.

La regeneración de la piel después de una infección de una herida y el tratamiento posterior con un antiséptico implica la eliminación de bacterias patógenas, pero también de algunas células de la piel. Sin embargo, se reclutan nuevas células en la zona dañada debido a la respuesta inmunitaria para regenerar los tejidos y, por lo tanto, reparar la piel. Después de la eliminación de las bacterias patógenas, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales son enviados por el organismo para iniciar el proceso regenerativo: la proliferación, migración y regeneración celular.

II.5 Conclusiones

Se han desarrollado apósitos antimicrobianos que podrían ser utilizados como apósitos inteligentes con capacidad de respuesta al pH con el fin de ajustar la cinética de liberación de los antimicrobianos contenidos según las necesidades de la herida en las diferentes etapas de la cicatrización. En la profilaxis contra el desarrollo de infecciones sobre la piel intacta, con un pH de 5.5, se recomendaría el uso de apósitos compuestos de Eudragit® L100-55 cargadas con RIF, las cuales liberarían el antibiótico cargado de manera inmediata, eliminando cualquier bacteria patógena potencial presente y evitando la colonización de una herida potencial. En el tratamiento de heridas crónicas infectadas (es decir, con pH alcalino), se recomendaría el uso de apósitos basados en Eudragit® de L100-55 cargados con CHXD, ya que liberarían el antiséptico gradualmente, alcanzando un máximo en condiciones alcalinas. Finalmente, en el tratamiento de heridas agudas (es decir, con pH neutro), se recomendaría el uso de apósitos compuestos de Eudragit® S100 cargadas con RIF, mostrando una liberación sostenida que alcanzaría un máximo a pH neutro. Se observó una acción antimicrobiana eficiente contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mientras que la citotoxicidad contra células eucariotas se redujo cuando se incorporaron los antimicrobianos en los apósitos en comparación con el efecto de los compuestos libres.

Capítulo III
APÓSITO DE LIBERACIÓN
CONTROLADA CON COMBINACIÓN
DE ANTIBIÓTICOS SINÉRGICOS

III.1 Introducción

Todas las heridas, desde el momento de la incisión cutánea, se colonizan con bacterias presentes en el aire, la piel circundante (microbiota comensal) y cualquier material involucrado en la producción de la herida inicial²⁰⁸. A menos que estén infectadas, la mayoría de las heridas simples cicatrizan sin necesidad de terapia con antibióticos, pero el tratamiento local con antibióticos (por ejemplo, mupirocina, nadifloxacina, neomicina, bacitracina, ácido fusídico, etc.) puede estar indicado en circunstancias especiales en heridas infectadas como opción de segunda línea, considerando que es necesario prevenir el desarrollo de resistencia y reacciones de hipersensibilidad. Por lo tanto, aunque es posible recetar antibióticos tópicos para prevenir infecciones en heridas simples, aún existe controversia sobre su uso debido a la posibilidad de reacciones alérgicas locales, una penetración deficiente en la piel y la mencionada aparición de organismos resistentes con la exposición a dichos antibióticos²⁰⁹. Sin embargo, se ha demostrado que los antibióticos tópicos son efectivos para reducir el riesgo de infecciones en heridas simples en comparación con placebo o antisépticos²¹⁰. Además, el uso de antibióticos ha dado lugar a varios resultados clínicos de éxito asociados con la reducción de infecciones localizadas tras una cirugía y en infecciones crónicas en heridas abiertas²¹¹. Una estrategia para prevenir y tratar infecciones clínicas en úlceras venosas es el uso de antibióticos/antisépticos tópicos. Las preparaciones tópicas pueden consistir en cremas, pomadas y apósitos impregnados diseñados para permanecer en contacto con la superficie de la herida. Sin embargo, las pautas de prescripción en algunos países como el Reino Unido son muy restrictivas sobre el uso de antibióticos tópicos e indican que los antibióticos no deben usarse en heridas crónicas, como úlceras venosas, excepto en casos de infección definida²¹².

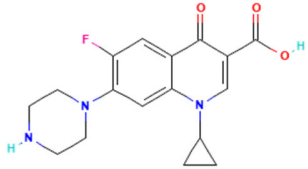
En el caso de utilizar apósitos cargados con antibióticos, una liberación inicial repentina eliminaría cualquier bacteria presente en la herida y una liberación sostenida evitaría cualquier reinfección posterior, mejorando el resultado clínico²¹³. Apósitos electrohilados cargados con compuestos antimicrobianos con cinéticas de liberación específicas pueden ayudar simultáneamente a la eliminación de la carga bacteriana

inicial tras la generación y contaminación de la herida y a la profilaxis posterior acelerando el proceso regenerativo de curación de la herida. Algunos ejemplos en la literatura reciente describen el uso de sistemas de liberación bifásicos de fármacos que contienen antimicrobianos (por ejemplo, amoxicilina sódica) para el desarrollo de apósitos de liberación controlada²¹⁴.

La RIF, un antibiótico semisintético hidrofóbico, descrito en el capítulo II, se utiliza en el tratamiento de una gran variedad de infecciones bacterianas provocadas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, cocos Gram-positivos (*Staphylococcus* y *Streptococcus*), entre otros^{215,216}. La RIF siempre se utiliza en combinación con otros antibióticos para tratar infecciones bacterianas por su elevada capacidad para generar resistencias. Diversos autores han evaluado la actividad aditiva o sinérgica de la RIF contra diversas especies patógenas. Por ejemplo, Rand y Houck²¹⁷ evaluaron la sinergia entre la daptomicina y otros 18 antibióticos contra 19 cepas de enterococos resistentes a altos niveles de vancomicina, y encontraron una reducción del 73.3 % en la MIC para la RIF cuando se usaba en combinación con daptomicina.

El ciprofloxacino (CIP, Tabla 8) es un derivado de fluoroquinolona que actúa como agente antibacteriano inhibiendo el crecimiento tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, y se ha encontrado que su uso en heridas infectadas mejora el proceso de cicatrización de heridas²¹⁸. Es uno de los antibióticos utilizados más ampliamente en la curación de heridas infectadas debido a su baja MIC contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas comúnmente asociadas a infecciones de heridas²¹⁹. A diferencia de la RIF, el CIP se ha utilizado tanto en monoterapia como en terapia combinada. La combinación de RIF y CIP ha demostrado ser altamente eficaz en el tratamiento de infecciones tempranas en articulaciones protésicas, sin necesidad de retirar el dispositivo, lo que resulta en una tasa de éxito terapéutico elevada²²⁰. Además, se ha comprobado que esta combinación es efectiva tanto contra bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*²²¹.

Tabla 8. Propiedades molecular y fisicoquímicas del ciprofloxacino. Datos obtenidos de PubChem®. Las características de la RIF ya fueron descritas en el capítulo anterior (ver Tabla 4)

Ciprofloxacino		
	Peso molecular:	331.34 g/mol
	Punto de fusión:	253-257°C
	pH en disolución acuosa:	3.5-4.6
	Hidrosolubilidad (25°C):	pH 7.3- <1mg/mL
	Soluble en:	Agua, ácido clorhídrico (HCl), DMSO.

Se observó sinergia entre CIP y RIF contra *S. aureus*²²², sin embargo, también se han descrito algunos ejemplos en los que la RIF actúa como antagonista de CIP contra cepas específicas, por ejemplo, contra *E. faecalis*²²³. Por lo tanto, la sinergia o antagonismo son específicos de cada patógeno analizado y de cada combinación antibiótica. La terapia combinada se ha establecido como un enfoque eficaz para reducir la resistencia a los antibióticos, pero es importante tener en cuenta que su aplicación es específica para cada cepa. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Coe *et al.*²²⁴ en el cual se demostró que la combinación de CIP con RIF produce una acción bacteriostática aditiva *in vitro* en dos cepas experimentales de *S. aureus*, 69898 y 6989R. Además, se ha observado que dicha combinación de antibióticos resulta eficaz en el tratamiento de infecciones recurrentes tempranas causadas por *S. epidermidis* en implantes posoperatorios²²⁵. No obstante, es importante realizar una evaluación de la eficacia a largo plazo de las combinaciones de antibióticos, ya que se ha descrito la disminución, en algunos casos, de la eficacia de combinaciones específicas, resultando en una eficacia inferior a la que se obtendría con cada fármaco por separado²²⁶.

Como se mencionó anteriormente, una combinación de un antimicrobiano de liberación rápida junto con otro de liberación sostenida podría ser apropiada para las heridas infectadas para eliminar en primera instancia la contaminación de la herida y

posteriormente para producir una profilaxis ante la entrada de un nuevo patógeno. En este capítulo se demuestra que el CIP debido a su alta hidrofiliidad se liberaría rápidamente al inicio, mientras que la RIF, al ser hidrofóbica, proporcionaría una liberación sostenida. Recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre apósitos para heridas basados en fibras que ofrecen una liberación sostenida de antibióticos y facilitan la cicatrización de heridas²²⁷. Por otro lado, las micropartículas, debido a su alta relación superficie-volumen se han utilizado ampliamente para proporcionar una liberación rápida inicial. En esta tesis, el uso de dos morfologías diferentes, fibras para la carga de RIF y micropartículas para la carga de CIP en el mismo apósito, proporcionaría una cinética de liberación cinética óptima gracias a una difusión inicial rápida y una posterior erosión de la matriz polimérica debida a dos morfologías distintas (fibras y micropartículas).

III.2 Objetivo

El objetivo de este capítulo consiste en desarrollar un apósito avanzado mediante el proceso de electrohilado/electroesprayado conteniendo RIF y CIP y mostrando una cinética de liberación determinada. Se estudia también en este capítulo la sinergia de los antibióticos RIF y CIP frente a *S. aureus* y *E. coli*. Este apósito se basa en la deposición de fibras del polímero Eudragit® RS100 cargadas con RIF que fueron decoradas con micropartículas también de Eudragit® RS100, cargadas con CIP. Tanto las fibras como las micropartículas fueron preparadas mediante técnicas electrohidrodinámicas. Se llevó a cabo una evaluación de la actividad bactericida del apósito preparado, contra *S. aureus* y *E. coli* tanto en su forma planctónica como en la prevención de la formación de biofilms y contra biofilms ya maduros. Además, se realizó un análisis de citotoxicidad a las dosis bactericidas en tres líneas celulares humanas modelo (queratinocitos epidérmicos humanos (HaCat), macrófagos J774 y fibroblastos) para demostrar su inocuidad frente a células somáticas.

III.3 Síntesis de apósitos y su caracterización

La preparación de las fibras se llevó a cabo mediante el método de electrohilado. Para ello, se preparó una solución al 30% w/v de Eudragit® RS100 en CHCl₃, que se agitó durante 30 minutos. En el caso de las fibras cargadas con RIF (RIF/RS100), se añadió un 2.5% w/w de RIF con respecto al polímero y se agitó durante 20 minutos adicionales.

Para la preparación de las partículas, se utilizó el método de electrospraying. Se preparó una solución al 13% w/v de Eudragit® RS100 en CHCl₃, que fue agitada durante 30 minutos. Para las partículas cargadas con CIP (CIP/RS100), se disolvió un 15% w/w de CIP con respecto al polímero en 200 µL de ácido trifluoroacético (TFA). Esta solución se añadió a la mezcla de RS100/CHCl₃ junto con un 0.5% w/v de Tween® 80 para estabilizarla.

La deposición de las fibras y partículas se realizó por electrohilado y *electrospraying*, respectivamente, primero por separado y luego colocando las fibras primero y decorándolas con partículas para formar el apósito final (RIF-CIP/RS100). Los detalles sobre el equipo utilizado y las condiciones de deposición, como la distancia, el flujo y los voltajes utilizados para depositar las fibras y las partículas, se encuentran en el Anexo I. Las fibras, partículas y el apósito RIF-CIP/RS100 sin carga se utilizaron para la caracterización de los materiales de manera individual, y como control en los ensayos biológicos descritos en este capítulo.

Una vez depositadas las fibras, partículas y apósito RIF-CIP/RS100, se llevó a cabo un análisis de su morfología utilizando microscopía SEM. Con el objetivo de evaluar las posibles interacciones entre el fármaco y el polímero, se registraron los espectros de infrarrojo. Para determinar la cantidad de antibiótico presente en las fibras RIF/RS100 y en las partículas CIP/RS100, se realizó un análisis independiente. Tres muestras de cada síntesis fueron disueltas individualmente en DMSO y se analizaron mediante espectrofotometría UV-Vis.

La carga de los fármacos en los apósitos RIF-CIP/RS100 fue determinada mediante UHPLC, al igual que la liberación *in vitro* del apósito RIF-CIP/RS100. Todos los

equipos utilizados, los detalles de preparación de las muestras y las características de los métodos se encuentran detallados en el Anexo I.

III.3.1 Análisis biológicos *in vitro*

La actividad antibacteriana de RIF y CIP libres contra *S. aureus* ATCC 25923 fue evaluada en la tesis doctoral de la Dra. Cristina Yus Argón²²⁸, mientras que la actividad antibacteriana del RIF y CIP libres individualmente frente a la cepa *E. coli* S17, se determinaron dentro de esta tesis. Para ello se utilizó una cantidad específica de RIF (0-0.5 ppm para *S. aureus* y 0-60 ppm para *E. coli*) disuelto en un 2% (v/v) de DMSO y CIP (0-1.25 ppm para *S. aureus* y 0-0.05 ppm para *E. coli*) disuelto en agua estéril.

Se determinaron los valores de MIC y MBC para los apósitos RIF-CIP/RS100 siguiendo el método de análisis estándar de diluciones seriadas ASTM E-2180-18¹⁷³. Se llevó a cabo un estudio de sinergia para investigar la interacción entre los antibióticos RIF y CIP mediante la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI), los métodos utilizados se detallan en el Anexo I.

Además, se evaluó el efecto del apósito RIF-CIP/RS100 a concentraciones de 0.05-4 mg/mL en la inhibición y disrupción del biofilm de ambas bacterias. Estas concentraciones fueron comparadas con la combinación de los fármacos en forma libre, liberados de los apósitos, en las mismas dosis.

Adicionalmente, se evaluó la citotoxicidad del apósito RIF-CIP/RS100 a concentraciones que variaron entre 0.05 y 2 mg/mL. Asimismo, se llevó a cabo la medición de la citotoxicidad del apósito de RS100 sin carga a las mismas concentraciones y de la combinación de los fármacos en forma libre a concentraciones equivalentes a las liberadas durante un período de 24 horas. Este ensayo se llevó a cabo utilizando macrófagos J774, HaCat y fibroblastos dérmicos humanos como modelos de líneas celulares humanas. Los métodos están detallados en el Anexo I.

III.4 Resultados y discusión

III.4.1 Caracterización fisicoquímica de los materiales

De acuerdo con las imágenes obtenidas por SEM, las fibras cargadas con RIF mostraron un diámetro medio de $1.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (Fig. 14A-B), siendo similar al de las

fibras sin cargar (Tabla 5). La eficiencia de encapsulación de RIF según los resultados de UHPLC fue de alrededor del 90% (Tabla 9), tanto el diámetro como la carga del fármaco concuerdan con los datos presentados anteriormente en la Tabla 5 de la sección II.4.1. De la misma manera que se describió anteriormente, se mantuvo constante la concentración de RIF en la solución precursora polimérica (2.5% w/w) para asegurar un cono de Taylor estable. Sin embargo, en el presente capítulo se prescindió del uso de la configuración coaxial debido a que no fue necesaria para obtener un cono de Taylor estable durante el proceso de electrohilado, ya que la humedad ambiente presente en las condiciones experimentales ralentizó la evaporación del solvente. Como resultado, la carga de fármaco obtenida en las fibras fue de 2.3 ± 0.07 % w/w, cercano al obtenido anteriormente (Tabla 5).

Las micropartículas cargadas con CIP depositadas en el colector presentaron una morfología esférica con un diámetro promedio de 1.2 ± 0.4 μm (Fig. 14C-D). De acuerdo con resultados de la tesis doctoral de la Dra. Cristina Yus Argon²²⁸, las micropartículas de Eudragit® RS100 sin antibiótico preparadas en la misma solución precursora (CHCl_3 +TFA+Tween® 80) tenían una distribución de tamaños de 1.4 ± 0.5 μm , por lo tanto, la presencia de CIP en la solución de electrohilado no produjo cambios importantes en los tamaños de las partículas resultantes. Dentro de la misma tesis doctoral²²⁸ se identificó una limitación importante en la encapsulación de CIP en las partículas debido a la insolubilidad de este antibiótico en medios orgánicos, debido a su alta hidrofiliidad. Para abordar este problema, se utilizó un enfoque en dos pasos. Primero, se disolvió CIP en TFA y posteriormente se preparó una emulsión de esta solución en una solución del polímero en cloroformo, estabilizada con Tween® 80. Reproduciendo este método se logró una alta carga de fármaco en la solución precursora (15% w/w con relación al peso del polímero). Además, la eficiencia de encapsulación obtenida fue del $88 \pm 7.2\%$, lo que resultó en una carga de fármaco de aproximadamente $12 \pm 1\%$ w/w (Tabla 9), datos que concuerdan con resultados previos²²⁸. La carga de CIP obtenida fue mayor a la de estudios realizados por Dillen *et al.*²²⁹, quienes obtuvieron una eficiencia de encapsulación de alrededor del 65% w/w utilizando únicamente Eudragit® RS100 en partículas sintetizadas mediante la técnica

de emulsificación y evaporación de solvente w/o/w seguida de homogeneización a alta presión. Sin embargo, lograron aumentar la carga de fármaco hasta el 70% w/w al combinar Eudragit® RS100 con PLGA. Por otro lado, se han descrito partículas de quitosano cargadas con CIP generadas mediante electroesprayado, las cuales presentaron cargas de fármaco más altas (alrededor del 15% w/w), pero con una eficiencia de encapsulación más baja (76% w/w)²³⁰. Hasta el momento, no se han descrito estudios previos sobre la síntesis de partículas cargadas de CIP/RS100 obtenidas mediante electroesprayado.

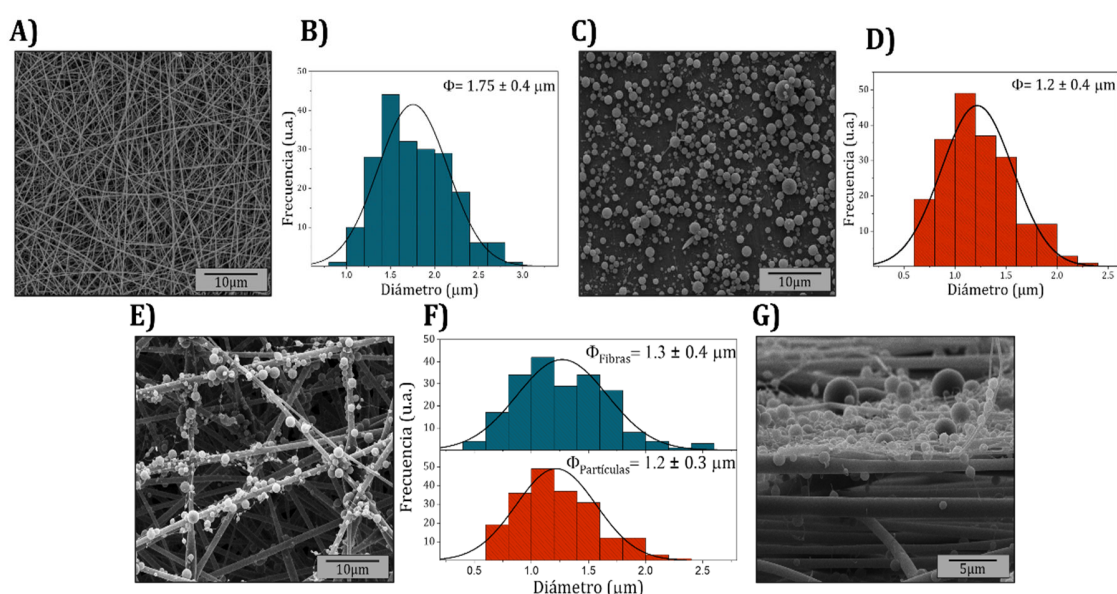


Fig 14. Morfología de los materiales presentados. Micrografías electrónicas de barrido y su respectiva distribución de tamaño ($N = 200$) de fibras RIF/RS100 (A, B); partículas CIP/RS100 (C,D); fibras decoradas con partículas RIF-CIP/RS100 (E,F); y sección transversal de fibras decoradas con partículas RIF-CIP/RS100 (G).

La decoración de las fibras con partículas garantiza que ambos fármacos puedan liberarse desde un único apósito y con distintas cinéticas de liberación. Las Fig. 14E y 14G muestran imágenes representativas de las fibras RIF-CIP/RS100, una en una vista superior y otra de una sección transversal, respectivamente. Fue necesario realizar modificaciones en las condiciones de síntesis debido al uso del colector de tambor giratorio, más apropiado para la obtención de fibras decoradas con partículas. Por esta

razón los diámetros promedio de las fibras cargadas con RIF ($1.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$) (Fig. 14F) fueron menores a los obtenidos para las fibras sin decorar (Fig. 14B). El uso del colector rotatorio permitió lograr una distribución homogénea de partículas depositadas sobre la matriz de fibras. En el caso de las partículas, los diámetros promedio ($1.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$) (Fig. 14F) en los apósitos RIF-CIP/RS100 fueron muy similares a los obtenidos para las micropartículas cargadas de CIP depositadas en el colector plano (Fig. 14D).

La eficiencia de encapsulación de la RIF en las fibras depositadas en el tambor colector resultó ser menor en comparación con las fibras recuperadas en el colector plano (Tabla 9). Esta ligera reducción del 90% al 87.1% podría atribuirse al voltaje más bajo requerido en este caso para lograr un cono de Taylor estable. Se ha observado que un aumento en el voltaje resulta en un mayor flujo de la disolución entre la aguja y el colector²³¹. Al aplicar un voltaje más bajo para el tambor colector, la velocidad de flujo de la disolución se reduce, lo que prolonga el tiempo para que el fármaco difunda y se evapore desde la disolución inicial, aumentando su pérdida en el trayecto desde la jeringa al colector.

También se observó una disminución significativa en la eficiencia de encapsulación de CIP para las partículas depositadas en las fibras. Nuevamente, esto se debe a que hay una mayor distancia entre la punta de la aguja y el colector, lo que provoca una posible mayor difusión y evaporación del fármaco presente en el disolvente en su vuelo desde la aguja hasta el colector.

Tabla 9. Parámetros de síntesis y resultados de caracterización de los materiales obtenidos

		Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Diámetro (μm)	E.E. (%)	D.L. (% w/w)
Fibras RIF/RS100		15-19	15	1.7 ± 0.4	90 ± 2.8	2.2 ± 0.08
Partículas CIP/RS100		17-20	7	1.2 ± 0.4	88 ± 7.2	12 ± 1.0
RIF-CIP/RS100	Fibras RIF/RS100	9-13	15	1.3 ± 0.4	87.1 ± 7.6	0.6 ± 0.1
	Partículas CIP/RS100	16-18	22	1.2 ± 0.3	56.1 ± 10.6	2.0 ± 0.1

El análisis de FTIR se llevó a cabo para confirmar la presencia de RIF en las fibras cargadas y una posible interacción entre el fármaco y el polímero, sin embargo, solo se detectaron vibraciones relacionadas con el Eudragit® RS100 en las fibras cargadas (Fig. 15A), probablemente debido a la baja concentración del antibiótico presente en las fibras, que se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. También se investigó la presencia de CIP e interacciones potenciales fármaco-polímero en las partículas cargadas mediante análisis de FTIR. La Fig. 15B, complementa los datos presentados con los obtenidos en la Tesis doctoral de la Dra. Cristina Yus Argon²²⁸, es conveniente la comparación con dichos resultados ya que muestran los espectros de FTIR típicos de las partículas de RS100, CIP libre y las micropartículas CIP/RS100. Se pueden observar vibraciones características de CIP a 1614 y 1283 cm^{-1} debido a la vibración del grupo fenilo conjugado con -COOH y la vibración de estiramiento del enlace C-F, respectivamente²³². Para las partículas cargadas con CIP, se pueden observar vibraciones relacionadas con el polímero a 1722 cm^{-1} (estiramiento C=O), 1448 cm^{-1} (flexión asimétrica de CH_2), 1384 cm^{-1} (flexión asimétrica de CH_3), 1144 cm^{-1} (estiramiento C-CO-C) y 1098 cm^{-1} (estiramiento C-N)²³³. Un pequeño pico a 1629 cm^{-1} confirmaría la presencia de CIP en las partículas. El desplazamiento significativo observado para esta banda sugeriría interacciones fármaco-polímero, ya que los compuestos ácidos como el CIP interactúan con los polímeros de Eudragit® mediante interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilo del fármaco y los grupos de amonio cuaternario del polímero²²⁹. Se observaron resultados similares en el material RIF-CIP/RS100 (Fig. 15C), en este caso, el espectro de FTIR muestra picos a 1622 y 1596 cm^{-1} , que estarían relacionados con la vibración del grupo fenilo conjugado con -COOH de CIP. La interacción del antibiótico y el polímero también se confirmaría en este caso por el desplazamiento en el número de onda observado.

En la Fig. 15D se muestran el perfil de liberación de RIF y CIP del sistema RIF-CIP/RS100. Alrededor del 95 % de CIP cargado se liberó en las primeras 8 h para luego estabilizarse a un nivel constante. La liberación inicial estaría relacionada con la disolución y la rápida difusión del antibiótico hidrofílico desde las partículas superficiales en contacto con el medio de liberación acuoso. Esta cinética de liberación

es muy adecuada para erradicar primero las bacterias iniciales y prevenir su colonización gracias a la liberación rápida de CIP, mientras que la liberación paulatina y sostenida de la RIF podría prevenir el crecimiento de los supervivientes de la liberación inicial además de producir un efecto profiláctico²¹³.

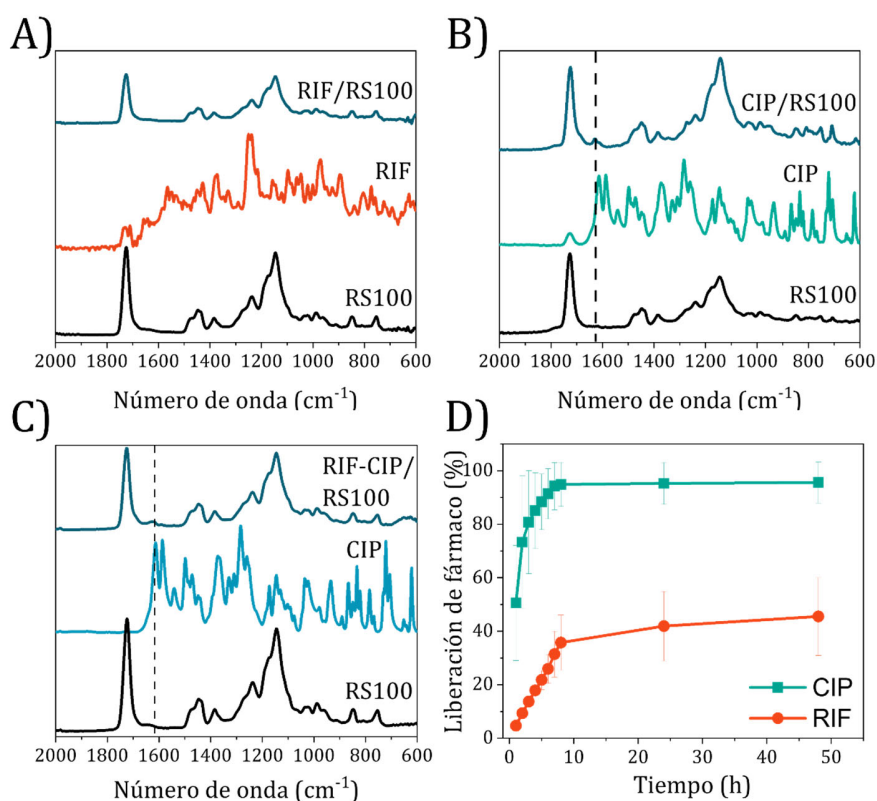


Fig. 15 Comparación de los espectros de FTIR de A) RS100, RIF y RIF/RS100; B) RS100, CIP y CIP/RS100; C) RS100, CIP y RIF-CIP/RS100; y D) liberación de fármacos de RIF-CIP/RS100.

La liberación de RIF en las primeras 8 h solo alcanzó el 35 % del fármaco total cargado y luego aumentó lentamente hasta alcanzar el 45 % después de 48 h, probablemente debido a su baja solubilidad acuosa. Gracias a esto el apósito cargado produce un efecto antibacteriano prolongado debido a la retención de la RIF en las fibras. La diferente solubilidad en agua de ambos antibióticos, así como la diferente morfología de las partículas y de las fibras, influyen en el porcentaje de liberación observado. Además de la superior solubilidad en agua del CIP en comparación con la

RIF, la mayor relación superficie-volumen de las partículas en comparación con el de las fibras, también facilitaría una liberación más rápida del CIP de la observada para la RIF.

III.4.2 Actividad antibacteriana

III.4.2.1 Actividad bactericida de los antibióticos libres

Cómo se mencionó anteriormente los resultados de la actividad bactericida de ambos antibióticos contra *S. aureus*, como modelo de bacteria Gram-positiva, se tomaron de la tesis de la Dra. Cristina Yus Argon²²⁸. Estos valores se analizarán juntamente con la actividad bactericida contra *E. coli*, como modelo de bacteria Gram-negativa. Los valores de la MIC y MBC se presentan en la Tabla 10. En el caso de *S. aureus*, los valores tanto de la MIC como la MBC para el CIP se encuentran dentro del rango descrito en estudios previos²³⁴, al igual que ocurre con los de la RIF²³⁵. Previamente se ha descrito que CIP posee una fuerte actividad contra cepas de bacterias Gram-negativas²³⁶. En concordancia con esto, los valores de MIC y MBC encontrados contra *E. coli* son significativamente bajos. Aunque la membrana externa de las bacterias Gram-negativas crea una barrera para moléculas polares, el CIP, un antibiótico soluble en agua, tiene la capacidad de atravesarla. Este efecto se debe a que el CIP interfiere con enzimas esenciales para la replicación del ADN bacteriano. A pesar de la barrera inicial, su mecanismo de acción específico le permite superarla, beneficiando su eficacia contra bacterias como *E. coli*. Por otro lado, la RIF se utiliza principalmente para tratar infecciones causadas por patógenos Gram-positivos²³⁷, mostrando concentraciones más altas necesarias para inhibir el crecimiento o eliminar las bacterias Gram-negativas²³⁸. Nuevamente, debido a la naturaleza no polar de RIF, su penetración a través de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas esté ampliamente desfavorecida en comparación con las bacterias Gram-positivas.

Tabla 10. Valores de MIC y MBC de CIP y RIF libre (N=12)

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> S17	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
CIP	0.25	1.0	0.005	0.01
RIF	< 0.05	0.25	20	40

III.4.2.2 Sinergia de antibióticos

Como se mencionó anteriormente, las combinaciones de antibióticos para reducir las dosis administradas intentan prevenir o retrasar la aparición de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos. Debido a que la RIF provoca la rápida generación de resistencia, no debe usarse como monoterapia, por lo tanto, las combinaciones con CIP podrían proporcionar un tratamiento eficaz a dosis más bajas de las requeridas para la monoterapia²³⁹. Para evaluar la posible presencia de sinergismo entre ambos antibióticos, se calculó el FICI (Fig. 16A-B). El valor de FICI de ambos antibióticos contra *S. aureus* fue de 0.10 y contra *E. coli* de 0.14. Estos índices bajos (≤ 0.5) indican que la combinación se considera sinérgica²⁴⁰. Contra bacterias Gram-positivas, la MIC de RIF se pudo reducir de 0.05 a 0.001 $\mu\text{g/mL}$ (una reducción de 50 veces) en combinación con CIP, mientras que solo 0.02 $\mu\text{g/mL}$ de CIP en la combinación exhibió el mismo efecto que 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de CIP solo (una reducción de 12.5 veces). Contra *E. coli*, la concentración de RIF se pudo reducir de 20 a solo 2 $\mu\text{g/mL}$ cuando se combinó con 0.002 $\mu\text{g/mL}$ de CIP. De acuerdo con estos resultados, la concentración de ambos antibióticos necesarios para inhibir el crecimiento bacteriano Gram-positivo y Gram-negativo sería menor cuando se aplican simultáneamente que cuando se usan de forma independiente. Por lo tanto, la terapia de combinación propuesta en esta tesis reduciría las dosis necesarias para eliminar la microbiota polimicrobiana patógena.

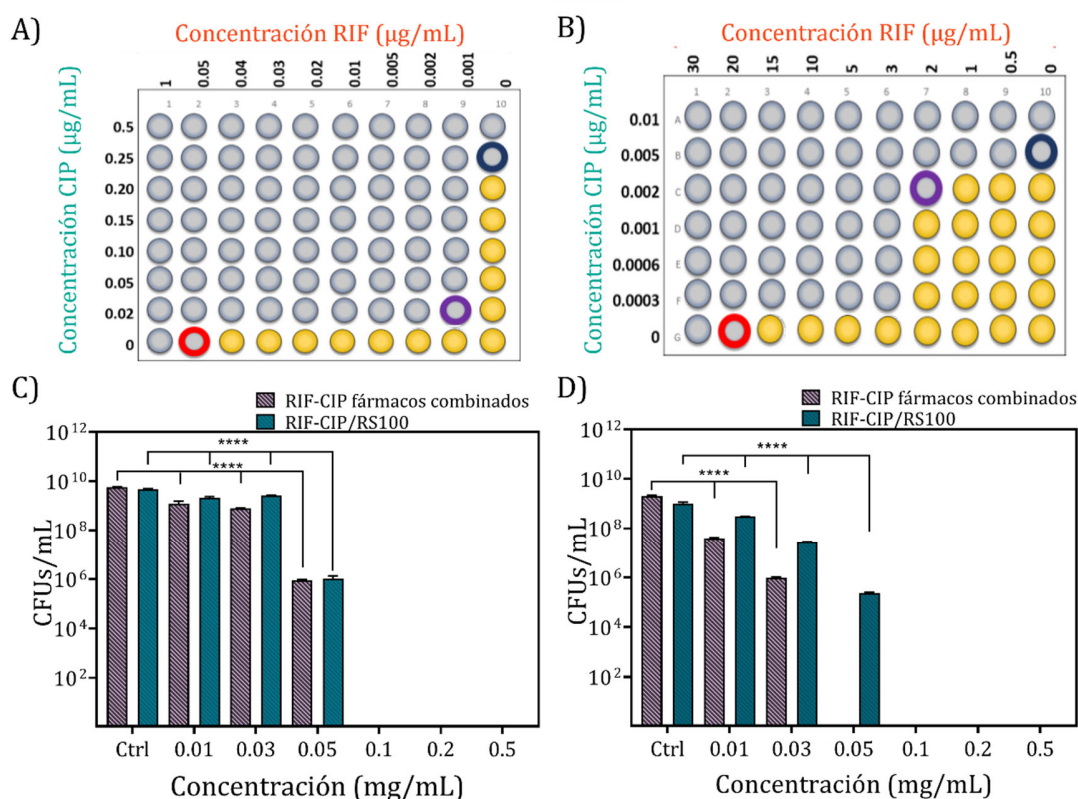


Fig. 16 Prueba de Concentración Inhibitoria Fraccional para A) *S. aureus* y B) *E. coli*; actividad bactericida de una mezcla de dosis equivalentes de los fármacos libres y el sistema RIF-CIP/RS100 contra C) *S. aureus* y D) *E. coli*. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$). El círculo azul representa la MIC de CIP, mientras que el círculo rojo representa la MIC de RIF y el círculo morado destaca el efecto sinérgico observado.

III.4.2.3 Actividad bactericida del sistema

Previamente, en la literatura, se han reportado apósitos cargados con diferentes medicamentos. Por ejemplo, se preparó un sistema compuesto por fibras cargadas con el antibiótico mupirocina y fibras cargadas con el anestésico lidocaína mediante un electrohilado doble²⁴¹. El anestésico lidocaína también se cargó con tetraciclina mediante impresión electrohidrodinámica coaxial²⁴². Sin embargo, solo un trabajo describió la síntesis de fibras cargadas con dos antibióticos, sulfato de gentamicina (GS) y CIP²⁴³. En ese estudio, las fibras cargadas con ambos fármacos mostraron una liberación completa de gentamicina en 6 días y una liberación sostenida de CIP durante

más de tres semanas, lo que resultó en una reducción significativa en el número de bacterias en el lecho de la herida en un modelo de quemadura profunda infectada con *P. aeruginosa*. La liberación rápida de GS y la liberación prolongada de CIP aceleraron el proceso de cicatrización de la herida al controlar la infección en heridas causadas por quemaduras profundas.

Se evaluó el efecto inhibitor y bactericida del sistema RIF-CIP/RS100 frente a las cepas de *S. aureus* y *E. coli*. La Fig. 16C-D muestra la actividad antimicrobiana en función de la concentración del apósito (peso total de las fibras en el volumen del medio donde se encuentra el inóculo bacteriano) y se compara con mezclas de dosis equivalentes de los antibióticos libres. La concentración de cada uno de los antibióticos en la mezcla fue igual a la concentración liberada por el sistema combinado RIF-CIP/RS100 en 24 h. Se necesitaron 0.05 mg/mL de apósito RIF-CIP/RS100 para inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. Según los estudios de liberación de antibióticos, este sistema liberaría 0.90 y 0.12 µg/mL de CIP y RIF, respectivamente, después de 24 h en contacto con el medio de cultivo. Para erradicar por completo ambas cepas bacterianas, fue necesario utilizar 0.1 mg/mL del sistema RIF-CIP/RS100, que, según el análisis cinético de liberación del fármaco, liberaría 1.9 y 0.25 µg/mL de CIP y RIF, respectivamente, después de 24 h. Aunque la concentración de CIP liberada por el sistema fue mucho mayor que la requerida de los antibióticos libres para erradicar *S. aureus* y *E. coli*, la concentración de RIF liberada necesaria para lograr una erradicación completa se redujo considerablemente contra la bacteria Gram-negativa, mientras que se mantuvo similar contra la bacteria Gram-positiva. Esta reducción de dosis necesaria para erradicar por completo las bacterias patógenas al combinar tanto RIF como CIP en el mismo apósito superaría a la aplicación de ambos antimicrobianos por separado como monoterapia, al tiempo que prevendría la selección evolutiva de cepas resistentes.

III.4.2.4 Evaluación de la actividad antibiofilm del sistema RIF-CIP/RS100

Como se mencionó anteriormente, después de una contaminación inicial en una herida, las poblaciones microbianas pueden colonizarla y muchas especies pueden asociarse formando biofilms. Se ha observado que la erradicación de bacterias en un biofilm (forma sésil) requiere dosis de antibióticos hasta 1000 veces superiores a las

necesarias para eliminar las bacterias en su forma planctónica²⁴⁴. Además, es importante destacar que las heridas crónicas suelen estar colonizadas por múltiples especies bacterianas, y los biofilms resultantes pueden contener tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, así como hongos²⁴⁵. Se probó la capacidad antibiofilm del sistema RIF-CIP/RS100 contra biofilms de *S. aureus* (Fig. 17A), mostrando su capacidad para inhibir la formación de estos. Se realizó una comparación entre el sistema RIF-CIP/RS100 y la mezcla de los antibióticos en su forma libre, utilizando las mismas concentraciones que son liberadas por el sistema en un período de 24 h. La combinación de los antibióticos sin encapsular no logró prevenir la formación de biofilms de *S. aureus* y *E. coli*, incluso cuando se utilizó una concentración equivalente a la cantidad de ambos antibióticos liberados por 4 mg del apósito en 1 mL del medio bacteriano. Estas concentraciones son más altas que las necesarias para eliminar bacterias planctónicas, resultados que se esperaban, ya que, como se dijo anteriormente, las cepas de *S. aureus* formando biofilms pueden ser hasta 1000 veces menos susceptibles a los antibióticos que sus contrapartes planctónicas²⁴⁶. Por otro lado, solo se necesitaron 1 mg/mL de fibras RIF-CIP/RS100 para evitar la formación de biofilms de *S. aureus* y 2 mg/mL del sistema fueron suficientes para erradicar los biofilms preformados (Fig. 17B). La interacción entre el polímero catiónico y el biofilm bacteriano podría ser responsable del rendimiento óptimo del sistema. Muchos de los componentes del biofilm, así como el envoltorio celular bacteriano, tienen una carga negativa en general, por lo que se podría establecer una fuerte interacción electrostática con los grupos de amonio cuaternario de la superficie polimérica de Eudragit®²⁴⁶. En estudios anteriores se demostró que se necesita un contacto directo entre los patógenos y las fibras poliméricas para ejercer una fuerte acción bactericida lo cual sería corroborado por estos resultados²⁴⁷.

En el caso de inhibición de biofilm de *E. coli*, el comportamiento de los fármacos libres y el apósito RIF-CIP/RS100 fue similar a pesar del diferente método experimental utilizado (Fig. 17C). Este resultado indicaría que el daño celular de *E. coli* puede afectar negativamente la adhesión celular, que representa el primer paso en la formación de biofilms²⁴⁸. Como se ha mencionado anteriormente, *E. Coli* siendo motil forma el biofilm

en la interfase aire-líquido, por lo que en este caso no se forma adherido fuertemente a las superficies. Por otro lado, se necesitó una concentración de antibiótico superior liberado por el sistema en comparación con las dosis equivalentes de los fármacos libres para erradicar los biofilms preformados de *E. coli* (Fig. 17D). Este resultado podría estar asociado a uno de los componentes extracelulares del polímero del biofilm, la poli β -1,6-N-acetil-D-glucosamina, que dificultaría la adhesión a la superficie del sistema retrasando la acción de los antibióticos²⁴⁹, además de la propia naturaleza de este tipo de biofilms que flotan en dicha interfase.

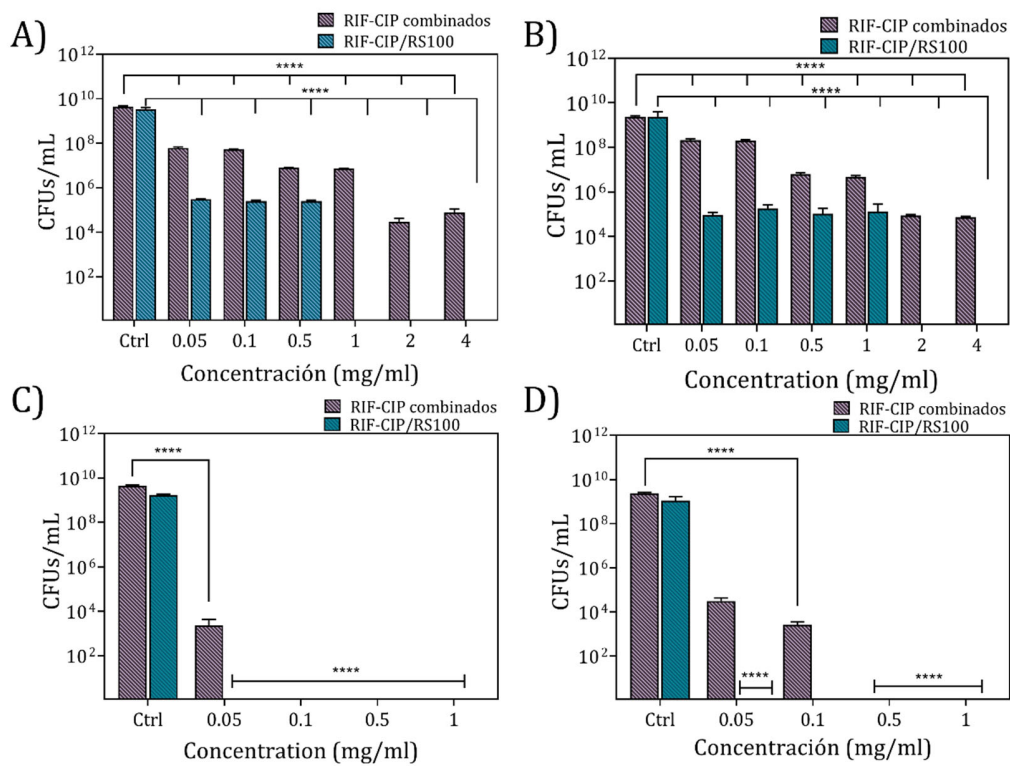


Fig. 17 Actividad antibiofilm de la combinación de RIF y CIP libre, y de RIF-CIP/RS100 contra *S. aureus*: A) inhibición de la formación del biofilm, B) erradicación del biofilm preformado maduro y contra *E. coli* S17: C) inhibición de la actividad del biofilm, D) erradicación del biofilm preformado maduro. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

III.4.2.5 Citotoxicidad celular

Un apósito para heridas no debería tener un impacto negativo en las células regenerativas que participan en el proceso de curación de heridas. De acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009²⁵⁰, se considera que un compuesto es citocompatible cuando la viabilidad celular se mantiene por encima del 70%. Para evaluar la citocompatibilidad del apósito desarrollado, se seleccionaron queratinocitos HaCat, fibroblastos dérmicos humanos y macrófagos J774. La Fig. 18 muestra el porcentaje de células viables después de estar expuestas a una mezcla de los fármacos libres (Fig. 18A), al apósito RS100 sin antibiótico (Fig. 18B) y al apósito RIF-CIP/RS100 (Fig. 18C) después de 24 h de contacto.

En todos los casos, la viabilidad celular de las tres líneas celulares fue igual o superior al 70% en las concentraciones probadas. La concentración máxima de peso probada fue de 2 mg por cada mL del medio de cultivo, el doble de la concentración necesaria para erradicar por completo los biofilms preformados de *S. aureus*. Por otro lado, es 40 veces mayor que la concentración necesaria para evitar la formación de biofilms de *E. coli* y 4 veces mayor que la concentración necesaria para erradicar los biofilms de *E. coli* ya formados. Por lo tanto, el sistema final RIF-CIP/RS100, sintetizado en esta tesis se considera no citotóxico para las líneas celulares estudiadas.

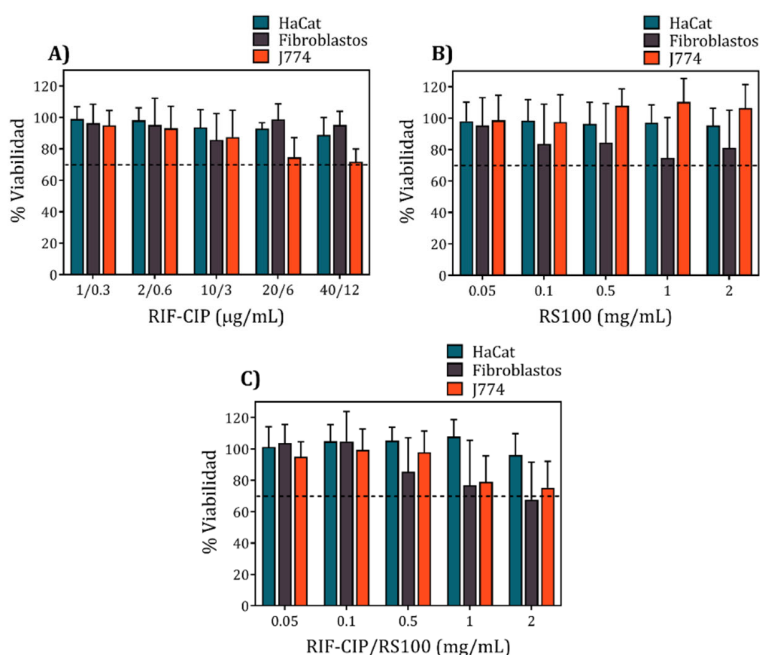


Fig. 18 Viabilidad de las células de queratinocitos HaCat, fibroblastos dérmicos humanos y macrófagos J774 después del tratamiento durante 24 h con A) RIF/CIP libres combinados RIF-CIP, B) sistema RS100 y C) sistema RIF-CIP/RS100.

III.5 Conclusiones

En este capítulo, se desarrollaron apósitos consistentes en fibras de Eudragit® RS100 electrohiladas conteniendo RIF decoradas con micropartículas de Eudragit® RS100 electroesprayadas cargadas con CIP, con el objetivo de explorar su potencial aplicación como terapia de segunda línea en el tratamiento de heridas infectadas para aquellos casos en los que el primer tratamiento fracase. Se ha observado una sinergia entre ambos antibióticos. Además, el sistema desarrollado presenta una liberación inicial rápida, seguida de una liberación sostenida a lo largo del tiempo, gracias a la presencia de los antibióticos en las fibras o en las micropartículas. Los apósitos cargados con antibióticos han demostrado ser eficaces en la erradicación de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas en sus formas planctónicas y sésiles.

Se ha observado que la naturaleza catiónica del apósito polimérico puede desempeñar un papel crucial en su acción antimicrobiana que es superior en comparación con los mismos antibióticos en forma libre, lo cual respalda la importancia

del contacto directo para ejercer una fuerte actividad antimicrobiana. Además, este apósito ha demostrado ser biocompatible, ya que en la misma concentración elimina las bacterias sin causar daño a diferentes líneas celulares eucariotas.

Es importante destacar que, si bien la terapia tópica con antibióticos no se recomienda generalmente en heridas abiertas, el apósito RIF-CIP/RS100 descrito en este estudio podría considerarse como una opción de tratamiento de segunda línea específicamente para heridas infectadas que no responden al tratamiento inicial convencional. Sin embargo, es fundamental realizar un seguimiento cuidadoso a largo plazo de la eficacia de eliminación de estas combinaciones de antibióticos para evitar posibles interacciones negativas.

Capítulo IV

NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ANTICUERPOS PARA LA LIBERACIÓN SELECTIVA DE ANTIBIÓTICOS EN MODELOS POLIMICROBIANOS Y EN INFECCIONES INTRACELULARES

IV.1 Introducción

A pesar de la alta eficacia de los antibióticos actualmente disponibles, las bacterias han desarrollado resistencia a la presión selectiva de los mismos a través de diversos mecanismos, los cuales fueron abordados previamente en el capítulo I. Como resultado, la acción terapéutica de los antibióticos comúnmente utilizados se ha visto reducida progresivamente, mientras que las bacterias multirresistentes y panresistentes se propagan rápidamente a nivel mundial²⁵¹.

Para tratar de reducir los efectos de la resistencia bacteriana, los nanomateriales han desempeñado un papel destacado en los avances de la terapia antimicrobiana, ya que son capaces de aumentar la eficacia y biodisponibilidad de los antibióticos existentes a través de la vectorización y de su administración localizada. Además, algunos nanomateriales, como las nanopartículas metálicas, tienen mecanismos de acción antimicrobianos intrínsecos²⁵². La terapia antimicrobiana basada en nanomateriales ofrece múltiples beneficios al combinar el uso de estos como portadores de agentes antimicrobianos con su propia actividad antimicrobiana intrínseca. Estos beneficios incluyen mecanismos de acción múltiples que reducen las probabilidades de desarrollo de resistencias. Las nanopartículas, como portadoras de agentes antimicrobianos, pueden mejorar la eficacia terapéutica al liberar la carga cerca de las bacterias patógenas mediante grupos direccionadores que presentan tropismo. La mayor acción antimicrobiana de las nanopartículas poliméricas funcionalizadas en superficie con anticuerpos y cargadas con fármacos, en comparación con dosis equivalentes del fármaco libre correspondiente, se atribuye a la afinidad de las biomoléculas dirigidas hacia los receptores sobreexpresados en la superficie de las células bacterianas²⁵³. La selectividad hacia las células bacterianas se logra mediante el uso de diferentes biomoléculas direccionadoras, tanto naturales como sintéticas, que incluyen péptidos, aptámeros, carbohidratos, membranas celulares, anticuerpos monoclonales, policlonales y recombinantes²⁵⁴. Dicha selectividad se ha utilizado en la identificación y diagnóstico de cepas bacterianas patógenas específicas, así como para aumentar la eficacia terapéutica de los tratamientos antimicrobianos.

Como se mencionó anteriormente, *S. aureus* es una de las bacterias nosocomiales comensales comunes que puede volverse patógena. Las infecciones asociadas a implantes, la endocarditis, las infecciones de la piel y de tejidos blandos, la neumonía, la osteomielitis e incluso la bacteriemia son manifestaciones clínicas habituales de su virulencia²⁵⁵.

Se han desarrollado nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos específicos dirigidos a los epítopos de *S. aureus* con el objetivo de detectar su presencia para el desarrollo de diversos tipos de sensores. Por ejemplo, se ha reportado sobre la detección inmunomagnética mediante dispersión Raman amplificada por la superficie (de su acrónimo en inglés SERS, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*) utilizando nanopartículas magnéticas recubiertas de oro en suspensiones bacterianas mediante el uso de anticuerpos monoclonales como agentes de reconocimiento selectivo²⁵⁶.

Las nanopartículas inmunomagnéticas también se han utilizado para capturar y concentrar *S. aureus* MRSA a partir de hisopos nasales humanos utilizando un dispositivo microfluídico para, posteriormente, identificar la cepa utilizando un anticuerpo funcionalizado con enzimas específicas para su detección electroquímica²⁵⁷. Se ha investigado ampliamente la detección y el tratamiento antimicrobiano simultáneos mediante el uso de nanopartículas teranósticas. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Huo *et al.*²⁵⁸ en el que se funcionalizaron nanopartículas de oro/plata con anticuerpos monoclonales anti-MRSA y se utilizaron como agentes de contraste para tomografía computarizada (CT) en modelos de ratones con neumonía causada por MRSA asociada a respiradores mecánicos, demostrando una eficiente inhibición de la proliferación bacteriana *in vivo*. También se han utilizado nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-proteína A para la erradicación selectiva de *S. aureus*, mediante hipertermia magnética en el tratamiento de heridas infectadas que no cicatrizan²⁵⁹, así como en terapia fototérmica, solas o en combinación con antibióticos²⁶⁰.

Otra estrategia utilizada para aumentar la selectividad frente a bacterias cuando se cultivan junto a células eucariotas, es el uso de nanopartículas metálicas funcionalizadas con anticuerpos anti-MRSA y conjugadas con fotosensibilizadores

aplicadas en terapia fotodinámica²⁶¹. Además de las nanopartículas metálicas, se han utilizado sistemas inorgánicos como las nanopartículas de silicio poroso cargadas con vancomicina y funcionalizadas con un péptido cíclico selectivo de 9-aminoácidos (CARGGLKSC), que han demostrado una mejor biodisponibilidad y selectividad frente a *S. aureus* en un estudio *in vivo*²⁶². También se han utilizado estrategias basadas en nanopartículas poliméricas para administrar antibióticos de manera selectiva contra *S. aureus*. Siguiendo este enfoque, se cargaron nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y polietilenglicol (PEG) con RIF y se funcionalizaron en la superficie con anticuerpos anti-proteína A, los cuales se utilizaron como ligandos de direccionamiento y reconocimiento. Esta estrategia demostró una mayor eficacia terapéutica en un modelo murino de infección, inducido mediante la implantación de injertos vasculares infectados conteniendo biofilm subcutáneos²⁶³. En comparación con las nanopartículas metálicas o inorgánicas, las nanopartículas poliméricas presentan una liberación controlada y sostenida del antimicrobiano encapsulado. Además, muestran propiedades físicas y químicas ajustables que permiten degradación tanto endógena (por ejemplo, enzimática, hidrolítica, sensible al pH o glutatión) como exógena (activada por luz, magnética, sensible a ultrasonidos, entre otras). Estas nanopartículas ofrecen una flexibilidad de diseño basada en su fácil funcionalización superficial, la disponibilidad de diversos polímeros naturales y sintéticos, y una variedad de métodos de síntesis macromoleculares.

Sin embargo, la escasez de estudios sobre nanopartículas poliméricas resalta la necesidad de una investigación más amplia en esta área, lo que representa una oportunidad para una exploración extensa de aplicaciones dirigidas. Con el direccionamiento y la liberación de antibióticos localizada se consigue hacer un uso más racional de los antibióticos y reducir la potencial aparición de resistencias.

En resumen, se ha logrado con éxito el tratamiento de infecciones bacterianas aprovechando la selectividad biológica de los anticuerpos por sí mismos (por ejemplo, Panobacumab, Tefibazumab, etc.), los conjugados anticuerpo-antibiótico²⁶⁴ y las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos cargadas de antibióticos^{262,263}, que se dirigen a epítopos específicos en las bacterias. Sin embargo, algunas bacterias

patógenas tienen la capacidad de llevar a cabo su ciclo de vida intracelularmente en células fagocíticas. En estos casos, el patógeno permanece en el sistema endosómico-lisosómico, lo que dificulta el reconocimiento por parte de los anticuerpos. *S. aureus*, por ejemplo, es un patógeno facultativo comensal que realiza parte de su ciclo de vida intracelularmente²⁶⁵. Además de infectar células no fagocíticas, la persistencia intracelular de *S. aureus* se atribuye a pequeñas colonias que se han adaptado fenotípicamente llamadas *small colony variants*²⁶⁶. Se ha propuesto que estas colonias bacterianas intracelulares persistentes (*persisters*) actúan como reservorios para episodios recurrentes de infección y contribuyen al fracaso del tratamiento²⁶⁷. Como ya se mencionó anteriormente, las infecciones son generalmente de naturaleza polimicrobiana^{268,269}. Por lo tanto, al abordar estas infecciones, los tratamientos antibióticos o antisépticos deben tener en cuenta las interacciones de la comunidad microbiana, que involucra tanto a las bacterias patógenas como a las comensales, así como a todos aquellos patógenos que viven parte de su ciclo de vida intracelularmente.

IV.2 Objetivo

El objetivo del trabajo reportado en este capítulo es el de evaluar la eficacia y selectividad de nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos que transportan antibióticos específicamente dirigidos hacia *S. aureus* en diferentes formas bacterianas: planctónica, sésil e intracelular. Se utilizará un modelo de cocultivo de *E. coli* y *S. aureus* para demostrar la selectividad del anticuerpo, así como un modelo de macrófagos infectados para mostrar la capacidad de dirigirse a las células bacterianas intracelulares. Aunque anteriormente se ha mencionado que el uso de RIF no se recomienda como monoterapia en el tratamiento de bacterias formadoras de biofilm debido a la alta probabilidad de desarrollar resistencias, en este capítulo se utilizará como antibiótico modelo para analizar exclusivamente la eficacia de las nanopartículas dirigidas en comparación con las no funcionalizadas. Se han seleccionado nanopartículas de PLGA debido a sus propiedades adecuadas para la aplicación, ya mencionadas en los capítulos anteriores, que incluyen biodegradabilidad fisiológica, capacidad de internalización celular y liberación controlada del fármaco. Al funcionalizarlas con un anticuerpo selectivo se consigue selectividad local, evitándose

efectos secundarios y una consecuente reducción de la probabilidad de desarrollar resistencias. Estas características hacen de las nanopartículas de PLGA funcionalizadas con anticuerpos una opción prometedora para el transporte eficiente y específico de los antibióticos hacia las bacterias objetivo.

IV.3 Síntesis de partículas y su caracterización

IV.3.1 Síntesis de copolímero, nanopartículas, funcionalización y caracterización

Para obtener las nanopartículas poliméricas, primero se sintetizó un copolímero de PLGA en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS). Luego, se disolvió nuevamente e incubó con NH₂-PEG-biotina durante una noche para formar el compuesto etiquetado como PLGA-PEG-biotina. Ambos compuestos fueron analizados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (H-NMR) para su caracterización. Una vez obtenido el polímero, se procedió a la síntesis de las nanopartículas cargadas con RIF y sin carga a través del método de nanoprecipitación. Posteriormente, se llevó a cabo la funcionalización con el anticuerpo biotinilado anti-*Staphylococcus aureus* mediante el sistema de Avidina-Biotina. La descripción esquemática del sistema conjugado formado mediante la funcionalización superficial de las nanopartículas de PLGA-PEG-biotina con el anticuerpo anti-*S. aureus* biotinilado se encuentra en la Fig. 19A y el proceso de síntesis y las condiciones utilizadas se detallan en el Anexo I para su referencia.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se determinó su tamaño mediante espectroscopía de dispersión de luz (DLS) y se midió su potencial zeta mediante la técnica de dispersión de luz electroforética. Además, se analizó su morfología a través de microscopía SEM y se evaluaron la carga de fármaco y los perfiles de liberación mediante espectrofotometría UV-Vis. Para estudiar las interacciones químicas entre los componentes de las nanopartículas, se empleó espectroscopía infrarroja por FTIR. También se realizó un ensayo de proteínas BCA para determinar la presencia de la avidina y del anticuerpo en las nanopartículas. Todos los equipos, procedimientos y métodos de preparación de muestras para estas caracterizaciones se encuentran descritos en detalle en el Anexo I.

IV.3.2 Caracterización biológica

Se evaluó la actividad antibacteriana de la RIF libre frente a *S. aureus* ATCC 25923 como modelo de bacteria Gram-positiva y contra la cepa *E. coli* S17 como modelo de bacteria Gram-negativa. También se investigó la actividad antibacteriana de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en concentraciones que oscilaban entre 0.1-2 µg/mL. Además, se realizó un co-cultivo de ambas bacterias para evaluar la actividad antimicrobiana de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en concentraciones de 0.2 a 2 µg/mL durante 24 h. Los procedimientos experimentales utilizados se detallan en el Anexo I.

Se analizó el efecto de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en concentraciones de 0.5 a 2 µg/mL para la inhibición y disrupción del biofilm. Esta evaluación incluyó la incubación y conteo de células bacterianas, así como la visualización de dichos efectos mediante microscopía SEM y confocal. Además, se llevó a cabo un estudio de citotoxicidad de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en cultivos de macrófagos J774, utilizando concentraciones de nanopartículas entre 0.2 y 2 µg/mL.

Se investigó la eficacia de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo (0.2 µg/mL) en infecciones intracelulares, utilizando un modelo de infección con macrófagos J774 infectados con *S. aureus*, *E. coli* y en un cocultivo de ambas bacterias. También se evaluó la viabilidad de los macrófagos después de la infección mediante microscopía confocal, utilizando el kit de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead para células de mamíferos. Todos los equipos, procedimientos y detalles necesarios para estas investigaciones se encuentran descritos en el Anexo I.

IV.4 Resultados y discusión

IV.4.1 Caracterización de las nanopartículas

Los resultados del análisis de H-NMR mostraron la correcta incorporación de NHS al polímero de PLGA terminado en ácido (Fig. 19B) y su posterior conjugación a NH₂-PEG-biotina, lo que resulta en la formación del copolímero PLGA-PEG-biotina (Fig. 19C). Las señales características de PLGA están presentes en ambos espectros de H-NMR. La señal a 1.5 ppm está relacionada con el grupo CH₃ del ácido láctico, y las vibraciones a 4.8 y 5.2 ppm se atribuyen al CH del ácido láctico y al CH₂ del ácido glicólico, respectivamente, de acuerdo con la literatura previa²⁷⁰. El pico a 2.8 ppm en la Fig. 19B confirma la activación de los grupos de ácido carboxílico del PLGA obteniéndose un derivado de NHS-éster utilizado en la conjugación de la amina-PEG-biotina a través de un enlace amida covalente. Los picos a 1.2 y 3.5 ppm se detectan debido al éter dietílico residual utilizado en la síntesis. En la Fig. 19C, se puede observar una nueva señal a 3.6 ppm, atribuida a la cadena CH₂ de la cadena de PEG que confirma la formación del copolímero PLGA-PEG. Los picos de biotina están en su mayoría ocultos por las señales de la cadena polimérica, pero se pueden detectar dos picos con una señal débil a 4.3 ppm, confirmando la presencia de biotina. La cantidad molar de PEG en el sistema PLGA-PEG se estimó a partir del área bajo los picos y el valor calculado fue de aproximadamente 14 mol.%. Se utilizó avidina como conector para unir el anticuerpo anti-*S. aureus* biotinilado comercialmente disponible a las NPs biotiniladas sintetizadas para aprovechar la fuerte interacción no covalente entre avidina y biotina.

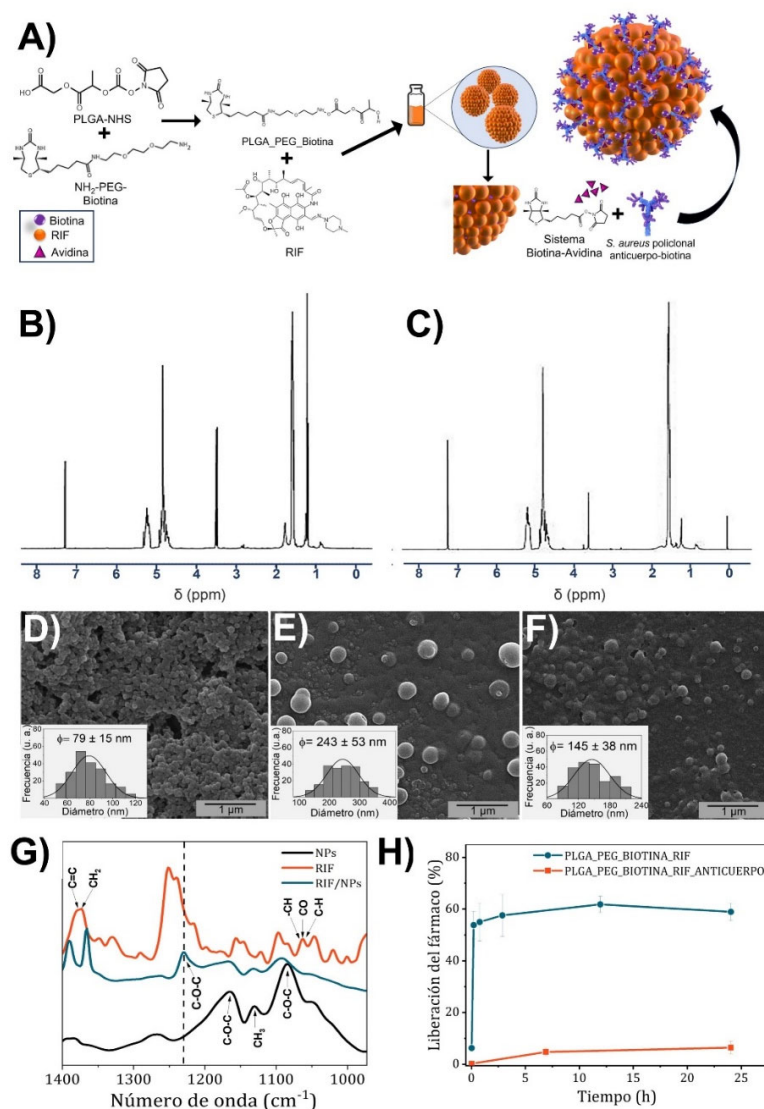


Fig. 19 A) Descripción esquemática del sistema conjugado formado mediante la funcionalización superficial de las nanopartículas de PLGA-PEG-biotina con el anticuerpo anti-*S. aureus* biotinilado. Caracterización de las nanopartículas. Espectros de H-NMR de B) la incorporación de NHS al polímero de PLGA terminado en ácido y de C) la conjugación del polímero de PLGA modificado a NH_2 -PEG-biotina. Micrografía SEM e histograma de distribución de tamaños de (N=100) D) las NPs de PLGA-PEG-biotina, E) las NPs de PLGA-PEG-RIF. Y F) de las NPs de PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. G) Espectros de FTIR de RIF, NPs no cargadas y NPs cargadas con RIF. H) Perfil de liberación de RIF de NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo ($n = 3$).

La Tabla 11 recopila la caracterización fisicoquímica de las NPs cargadas con RIF y las NPs vacías en dispersión acuosa a un pH de 6.5. Se observa, que el tamaño hidrodinámico promedio aumenta en las NPs no cargadas después de la conjugación avidina-biotina, debido a la aglomeración incipiente causada por el conector (avidina). Sin embargo, los resultados del potencial zeta indican que la suspensión coloidal se mantiene estable con valores entre -22 y -50 mV a pH neutro. La interacción supramolecular entre la avidina cargada positivamente y las NPs cargadas negativamente y funcionalizadas con biotina podría ser responsable de la aglomeración observada, como se ha descrito previamente en la literatura²⁷¹. Sin embargo, esta aglomeración es reversible mediante sonicación o agitación. La avidina es un homotetrámero con cuatro subunidades idénticas que muestran una alta afinidad con hasta cuatro moléculas de biotina, lo que podría explicar el aumento en los tamaños de partícula observado. Este aumento de tamaño no se observa en las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, posiblemente debido a la competencia del anticuerpo biotinilado presente en la superficie de las NPs por los sitios de unión de la avidina, lo que reduce la aglomeración. Los resultados del potencial zeta mostrados en la Tabla 11 también demuestran la efectiva funcionalización de las NPs, evidenciada por una disminución en el valor del potencial zeta después de la conjugación con avidina, lo que neutraliza parcialmente la carga superficial negativa de las nanopartículas. A través del ensayo BCA, se determinó que la eficiencia de funcionalización con avidina durante el proceso de síntesis fue del 75 ± 5 % en peso.

Una vez completada la conjugación, las partículas se cargaron con el anticuerpo policlonal, logrando una eficiencia de funcionalización del 64 ± 2 % en peso. Las Fig. 19D-F muestran imágenes SEM representativas de las NPs de PLGA-PEG-biotina y las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, junto con la distribución de tamaños de cada tipo de partícula. Estos tamaños coinciden con las medidas realizadas por DLS, teniendo en cuenta que el diámetro de las partículas puede ser ligeramente mayor debido a la aglomeración causada por el proceso de secado durante la preparación de las muestras para su análisis mediante SEM. Nuevamente, se observaron tamaños mayores en las NPs después de la conjugación avidina-biotina (Fig. 19G) debido a la

aglomeración inducida por la avidina, que, como ya se mencionó, puede unirse con hasta 4 moléculas de biotina. Sin embargo, esta aglomeración se redujo después de la conjugación con el anticuerpo mediante una agitación intensa durante el proceso de unión, lo que resultó en NPs más pequeñas y monodispersas (Fig. 19H). La RIF tiene dos pKa debido a su naturaleza de zwitterión (con pKa 1.7 relacionado con el grupo 4-hidroxi y pKa 7.9 relacionado con el nitrógeno de la piperazina en posición 3), lo que implica que a pH neutro el nitrógeno de la piperazina proporcionará a la molécula una carga positiva que interactuaría con el PLGA cargado negativamente.

Tabla 11. Caracterización de las nanopartículas: tamaño, potencial zeta (a pH 6.5) e índice de polidispersidad (PDI) determinados por DLS. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de cuatro medidas de tamaño y potencial zeta

Tipo de partícula	Tamaño medio (nm)	Potencial ζ (mV)	PDI
PLGA-PEG-Biotina	102 \pm 2	-51 \pm 2	0.22 \pm 0.03
PLGA-PEG-Biotina-Avidina	224 \pm 24	-33 \pm 1	0.21 \pm 0.07
PLGA-PEG-Biotina-Avidina-Anticuerpo	203 \pm 19	-30 \pm 1	0.20 \pm 0.07
PLGA-PEG-Biotina-RIF	192 \pm 13	-41 \pm 2	0.10 \pm 0.03
PLGA-PEG-Biotina-Avidina-RIF	218 \pm 19	-24 \pm 2	0.22 \pm 0.10
PLGA-PEG-Biotina-Avidina-RIF- Anticuerpo	190 \pm 17	-22 \pm 1	0.21 \pm 0.05

La Fig. 19F muestra los espectros de FTIR del antibiótico libre y de las partículas cargadas y no cargadas. Se observa una clara señal a 1230 cm^{-1} en las nanopartículas cargadas con RIF que no está presente en las no cargadas, lo que confirma la presencia del antibiótico en las partículas. Este pico se atribuye a las bandas de estiramiento asimétrico de los grupos C-O-C en el antibiótico²⁷². El desplazamiento observado en el pico podría ser resultado de la interacción química entre el antibiótico y las nanopartículas, la cual sería responsable de una liberación sostenida en el tiempo.

También se observaron las bandas de vibración características del PLGA en 1090-1170 cm^{-1} , atribuidas al estiramiento C-O-C, y en 1130 cm^{-1} , atribuidas a la

vibración de balanceo del CH_3 ²⁷³. También se detectaron las bandas de vibración características del RIF en 1365 cm^{-1} , relacionadas con las vibraciones CH_2 y $\text{C}=\text{C}$, en 1060 cm^{-1} , relacionadas con los enlaces químicos $-\text{CH}$, CO y $\text{C}-\text{H}$, y en 987 cm^{-1} ($\equiv\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$) en acuerdo con la literatura previa²⁷⁴. A pesar de esta interacción, la actividad de RIF se mantuvo después de la encapsulación, como se corroboró en estudios posteriores de eficacia antimicrobiana.

La carga de RIF en las NPs PLGA-PEG-RIF sin anticuerpo fue del 2.6 %, mientras que las NPs funcionalizadas con el anticuerpo mostraron un DL de RIF del 0.9 %. La carga de fármaco en derivados de PLGA puede verse afectada por varios factores, como la masa molar, la arquitectura de la cadena y la naturaleza de los grupos terminales. La capacidad de carga reducida de las NPs PLGA-PEG-RIF podría atribuirse al hecho de que el sistema PLGA-PEG tiene una masa molar alta, lo que resulta en interacciones limitadas entre los grupos carboxílicos no enlazados restantes de PLGA después del acoplamiento con el PEG y los grupos amino de RIF. Esto limitaría la captura de cantidades significativas del antibiótico^{275,276}.

En el caso de las NPs funcionalizadas, otra explicación posible es la pérdida de RIF durante el proceso de funcionalización con el anticuerpo y los lavados subsiguientes. Es bien sabido que una fracción de los fármacos atrapados en las matrices de PLGA permanece en la capa más externa de las NPs y produce una liberación inicial rápida. Posteriormente, la liberación del fármaco atrapado restante se regula mediante la erosión gradual de la matriz y la difusión del fármaco, lo que confiere al sistema la capacidad de una liberación sostenida. La cinética de liberación de RIF (Fig. 19G) mostró una fase inicial de liberación rápida antes de la funcionalización con el anticuerpo, posiblemente atribuida a la liberación de RIF desde la capa más externa de las NPs. Tras la funcionalización de la superficie, se observó una liberación lineal, lo cual sugiere que, durante la funcionalización con el anticuerpo, se eliminó todo el antibiótico presente en la superficie externa de las NPs y la cantidad de RIF medida se atribuye a la difusión del fármaco desde el interior de las NPs después de la hidrólisis y erosión de la matriz de encapsulación. A pesar del DL reducido, la elevada eficacia de la RIF es

suficiente para ejercer una alta acción antimicrobiana, incluso a concentraciones muy bajas, como se demostrará las secciones siguientes.

IV.4.2 Actividad bactericida

Se evaluaron los efectos bactericidas de las nanopartículas sintetizadas en cultivos planctónicos de *E. coli*, *S. aureus* y en un cocultivo de ambas cepas bacterianas. Además, se realizaron pruebas en modelos de biofilm de ambas bacterias cultivadas de forma individual y en un biofilm mixto. La Fig. 20 muestra la actividad antimicrobiana y los resultados de susceptibilidad *in vitro* de dosis equivalentes de RIF libre y encapsulado frente a ambos tipos de modelos bacterianos y en cocultivo.

La RIF libre (Fig. 20A y 20B) mostró una acción antimicrobiana superior contra las bacterias Gram-positivas, lo cual concuerda con la literatura previa donde generalmente se establece que la RIF es bacteriostático contra *E. coli* y bactericida contra *S. aureus*²⁷⁷. Los valores de MIC y MBC contra *S. aureus* fueron de 0.05 y 0.125 µg/mL, respectivamente, en acuerdo con nuestros resultados previos²³⁵. Por otro lado, se requirieron concentraciones de 6 y 40 µg/mL para lograr la inhibición y la acción bactericida contra *E. coli* (Fig. 20B). La superioridad en la acción antimicrobiana de la RIF contra bacterias Gram-positivas es consistente con otros informes previos^{278,279} y se atribuye a su reducida capacidad de penetración a través de la membrana lipopolisacárida externa de las bacterias Gram-negativas como se ha mencionado anteriormente.

Considerando las relaciones MIC/MBC para la RIF contra ambas especies bacterianas, podemos definir su acción como bacteriostática (es decir, MBC/MIC > 4). El efecto en bacterias Gram-positivas se muestra en la Fig. 20C, donde se observa una diferencia en la eficacia de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. Las inmunonanopartículas demostraron una acción antimicrobiana mejorada con dosis equivalentes del antibiótico cargado, lo que demuestra la importancia del agente de direccionamiento. A una concentración de 0.2 µg/mL, se logró la erradicación bacteriana completa con las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, mientras que a la misma concentración sólo se observó una reducción de 5 logaritmos para las NPs PLGA-PEG-

RIF sin anticuerpo. Como se mencionó anteriormente, la RIF inhibe la ARN polimerasa dependiente de ADN, la enzima citoplasmática responsable de la transcripción del ADN.

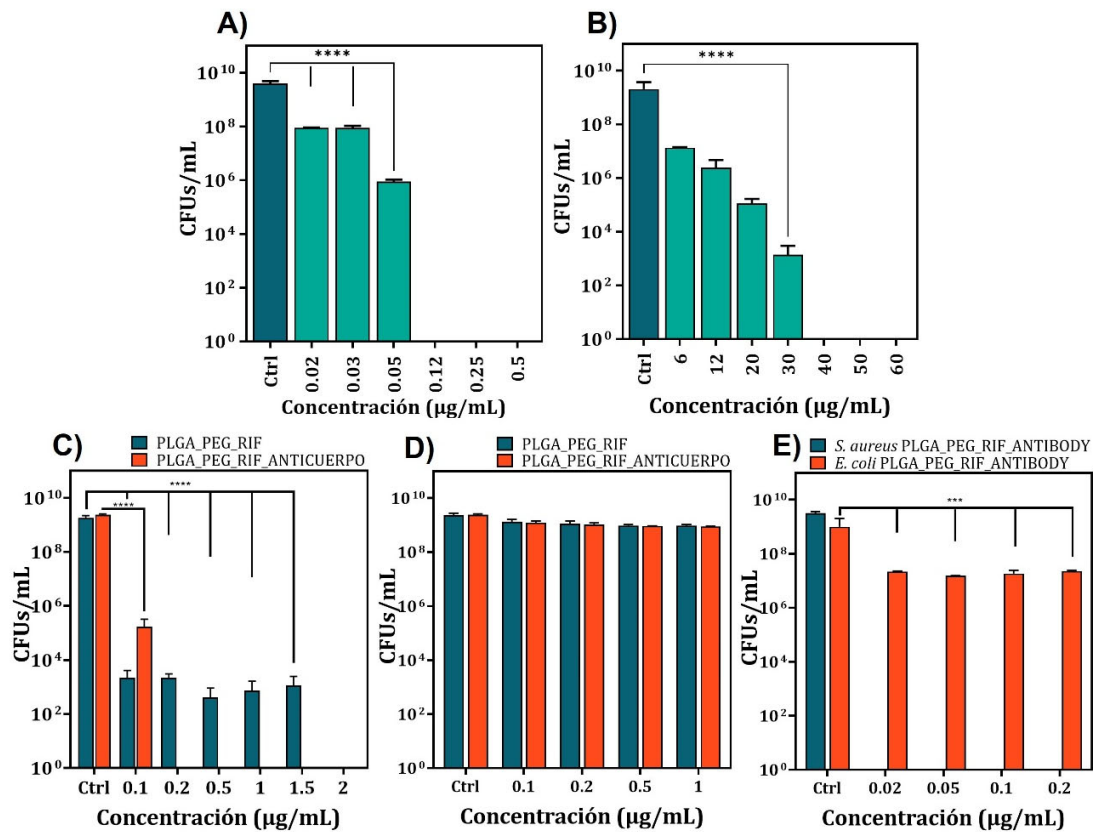


Fig. 20 Actividad bactericida de la RIF libre y de las NPs cargadas con RIF en cultivos bacterianos planctónicos: Efecto de la RIF libre en el crecimiento de A) *S. aureus* y B) *E. coli*. Efecto de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en el crecimiento de C) *S. aureus*, D) *E. coli* y E) el cocultivo de ambas cepas. El crecimiento bacteriano se expresa en CFU/mL. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes en triplicado ($n = 12$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

La mayor eficacia de las inmunonanopartículas en comparación con las no funcionalizadas puede atribuirse a una mejor internalización y captación bacteriana de la RIF cuando las NPs están dirigidas con el anticuerpo policlonal anti-*S. aureus*, que se une a antígenos estructurales en la superficie de la bacteria. La selectividad también se

confirmó en un modelo de cocultivo de ambas bacterias (Fig. 20E). En las dosis probadas, no se observó reducción antimicrobiana contra *E. coli* (Fig. 20D), lo cual es consistente con resultados previos. Sin embargo, en el modelo de cocultivo, se demostró claramente la selectividad contra *S. aureus* y se observó un incremento de la acción antimicrobiana, en comparación con el efecto en monocultivo. Esto se debe al efecto aditivo de la competencia bacteriana interespecies por el espacio y los nutrientes, y la inhibición inherente causada por el propio antibiótico. Algunos autores han atribuido la principal responsabilidad de esta ventaja competitiva de las bacterias Gram-negativas sobre las bacterias Gram-positivas a la liberación de polisacáridos antiadhesivos, en este caso por parte de *E. coli*²⁸⁰.

La Fig. 21 presenta la comparación de los efectos de las inmunonanopartículas cargadas con RIF en comparación con las no funcionalizadas en la inhibición de la formación de biofilm (Fig. 21A-C) y contra los biofilms maduros ya formados (Fig. 21D-F). En la prevención de la formación de biofilm de *S. aureus* (Fig. 21A), se observó una inhibición superior del crecimiento bacteriano (hasta 2 logaritmos) con las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en comparación con las no funcionalizadas. Sin embargo, ambos tipos de NPs mostraron resultados similares contra los biofilms ya formados (Fig. 21D). Una vez más, las nanopartículas funcionalizadas demuestran su capacidad para acercar el antibiótico de manera más efectiva a la superficie bacteriana en comparación con las no funcionalizadas, lo que contribuye a la inhibición de la formación de biofilm. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas donde se alcanzaron concentraciones similares de RIF para lograr la erradicación mínima del biofilm de *S. aureus*²⁸¹. Sin embargo, una vez que el biofilm se forma, los componentes extracelulares como polisacáridos, proteínas y ADN protegen a las bacterias y dificultan los tratamientos antibióticos.

Es probable que la capacidad de reconocimiento del anticuerpo policlonal se vea altamente afectada al estar impedida su difusión y migración a través de biofilms maduros ya formados. Estos efectos mínimos en la interrupción de los biofilms concuerdan con la literatura, donde las dosis necesarias para ejercer acción antimicrobiana aumentan significativamente cuando las bacterias se encuentran en

forma sétil en comparación con su estado planctónico. Por ejemplo, Laverty *et al.*²⁸² demostraron que se necesitaba una dosis de 0.24 µg/mL para inhibir el crecimiento bacteriano en su estado planctónico contra *S. aureus* ATCC 29213, mientras que la concentración mínima de erradicación del biofilm (MBEC) se alcanzó a 15.63 µg/mL, una concentración mucho más alta que la más alta probada en nuestro trabajo (3 µg/mL). En un estudio realizado por Thill *et al.*²⁸³ se analizaron 51 cepas clínicas de *S. aureus* sensibles a RIF, encontrando que el 60% de las cepas mostraron una MBC entre 0.016 y 0.064 µg/mL, mientras que el 26% de las cepas mostraron un MBEC por encima de 4 µg/mL.

Otro estudio realizado por Reiter *et al.*²⁸⁴ demostró que los valores de MIC para RIF fueron notablemente bajos (<0.03 µg/mL) en comparación con la MBEC (64 µg/mL), lo que generó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con otros antimicrobianos probados. Las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo demostraron una reducción significativa de al menos 5 logaritmos en el recuento de *S. aureus* a una concentración de 0.5 µg/mL, pero cuando la concentración de NPs se incrementó hasta 2 µg/mL, no hubo una mejora considerable en la acción antimicrobiana observada (Fig. 21A). En las dosis evaluadas, las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo no ejercieron ningún efecto antimicrobiano en la formación de biofilm de *E. coli* y no fueron capaces de reducir los biofilms maduros de *E. coli*. La falta de efecto antibiofilm contra *E. coli* corrobora los resultados obtenidos con sus correspondientes en estado planctónico (Fig. 20).

Bajo las condiciones de cocultivo de ambas cepas bacterianas, se observó una disminución en la formación de biofilm de *S. aureus* (Fig. 21C) siguiendo la misma tendencia que se describió en el caso de los biofilms independientes. La adición de NPs PLGA-PEG-RIF sin anticuerpo mostró una inhibición más moderada en la formación de biofilm, con una reducción de hasta 2 logaritmos, en comparación con las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo.

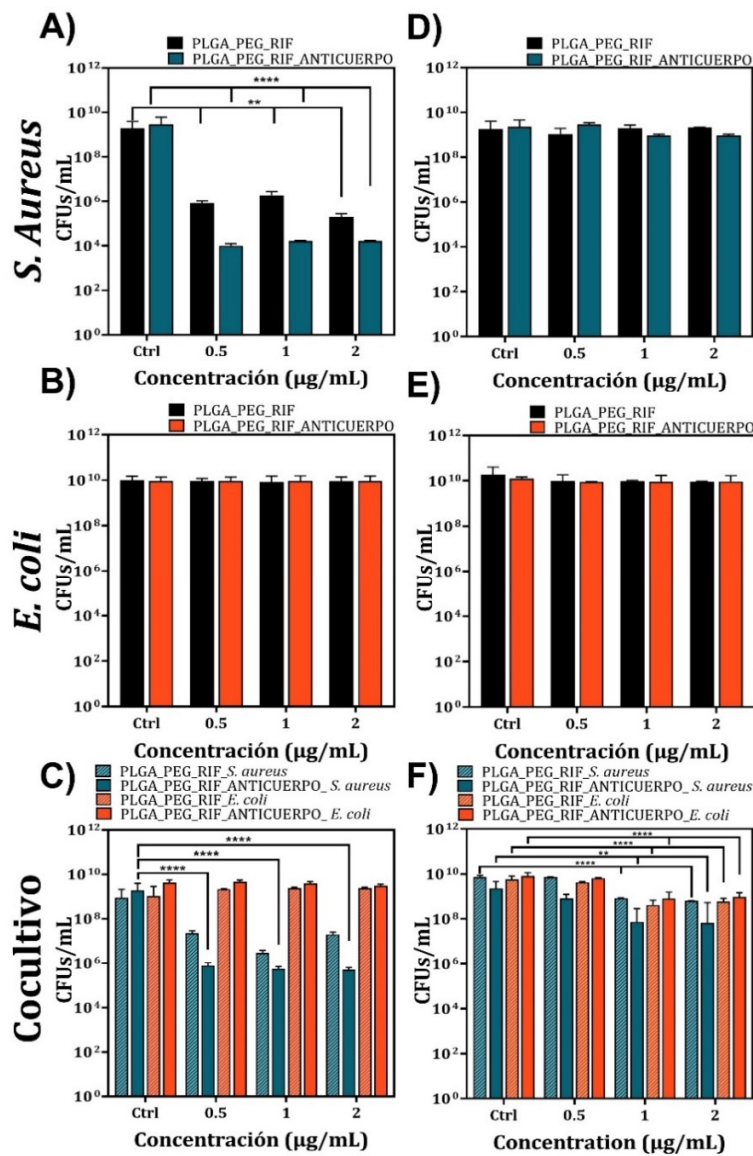


Fig. 21 Actividad bactericida del tratamiento con NPs en biofilms: Efecto de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en la inhibición de la formación de biofilms (A-C) y en la disrupción de biofilms ya formados (D-F). Se utilizaron *S. aureus* (A y D), *E. coli* (B y E) y el cocultivo de ambas cepas (C y F) para generar los biofilms. El crecimiento bacteriano se expresa en CFU/mL. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes triplicados ($N = 12$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Por otro lado, la adición de las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo al biofilm en formación de *S. aureus* resultó en una reducción significativa de hasta 4 logaritmos en la concentración más alta evaluada, en comparación con las muestras usadas como control. No se observó una dependencia significativa de la concentración en el rango analizado.

En cuanto a los biofilm de cocultivos ya formados, la adición de NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo (Fig. 21F) mostró una ligera disminución en el crecimiento de *S. aureus* (1 logaritmo) en comparación con las NPs sin anticuerpo, dicha reducción no es significativa. Sin embargo, se logró una reducción de 2 logaritmos cuando se añadieron NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en las concentraciones más altas probadas (1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con las muestras control. Al igual que se describió para los biofilms independientes (Fig. 21B y E), en el modelo de cocultivo no se observaron cambios en los biofilms de *E. coli* a pesar del tratamiento utilizado (Fig. 21 C y F). Estos resultados enfatizan la efectividad de las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en su capacidad de discernir de manera efectiva entre ambas cepas bacterianas en el modelo de biofilm de cocultivo.

La morfología de los biofilms *S. aureus* también se analizó mediante SEM. La Fig. 22 muestra la morfología de las bacterias no tratadas utilizadas como control, donde los cocos (para el caso de *S. aureus*) están rodeados por una matriz extracelular orgánica asignada a la EPS de acuerdo con la literatura previa²⁸⁵. El efecto de las NPs PLGA-PEG-RIF a concentraciones inhibitorias (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en los biofilms de *S. aureus* se muestra en el panel central de la Fig. 22, donde se observa una reducción en el crecimiento bacteriano en comparación con el control. Sin embargo, cuando se utilizan NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observa una reducción crítica en el crecimiento bacteriano, incluso se pueden apreciar agregaciones de las partículas, posiblemente debido al efecto de la avidina, indicado en la imagen mediante flechas rojas, mientras que las bacterias se indican mediante los círculos verdes.

La microscopía de fluorescencia confocal confirmó este efecto inhibitorio, como se muestra en las imágenes confocales en la Fig. 23. Se utilizó la tinción con SYTO 9 para teñir el ADN bacteriano en verde tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-

negativas vivas y muertas, y se utilizó *calcofluor white* como un tinte fluorescente azul que se une a los polisacáridos β -ligados, como los presentes en los biofilms bacterianos²⁸⁶. En la Fig. 23, el control muestra una capa superior espesa de EPS (azul) que protege a las bacterias presentes debajo (verde), como se observa en la proyección ortogonal (parte inferior de la imagen). En el biofilm de *S. aureus* tratado con NPs, tanto con anticuerpo como sin él, se observa una interrupción significativa de la capa de EPS, además se observan colonias bacterianas aisladas, siendo esta interrupción más pronunciada cuando se emplean NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. Estos resultados apuntan nuevamente a la especificidad de las NPs sintetizadas y a su capacidad para reducir significativamente el biofilm.

Las imágenes de SEM de los biofilms preformados de *S. aureus* representados en las Fig. 22, muestran una disminución en la población de bacterias después del tratamiento con NPs PLGA-PEG-RIF (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con la muestra usada como control, y esta disminución es aún más evidente cuando se utilizan NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. Es posible que la interrupción de la EPS sea una vía inhibitoria potencial. Sin embargo, en las imágenes de microscopía confocal (Fig. 23), se puede observar que las NPs sintetizadas no interrumpieron por completo la matriz extracelular, aunque cuando el biofilm se trató con NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, las bacterias (tanto vivas como muertas) son más evidentes que el biofilm, lo que podría implicar una reducción en la viabilidad bacteriana.

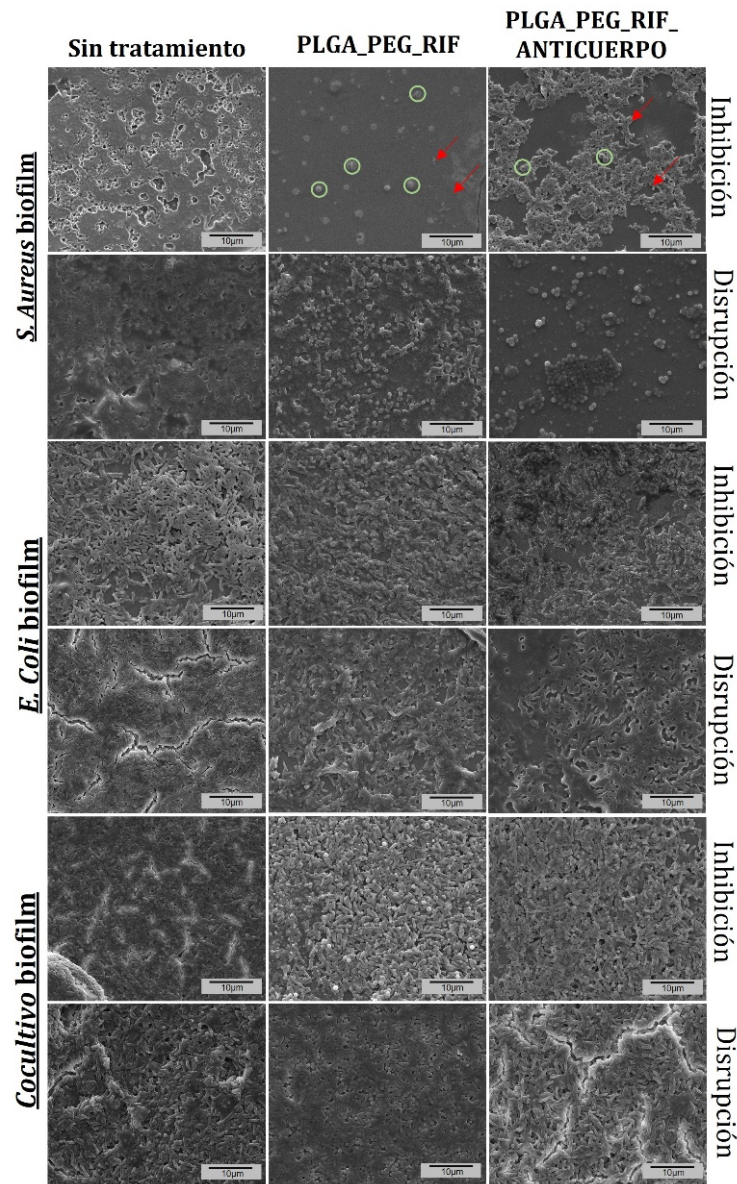


Fig. 22 Micrografías de SEM de biofilms bacterianos. Se utilizaron cepas de *S. aureus*, *E. coli* y el cocultivo de ambas para generar el biofilm. Se incluyeron muestras control sin tratamiento para comparación. Las imágenes muestran el efecto de las NPs cargadas con RIF, tanto con anticuerpo como sin anticuerpo, en los biofilms. Se evaluó la inhibición de la formación del biofilm y la interrupción de los biofilms maduros ya formados. Las flechas rojas indican la agregación de las partículas, mientras que los círculos verdes señalan la presencia de bacterias para facilitar la visualización. La escala corresponde a

10 μm .

Contra *E. coli*, las imágenes de SEM (Fig. 22) revelaron un crecimiento bacteriano uniforme, sin mostrar diferencias entre las muestras de control y las tratadas, así como entre ambos tratamientos (sin anticuerpo y con anticuerpo), lo cual es consistente con la especificidad de las NPs sintetizadas dirigidas contra *S. aureus*.

Sin embargo, en las imágenes de microscopía confocal, la tinción reveló que la producción de EPS puede llevar hasta 48 h en esta bacteria, de acuerdo con la literatura previa, por lo tanto, su producción se ve ligeramente obstaculizada²⁸⁷. Como consecuencia se observó una ligera disminución en la producción de EPS. Es importante señalar que, mientras que los biofilms de *S. aureus* están firmemente adheridos al sustrato, *E. coli*, al ser una bacteria móvil, forma biofilms en la interfase aire-líquido, lo que dificulta su tinción.

En condiciones de cocultivo, las imágenes de SEM (Fig. 22) mostraron una reducción significativa en la formación de biofilms de *S. aureus* cuando se utilizaron NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, a una concentración de 0.5 µg/mL, en comparación con las muestras de control, así como en comparación con las tratadas con NPs PLGA-PEG-RIF sin anticuerpo. Además, se observaron diferencias entre ambos tratamientos, ya que la presencia de las bacterias *S. aureus* era menos evidente en las muestras tratadas con NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. Estos efectos fueron confirmados por las imágenes de microscopía confocal (Fig. 23), las cuales mostraron una reducción en el espesor del biofilm, siendo más evidente en las muestras de biofilm tratadas con NPs funcionalizadas con anticuerpo en comparación con las no funcionalizadas. Además, se observaron diferencias en la eficacia de la inhibición de la formación del biofilm y la interrupción del biofilm preformado, siendo los tratamientos menos efectivos contra este último. En resumen, estos resultados son prometedores ya que subrayan la eficiencia y especificidad de las NPs sintetizadas en el tratamiento del biofilm de *S. aureus*.

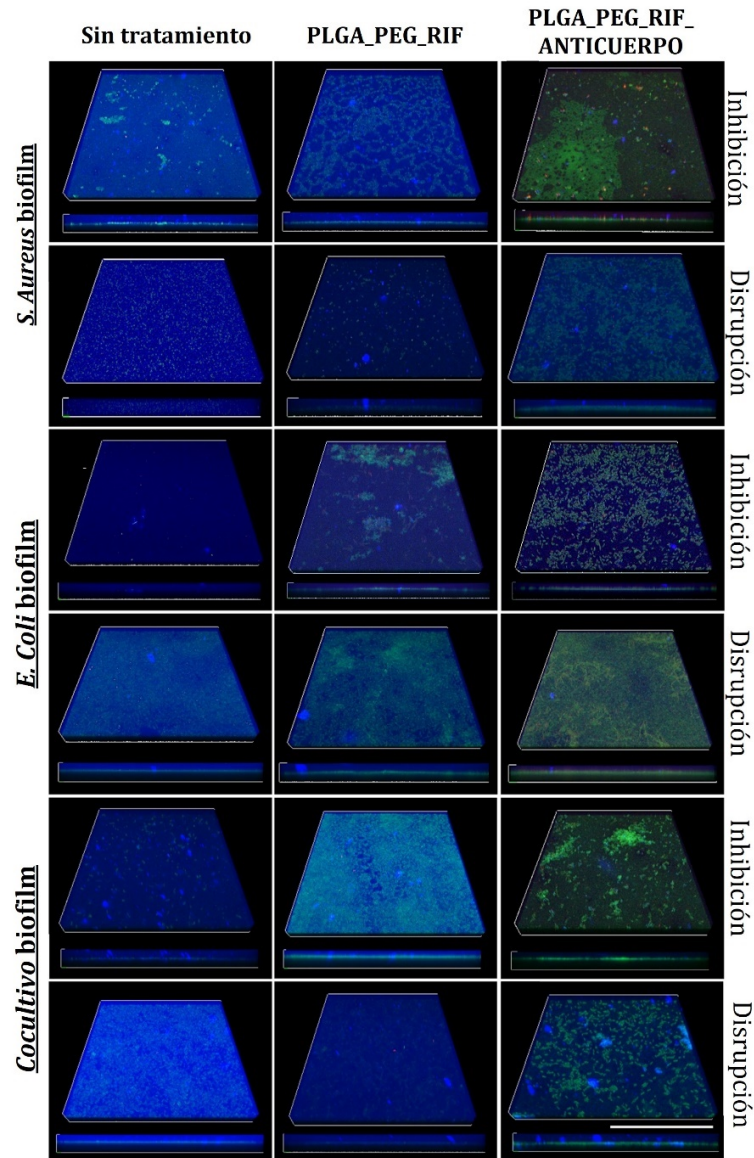


Fig. 23 Imágenes de microscopía confocal de barrido láser de biofilm. Se utilizaron cepas de *S. aureus*, *E. coli* y el cocultivo de ambas para generar biofilm. Se incluyeron muestras de control sin tratamiento para comparación. Las imágenes ilustran el efecto de las NPs cargadas con RIF, tanto sin anticuerpo como con anticuerpo, en los biofilms. Se evaluó la inhibición de la formación del biofilm y la interrupción de los biofilms ya formados. En todas las muestras, las bacterias están teñidas de verde con SYTO 9 y adheridas al sustrato, mientras que el tinte de calcofluor muestra la EPS en azul. Las imágenes inferiores de cada muestra muestran las imágenes de proyección máxima en el eje z. La escala corresponde a 50 μm .

IV.4.3 Citocompatibilidad de nanopartículas y actividad bactericida en un modelo de infección *in vitro*

Se realizó el ensayo de viabilidad celular (Fig. 24) para evaluar la toxicidad *in vitro* de las nanopartículas PLGA-PEG/RIF, con y sin el anticuerpo, en los macrófagos murinos J774 después de 24 h de incubación. Ambos tipos de nanopartículas demostraron una viabilidad celular superior al 70% en las dosis ensayadas, lo cual cumple con el valor mínimo establecido por la norma ISO 10993-5²⁸⁸ para considerar un material como no citotóxico. Los resultados son lógicos dada la inocuidad de las NPs de PLGA a las dosis ensayadas y a la propia naturaleza del antibiótico, el cual es obviamente citotóxico frente a células procariontas pero no frente a células eucariotas a las dosis de uso.

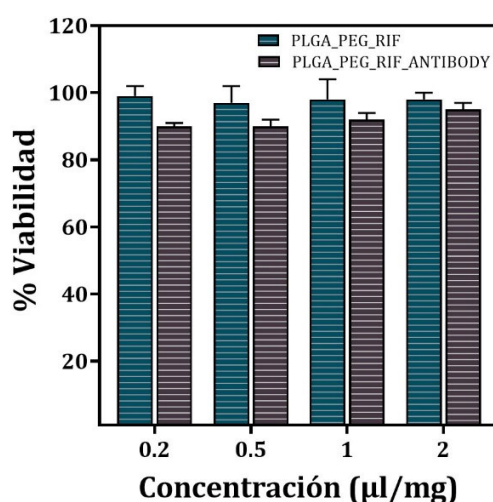


Fig. 24 Viabilidad de los macrófagos J774 después del tratamiento durante 24 h con NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo. Los resultados (media \pm desviación estándar de tres réplicas) se muestran con relación a las muestras de control (células no tratadas), que se establecieron como una viabilidad del 100%.

Para experimentos posteriores, se seleccionaron las NPs con y sin anticuerpo a una concentración de 0.5 µg/mL, ya que como se determinó previamente, esta concentración es bactericida para los cultivos planctónicos de *S. aureus*, además de no presentar efectos citotóxicos. Se ha demostrado que las nanopartículas PLGA-PEG no tienen efectos citotóxicos en dosis de hasta 400 µg/mL no solo en macrófagos, sino

también en fibroblastos y queratinocitos²⁸⁹. Varios artículos científicos también muestran el comportamiento no citotóxico de RIF en macrófagos murinos J774 (concentración inhibitoria media, IC50 = 65 µg/mL), corroborando su naturaleza antibiótica^{290,291}.

Las células fueron infectadas con *S. aureus* a multiplicidades de infección (MOIs) de 8:1, 10:1 y 20:1, mientras que *E. coli* se utilizó a MOIs de 3:1, 5:1 y 8:1. Para el cocultivo, se combinaron las mismas MOIs. La viabilidad de los macrófagos después de la infección se evaluó mediante el ensayo de Live/Dead y se analizó mediante microscopía confocal (Fig. 25). En general, se observó una viabilidad celular similar a la de la muestra control en la mayoría de las dosis infecciosas (Fig. 25A). Sin embargo, a dosis más altas en el cocultivo, se observó una ligera disminución en la viabilidad. No obstante, a estas dosis, el número de células vivas (tinción verde) se mantuvo mucho mayor que el número de células muertas (tinción roja).

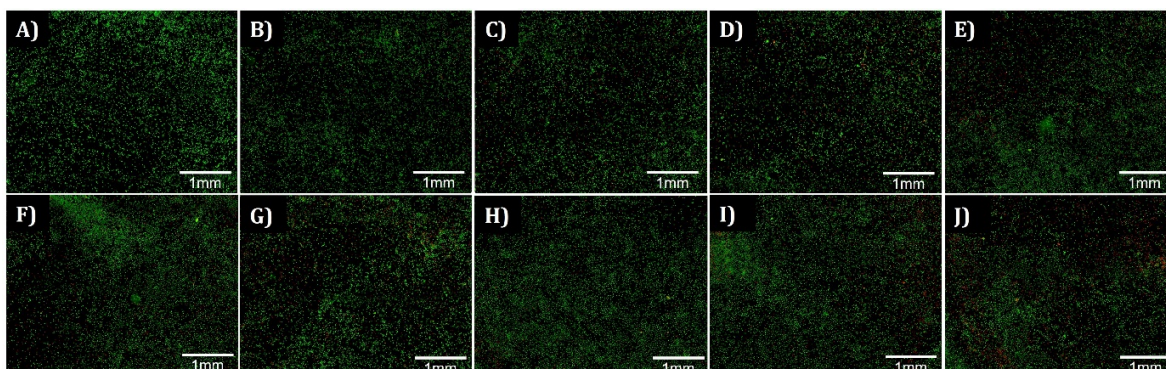


Fig. 25 *Análisis de viabilidad de macrófagos mediante microscopía confocal bajo diferentes condiciones experimentales. A) Imagen representativa de macrófagos no infectados. Infección de macrófagos con S. aureus a MOIs de B) 8:1, C) 10:1 y D) 20:1. Infección de macrófagos con E. coli a MOIs de E) 3:1, F) 5:1 y G) 8:1. Infección de macrófagos con el cocultivo de S. aureus y E. coli a MOIs de H) 8:3:1, I) 10:5:1 y J) 20:8:1. Magnificación de 10x.*

Se evaluó la actividad antibacteriana intracelular de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo a una concentración de 0.5 µg/mL (determinada en el estudio de citotoxicidad; Fig. 26). Después del tratamiento, las bacterias intracelulares

supervivientes se cultivaron en placas TSA y medios de cultivo selectivos y se contaron después de 24 h de incubación. Los efectos bactericidas de la concentración seleccionada de NPs también se analizaron en cultivos bacterianos sin macrófagos como control, y también se incluyó otro control sin NPs en el estudio. Las colonias resultantes de las bacterias control sin macrófagos no mostraron crecimiento alguno, como era de esperar, ya que se utilizó sulfato de gentamicina durante el proceso para eliminar las bacterias extracelulares, lo que demuestra que el crecimiento en el modelo de bacterias/células se puede atribuir exclusivamente a las bacterias intracelulares. Los resultados de la infección de cada cepa por separado se presentan en la Fig. 26A como CFU/mL.

Los datos indican que *S. aureus* mostró diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento cuando se incubó con las NPs PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en un modelo de infección solo con este patógeno. Cuando se incubó con partículas sin anticuerpos, se observaron diferencias mínimas en comparación con el control, lo que sugiere un efecto inhibitorio reducido de las nanopartículas. En contraste, *E. coli* no mostró diferencias, de acuerdo con la MIC y MBC, lo que indica que no presentó variaciones en el crecimiento en presencia de las NPs. En la Fig. 26B, cuando ambas bacterias se incubaron en cocultivo en el modelo de infección, *S. aureus* mostró una disminución en el crecimiento al entrar en contacto con las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos, diferencia estadísticamente significativa en comparación con las no dirigidas. En resumen, se concluye que las nanopartículas dirigidas mostraron una acción antimicrobiana mejorada contra las bacterias intracelulares, incluso al infectar macrófagos con ambos patógenos (*E. coli* y *S. aureus*), siendo este efecto claramente específico contra *S. aureus*.

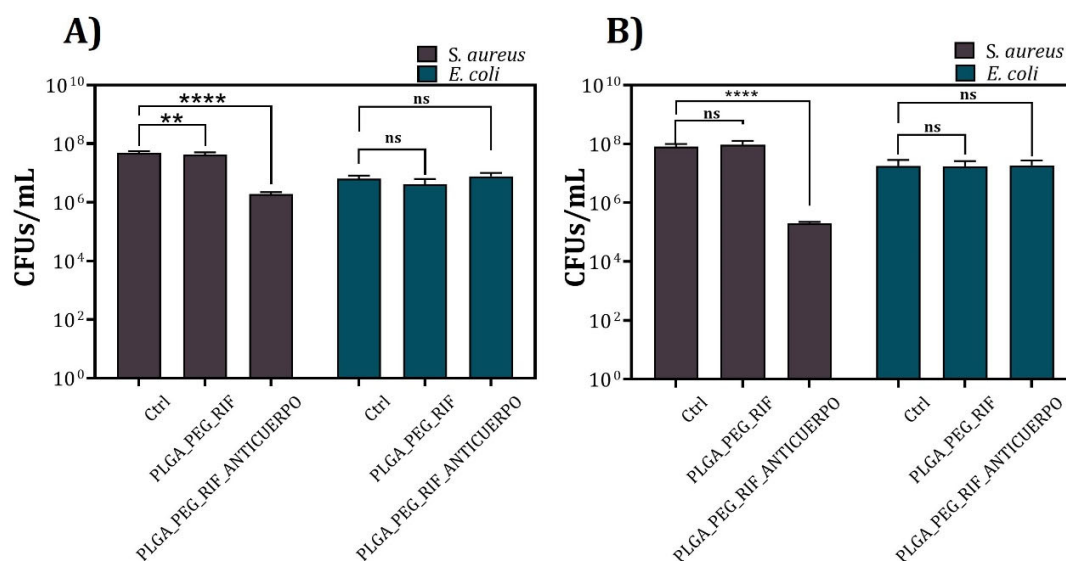


Fig. 26 Recuento de CFU/mL de bacterias intracelulares después de la infección de macrófagos J774 con *S. aureus* o *E. coli* de manera independiente (A) y con el cocultivo de ambas cepas (B). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado ($N = 12$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

IV.5 CONCLUSIONES

Mediante los resultados descritos en este estudio se ha demostrado de manera concluyente que el direccionamiento de bacterias a través de anticuerpos policlonales anti-*Staphylococcal* ofrece una ventaja selectiva en la eliminación de bacterias infecciosas planctónicas, sésiles e intracelulares. Además, se han realizado pruebas comparativas utilizando modelos de cocultivo de *E. coli* y *S. aureus*, empleando inmunonanopartículas tanto direccionadas como no direccionadas, para simular *in vitro* la naturaleza polimicrobiana de las infecciones. En este contexto, se ha demostrado con el trabajo realizado que las nanopartículas funcionalizadas presentan alta selectividad hacia las bacterias Gram-positivas.

Las nanopartículas obtenidas presentaron direccionamiento gracias a un efecto profiláctico superior en la prevención de la formación de nuevos biofilms debido a la interacción del anticuerpo con el metabolismo bacteriano. Sin embargo, no se han logrado erradicar por completo los biofilms maduros ya formados. Asimismo, en

modelos de infección de células eucariotas infectadas, macrófagos murinos J774, se ha observado que las inmunonanopartículas dirigidas redujeron la infección intracelular de la bacteria patógena *S. aureus*. En resumen, mediante la estrategia experimental desarrollada, se ha demostrado que las nanopartículas poliméricas cargadas de antibiótico y funcionalizadas con anticuerpos selectivos representan un enfoque superior para la eliminación de bacterias patógenas sésiles, planctónicas, polimicrobianas e intracelulares, a través de la comparación con el uso de nanopartículas poliméricas cargadas de antibiótico no direccionadas.

Capítulo V
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS
GENERALES

Conclusiones generales

A través de los resultados obtenidos en cada capítulo, se ha recopilado la información necesaria para contribuir de manera significativa al desarrollo de estrategias para el diseño y fabricación de nuevos sistemas de liberación de antimicrobianos para su aplicación en heridas tópicas con el fin de prevenir o eliminar infecciones bacterianas en las mismas.

- Mediante el método de electrohilado, se logró desarrollar apósitos basados en fibras homogéneas de tres tipos diferentes del polímero Eudragit® (L100-55, S100 y RS100) con diferente respuesta al pH del medio. El electrohilado permitió controlar la morfología del apósito, cargar eficientemente distintos fármacos y escalar la producción de los mismos. La selección de cada tipo de polímero permitió ajustar la cinética de liberación de los antimicrobianos contenidos en las fibras derivadas de la síntesis, lo cual resulta crucial para adaptar el tratamiento a las distintas etapas de cicatrización de la herida. Esta capacidad de personalizar el tratamiento en función de la etapa de cicatrización de la herida proporciona un enfoque más eficaz y adaptado a las necesidades individuales de cada paciente.
- Los resultados obtenidos demuestran que las moléculas terapéuticas de RIF, THY, CHXD, RIF y CIP, si bien se establecieron en algunos casos interacciones con la matriz polimérica utilizadas como material encapsulante, mantuvieron sus estructuras químicas intactas al ser cargadas en los apósitos mediante las técnicas eletrohidrodinámicas, lo que les permitió conservar su actividad antimicrobiana.
- Para el caso de heridas ya infectadas, donde es posible la formación de biofilm, se desarrolló un apósito innovador que combina dos antibióticos en dos estructuras diferentes: fibras de Eudragit® RS100 cargadas con RIF, decoradas con micropartículas de Eudragit® RS100 cargadas con CIP. Al utilizar dos estructuras distintas, permitió un enfoque terapéutico efectivo para la erradicación de bacterias. Por un lado, la rápida liberación del CIP contribuye a una acción antimicrobiana inmediata, mientras que las fibras cargadas con RIF

permitieron una liberación sostenida a lo largo del tiempo, manteniendo la actividad antimicrobiana de forma prolongada para garantizar la inocuidad y prevenir posibles recidivas. La combinación de estos antibióticos generó una sinergia que mejoró la actividad de ambos fármacos. Esto presenta ventajas significativas, ya que permite minimizar las concentraciones requeridas de cada uno, reduciendo así el riesgo de desarrollo de resistencias bacterianas. Al mantener una actividad antimicrobiana efectiva con concentraciones más bajas, se contribuye a la preservación de la eficacia de los antibióticos en el tratamiento de infecciones. Utilizando este apósito que combina RIF y CIP (RIF-CIP/RS100), se observó una mejora significativa en la actividad antimicrobiana tanto contra *S. aureus* como contra *E. coli* tanto en su forma planctónica como sésil, en comparación tanto con las mismas cantidades de fármacos combinados libres como con el apósito que solo contiene RIF mostrado en el Capítulo II.

- En un modelo de viabilidad *in vitro* en macrófagos, se evaluó la citotoxicidad de los apósitos poliméricos cargados con RIF, CHXD, THY y CIP. Los resultados demostraron que los apósitos no presentaron toxicidad celular a las dosis ensayadas, incluso cuando se compararon con las concentraciones equivalentes de fármacos libres. Salvo en el caso de los apósitos de RIF-CIP/RS100 a una concentración de 2 mg/mL para los que se observó una disminución de la viabilidad de los fibroblastos, se observó una mejora en la citocompatibilidad de los agentes terapéuticos cuando se cargaron en los apósitos frente a su estado libre. Estos hallazgos respaldan la aplicabilidad potencial de los apósitos híbridos en el tratamiento de heridas tópicas, ya que facilitan la eliminación efectiva de bacterias y mejoran la respuesta biológica de las células cutáneas.
- Se exploró la estrategia de la selectividad al funcionalizar partículas de PLGA-PEG-RIF, sintetizadas mediante nanoprecipitación, con un anticuerpo anti-*S. aureus* biotinilado. Las nanopartículas funcionalizadas permitieron un direccionamiento específico hacia bacterias *S. aureus*. La incorporación de anticuerpos en las partículas resultó en una disminución de la concentración requerida de RIF cargada en las partículas para lograr la erradicación de *S. aureus*, tanto en su estado planctónico como en la inhibición del biofilm. Este

efecto se observó incluso en presencia de *E. coli* en un modelo de cocultivo. Sin embargo, no se logró una erradicación completa de los biofilms maduros ya formados en ninguno de los casos.

- A través de las inmunopartículas se observó una reducción de la infección intracelular de la bacteria *S. aureus* en modelos de células eucariotas, lograda a una concentración de 0.5 µg/mL. Estos hallazgos destacan el potencial de estas partículas funcionalizadas como una estrategia prometedora para mejorar la acción bactericida y reducir las dosis de antibióticos necesarias mediante su incorporación futura en un apósito.

En resumen, los procedimientos y resultados obtenidos en el trabajo de esta tesis abren nuevos horizontes para el desarrollo de sistemas inteligentes, y su implementación como agentes antimicrobianos dentro del proceso de cicatrización de heridas. El control de las cinéticas de liberación en dependencia del pH, la liberación controlada de antimicrobianos, la sinergia de diferentes combinaciones de antibióticos y el direccionamiento selectivo de bacterias mediante nanopartículas funcionalizadas representan nuevos avances hacia el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas para el tratamiento de heridas infectadas, mejorando la salud y calidad de vida de los pacientes.

Usando los métodos descritos, nuevas combinaciones de polímeros con antibióticos y/o antimicrobianos específicos pueden ser exploradas para la elaboración de apósitos inteligentes. Asimismo, nuevas respuestas y cinéticas de liberación podrían ser desarrolladas haciendo posible ajustar el perfil de liberación para la aplicación requerida y brindar especificidad para el tipo de patógeno presente, aumentando la eficacia.

Sin embargo, existen retos por superar y nuevas propiedades por revelar para trasladar este tipo de desarrollos a la aplicación clínica diaria. Para una aplicación efectiva de apósitos inteligentes, es esencial comprender cómo estos materiales interactúan con las células epiteliales y cómo afectan el proceso de formación de tejido en la superficie de la herida. Además, es crucial investigar si la superficie proporcionada por estos apósitos actúa como obstáculo o coadyuvante en la regeneración epitelial

natural. Otro aspecto fundamental es identificar cómo se podría mejorar el proceso regenerativo. Explorar estas características y propiedades de los materiales en sistemas inteligentes proporcionará información valiosa para diseñar nuevas estrategias de tratamiento de las heridas tópicas de manera integral.

En el campo de la terapia dirigida, es posible la innovación dentro del diseño, y de la elaboración de inmunopartículas. Una perspectiva prometedora es la exploración de nuevas rutas para la incorporación de nuevos fármacos, tanto solubles como no solubles en medios biológicos, así como el aumento de la carga terapéutica en las partículas. Protocolos nuevos o la adaptación de los existentes son necesarios para el anclaje de anticuerpos, aptámeros, péptidos y otras moléculas con potencial de direccionamiento y tropismo brindando la posibilidad de anclar la molécula adecuada para combatir una infección específica. Además, se pueden realizar estudios adicionales para evaluar la estabilidad a largo plazo de los sistemas desarrollados y su aplicabilidad en diferentes tipos de heridas. Estos esfuerzos continuarán impulsando el campo de la terapia antimicrobiana en la cicatrización de heridas y contribuirán a mejorar aún más la eficacia y versatilidad de estos sistemas.

Anexo I

AI.1 Materiales y Métodos

AI.1.2 Materiales

Reactivos químicos:

Se utilizaron varios reactivos químicos suministrados por diferentes empresas. Evonik Industries AG (Essen, Alemania), proporcionó: Eudragit® L100-55 (L100-55), Eudragit® S100 (S100), Eudragit® RS100 (RS100) y Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA-COOH, Resomer RG 503 H, peso molecular de 20k Da) . Además, se adquirieron los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania): Cloroformo (CHCl₃, anhidro, ≥99%), N,N-Dimetilformamida (DMF, >99%), dimetil sulfóxido (DMSO, >99%), Tween® 80, fosfato salino tamponado (PBS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), rifampicina (RIF, ≥97%), clorhexidina (CHXD, ≥99.5%), timol (THY, >98.5%), acetonitrilo (anhidro, 99.8%), trifluoroacético (TFA), acetona (ACS reagent, ≥99.5%), cloroformo-d (99.8% de átomos de D), éter dietílico (99.7%), metanol (99.8%) y diclorometano (99.8%), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocioruro (EDC), Avidina de clara de huevo (Millipore), N,N-Diisopropiletilamina (DIEA, >99.5%) y N-Hidroxisuccinimida (NHS, 98%). Además, se adquirió Etanol absoluto (EtOH) de Panreac AppliChem (Barcelona, España).

Reactivos biológicos:

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Staphylococcus aureus* que expresan GFP, donado por la Dra. Cristina Prat del Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, España.
- *Escherichia coli* S17, donado por el Dr. Jose A. Ainsa de la Universidad de Zaragoza, España.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, adquirido a través de Ielab, España.

Se utilizaron células de diferentes tipos, incluyendo:

- Fibroblastos dérmicos humanos (NHDF-Ad) de Lonza (Basilea, Suiza).
- Macrófagos de ratón J774A.1 ATCC-TIB-67™ de LGC Standards (Barcelona, España).

- Queratinocitos humanos HaCaT proporcionados por el Dr. Pilar Martín-Duque de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza, España).

Se utilizaron diversos reactivos biológicos suministrados por diferentes empresas y colaboradores. De Laboratorios Conda-Pronadisa SA (Madrid, España) se adquirieron los siguientes medios de cultivo: Caldo de soja con triptona (TSB) y el Agar de soja con triptona (TSA). El ensayo de viabilidad celular Blue® fue adquirido de Abnova GmbH (Taipei, Taiwán). El medio modificado Eagle de Dulbecco con alta concentración de glucosa (DMEM; DMEM con glutamina estable), el antibiótico-antimicótico (60 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B) y el suero fetal bovino al 10% (v/v) fueron adquiridos de Biowest (Nuaille, Francia). Las placas de Agar de Soja Triptona (TSA) se adquirieron en Avantor VWR (Radnor, USA). De ThermoFisher (Waltham, MA, USA) se adquirió el Anticuerpo de cabra policlonal contra Staphylococcus aureus biotinilado. Por último, se adquirió Biotina-PEG3400-NH₂ de Xi'an Ruixi Biological Technology Co., China.

AI.1.3 Técnicas de síntesis de materiales

AI.1.3.1 Electrohilado y electrospraying

Para sintetizar los apósitos fabricados mediante el proceso de electrohilado descritos en los **Capítulo II y III**, se utilizó un electrohilador modelo Yflow 2.2 D500 (Electrospinning Machines / R&D Microencapsulation, España). El electrohilador esta equipado con dos tipos de colectores: un colector de placa plana y un tambor rotatorio. Para la obtención de los apósitos, los colectores fueron recubiertos con papel de aluminio. La deposición de los apósitos se llevó a cabo a temperatura ambiente (25-27°C) con una humedad relativa del 30-50%.

En el caso de los apósitos del **Capítulo II**, las soluciones precursoras, descritas en la sección II.3.1 se cargaron en jeringas de 10 mL. Para todas las soluciones, se estableció una velocidad de flujo de 1.0 mL/h. La distancia entre la punta de la aguja y el colector plano se fijó en 18.5 cm cuando se electrohilaba Eudragit® L100-55, y a 15 cm para Eudragit® S100 y RS100.

Para este capítulo, debido a la baja humedad ambiente (30%), se utilizó una configuración de aguja coaxial para para producir las fibras de RS100 sin carga y

cargadas con RIF. En este caso, se alimentó CHCl_3 a través de la aguja externa para evitar obstrucciones, mientras que el fármaco disuelto en el polímero fluía a través de la aguja interna.

En todos los casos se aplicó un voltaje negativo dentro del rango de -2 a -4 kV, y un voltaje positivo a las agujas que variaba de +7.69 a +15.07 kV. Este voltaje se ajustó en cada caso hasta alcanzar un cono de Taylor estable durante el proceso de electrohilado. Los resultados de la optimización tanto de las soluciones como del proceso de electrohilado se encuentran descritos en la Tabla 12 del Anexo II.

En el **Capítulo III**, la solución descrita en la sección III.3.1 para las fibras cargadas con RIF (RIF/RS100) se alimentó con un flujo de 1 mL/h, con una distancia de 15 cm entre la punta de la aguja y el colector plano, aplicando una diferencia de voltaje de 15-19 kV. Mientras que la solución resultante para partículas cargadas con CIP (CIP/RS100) se electroprayó a un flujo de 0.5 mL/h, con una distancia de 7 cm entre la aguja y el colector plano, aplicando una diferencia de voltaje de 17-20 kV.

Para la preparación de fibras decoradas con partículas (RIF-CIP/RS100), se emplearon las mismas soluciones descritas anteriormente. La deposición de fibras se realizó sobre el tambor rotatorio a 100 rpm aplicando una diferencia de voltaje de 9-13 kV, obteniéndose laminas homogéneas de fibras. Se llevaron a cabo dos síntesis una para fibras sin carga y otra para fibras cargadas con RIF. Después de 3 h de electrohilado de las fibras, se procedió a electroesprayar la solución de las nanopartículas cargadas y sin cargar, a una distancia de 22 cm, aplicando una diferencia de voltaje de 16-18kV a un flujo de 1 mL/h sobre la capa electrohilada inicial. De esta manera, se obtuvieron fibras decoradas con partículas después de 3 h de electropray.

Todos los apósitos y partículas sin carga se utilizaron para la caracterización de los materiales de manera individual y como control para los ensayos biológicos.

AI.1.3.2 Síntesis del copolímero de PLGA-PEG-biotina

Para preparar el copolímero utilizado en el **Capítulo IV**, se disolvió 1 g de PLGA-COOH en 4 mL de diclorometano y se agitó a temperatura ambiente (27°C) en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS; relación molar PLGA:NHS de 1:8) y N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC; relación molar PLGA:EDC de 1:8) para

formar un éster reactivo de amina que posteriormente se conjugó con PEG-NH₂ biotinilado. El exceso de NHS y EDC se eliminó mediante un lavado con una solución de éter etílico y metanol en una proporción de 70/30% v/v, después del lavado, los disolventes residuales se eliminaron a vacío durante 4 h.

El polímero se volvió a disolver en 5 mL de cloroformo purgado con argón y se incubó bajo agitación suave durante una noche con NH₂-PEG-biotina (peso molecular de 3400, relación molar PLGA:PEG de 1:1.3) y 2 mL de N,N-Diisopropylethylamine (DIEA). Posteriormente, el producto se lavó con metanol para eliminar el PEG no unido. El material obtenido se recuperó utilizando éter etílico, se secó a vacío durante 2 h y se almacenó a -20 °C, etiquetado como PLGA-PEG-biotina.

AI.1.3.3 Síntesis de nanopartículas sin cargar y cargadas con RIF mediante nanoprecipitación

Para la síntesis por nanoprecipitación de nanopartículas (NPs) se prepararon soluciones precursoras de la siguiente manera: utilizando acetona como disolvente se preparó una solución de 10 mg/mL de PLGA-PEG-biotina y, en paralelo, una solución de 5 mg/mL de RIF. En el caso de las NPs sin carga de RIF, solo se utilizó la solución de PLGA-PEG-biotina con acetona como disolvente. La solución final para las partículas cargadas con RIF se obtuvo mezclando la solución de PLGA-PEG-biotina al 50% v/v y la solución de RIF al 20% v/v en un volumen final de 1 mL. Esta solución se añadió luego a 1 mL de agua ultrapurificada bajo agitación (300 rpm) utilizando una bomba de jeringa Harvard Apparatus Standard PHD Ultra, a una velocidad de flujo de 2 mL/h. La solución recogida se agitó a 300 rpm durante 2 h a temperatura ambiente (27°C) para permitir la precipitación del polímero y la evaporación del disolvente. Las NPs resultantes se recogieron mediante ultrafiltración a 5500 rpm durante 5 min (centrífuga EBA21, Hettich, Tuttlingen, Alemania) utilizando un filtro Amicon Ultra-4, 100 kDa (Millipore). Las NPs resultantes (PLGA-PEG-RIF o partículas sin cargar) se redispersaron en 0.3 mL de agua ultrapurificada y se almacenaron a 4°C.

AI.1.3.4 Funcionalización de NPs con anticuerpo anti-Staphylococcus aureus

Se utilizó el sistema avidina-biotina para funcionalizar las nanopartículas de PLGA-PEG-RIF con el anticuerpo biotinilado²⁷¹. Para la unión de la avidina, se incubaron 500 mL

de dispersión de NPs (20 mg/mL) con 2 mL de solución de avidina (2 mg/mL) en un matraz cerrado y se agitaron suavemente en un agitador de rodillo durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, las NPs se lavaron con el objetivo de eliminar la avidina no unida mediante ultrafiltración a 5500 rpm durante 5 min utilizando un filtro Amicon. Las nanopartículas resultantes se resuspendieron utilizando 0.3 mL de agua. Después, se mezclaron 150 µL (20 mg/mL) de nanopartículas modificadas con avidina y 2.8 µL (4.5 mg/mL) de anticuerpo policlonal anti-*S. aureus* biotinilado y se incubó la mezcla durante 15 min a 4 °C. Las muestras (PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo) se almacenaron a 4 °C para análisis posteriores.

AI.1.4 Técnicas de caracterización fisicoquímica

AI.1.4.1 Viscosidad

Las viscosidades de las soluciones del **Capítulo II** antes del proceso de electrohilado se determinaron utilizando un viscosímetro FUNGILAB V.1.0 VISCO BASIC con un adaptador de 8 µL, a una velocidad de rotación de 30 rpm y a una temperatura de 20 °C.

AI.1.4.2 Efecto del pH

El efecto del pH en las fibras resultantes del **Capítulo II** se estudió primero introduciendo las fibras en soluciones tampón a diferentes pH (5.5, 7.4 y 8.2) durante 1 h, secándolas durante 12 h y luego analizando su morfología resultante por SEM, preparación descrita más adelante. Pero como para los polímeros Eudragit® L100-55, las fibras se disolvieron por completo después de sumergirlas en soluciones de pH 7.4 y 8.2, la prueba se llevó a cabo tan solo depositando 10 µL del tampón correspondiente en la superficie de las membranas electrohiladas fabricadas.

AI.1.4.3 Caracterización morfológica

La morfología de los materiales sintetizados fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Previamente a la observación, las muestras fueron recubiertas con una capa de paladio (Pd) y las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio electrónico de barrido Inspect® F50 FEG (compañía FEI, USA)

En el **Capítulo II**, se midieron los diámetros de las nanofibras en las imágenes de SEM, mientras que en el **Capítulo III** se realizaron mediciones separadas de los diámetros de

las fibras y las partículas, así como del apósito combinado. En todos los casos, se utilizó el software DigitalMicrograph® (versión 2.31.734.0) para el análisis de las imágenes.

En el **Capítulo IV**, se midieron los diámetros de las nanopartículas en las imágenes de SEM (100 mediciones) utilizando el software ImageJ (Versión Java 1.8.0_172).

AI.1.4.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Para evaluar las interacciones químicas entre los fármacos y los polímeros utilizados, se analizaron los materiales sintetizados mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrómetro FTIR Bruker VERTEX 70 (Bruker, Billerica, MA, USA), con un dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR) *Golden Gate*. Los espectros se registraron promediando 40 barridos en el rango de número de onda de 4000-600 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

AI.1.4.5 Espectroscopía Raman

Se realizaron mediciones Raman en los apósitos del **Capítulo II** para obtener información sobre las vibraciones moleculares de los agentes farmacéuticos presentes en las fibras. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio confocal de sobremesa WITec Alpha 300 con una resolución espectral de 2 cm^{-1} . Se utilizó una longitud de onda de excitación de 785 nm y una potencia de láser de 30 mW para las fibras con RIF, mientras que para las fibras cargadas con CHXD y THY se utilizó una longitud de onda de excitación de 633 nm con una potencia de láser de 10 mW. Todas las mediciones se realizaron en la configuración de retrodispersión.

AI.1.4.6 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Con el fin de estudiar la estructura molecular del PLGA-NHS resultante y el PLGA-PEG-biotina utilizados para la síntesis del copolímero de PLGA-PEG-biotina del **Capítulo IV**, se recogieron 10 mg de cada muestra después de su síntesis, se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$)²⁷⁰. Las muestras analizadas se disolvieron en cloroformo deuterado (10 mg/mL) y se colocaron en un tubo de vidrio para $^1\text{H-NMR}$. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Advance de 400 MHz para

verificar la conjugación efectiva del PEG con PLGA y evaluar la posible presencia de productos intermedios.

AI.1.4.7 Dispersión dinámica de la luz y Potencial zeta

Para evaluar la carga eléctrica en la superficie de las partículas sintetizadas en el **Capítulo IV** y analizar su estabilidad electrostática, se utilizó la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS). El potencial zeta se midió utilizando un analizador de tamaño de partículas Brookhaven 90plus fabricado en Holtsville, NY, USA. Para determinar los tamaños hidrodinámicos de las nanopartículas, se empleó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) en el mismo equipo, la cual se basa en la detección de las fluctuaciones en la dispersión de la luz causadas por el movimiento por difusión de las partículas.

AI.1.4.8 Carga del fármaco y eficiencia de encapsulación

Con el fin de cuantificar la capacidad de los sistemas sintetizados para contener una cantidad específica de cada agente terapéutico, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) y la carga de fármaco (DL) utilizando las ecuaciones (1) y (2), respectivamente:

$$EE (\%) = \frac{\text{Masa del fármaco cargado (mg)}}{\text{Masa del fármaco cargado añadida inicialmente (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Masa del fármaco cargado (mg)}}{\text{Masa total de las fibras cargadas (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

Para la determinación de los valores del contenido de los agentes terapéuticos se utilizaron dos métodos:

UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis se realizó utilizando un espectrofotómetro V-670 UV-VIS-NIR Jasco (Jasco Applied Science, Eschborn, Alemania).

En el **Capítulo II**, el contenido de RIF, CHXD y THY en las fibras se midió a una longitud de onda de 340 nm, 254 nm y 276 nm, respectivamente, mediante la disolución de 2 mg

de las fibras cargadas de fármacos en 1 mL de DMSO. Se restó la línea base de la misma cantidad de cada polímero no cargado y disuelto para eliminar cualquier posible interferencia.

En el **Capítulo III**, la carga de antibiótico alcanzada en las fibras RIF/RS100 y en las partículas CIP/RS100 fue analizada independientemente. Tres muestras de cada síntesis fueron disueltas individualmente en DMSO y se analizaron mediante espectrofotometría UV-Vis a longitudes de onda de 340 nm la RIF y 280 nm el CIP.

En el **Capítulo IV**, la RIF se midió a una longitud de onda de 340 nm, las muestras se prepararon disolviendo 0.1 mL de las NPs cargadas con el antibiótico en 0.9 mL de DMSO.

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)

En el **Capítulo III**, la carga en los apósitos RIF-CIP/RS100 se determinó mediante UHPLC utilizando un equipo Waters Acquity equipado con un detector Waters 2998 Acquity PDA, una columna C18 Excel (3 μm , 4.6 x 100 mm) a una longitud de onda de 280 nm. Para esta medición se disolvieron 2 mg de fibras decoradas con partículas en una mezcla de acetonitrilo/agua (2:1), cada muestra se filtró a través de un filtro CLARIFY-NY de 0.22 μm .

AI.1.4.9 Evaluación de la cinética de liberación

La evaluación de la cinética de liberación de los compuestos cargados se realizó utilizando un agitador rotatorio J.P. Selecta Movil-Rod a una temperatura de 37 °C. Para cada material sintetizado, se tomó un peso conocido y se colocó en un medio de liberación específico correspondiente a cada material.

En intervalos de tiempo predefinidos, se recogió 1 mL del sobrenadante y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 3000 rpm. Luego, se reemplazó el volumen recogido con una cantidad equivalente de disolución fresca.

En los apósitos sintetizados en el **Capítulo II**, se utilizaron diferentes soluciones tamponadas con diferentes pH (pH = 5.5, 7.4 y 8.2) para emular los diferentes valores de pH de una herida. Se utilizó una solución tamponada a pH 5.5 basada en acetato de sodio 2.05 g + ácido acético 1.5 mL + NaOH 2 N para simular el pH de la piel intacta, una solución tamponada a pH 7.4 basada en 0.1 M de PBS para imitar la fase de cicatrización

de la herida en la que se produce la proliferación celular y la granulación, y una solución tamponada a pH 8.2 basada en una solución de TRIS 0.1 M para simular el pH de las heridas infectadas. Para realizar este estudio, se sumergieron 5 mg de fibras de cada polímero cargado con fármaco en 5 mL de cada solución tamponada durante 24 h bajo agitación (60 rpm). Cuando se utilizaron muestras de Eudragit® RS100, se agregó un 2% de Tween® 80 para facilitar la liberación de los agentes antimicrobianos cargados. Para cada material, cuatro muestras diferentes fueron analizadas independientemente por espectrofotometría UV-Vis, restando la línea de base obtenida utilizando los polímeros no cargados. La cinética de liberación se determinó ajustando los datos experimentales a diferentes modelos matemáticos (Tabla 13, Anexo II).

La liberación *in vitro* del apósito RIF-CIP/RS100 sintetizado en el **Capítulo III**, se realizó sumergiendo 5 mg de material final en 5 mL de PBS con un 2% de Tween® 80 y cada alícuota obtenida se filtró con un filtro CLARIFY-NY de 0.22 µm para su análisis utilizando el equipo UHPLC mencionado previamente. La liberación se analizó en un total de seis muestras independientes.

En el caso de las NPs de PLGA-PEG-biotina_RIF, sintetizadas en el **Capítulo IV**, se dispersaron las muestras a una concentración de 1mg/ mL en PBS. Las muestras fueron analizadas por UV-Vis y se hicieron tres repeticiones de 3 síntesis independientes.

AI.1.4.10 Bicinchoninic Acid (BCA)

La presencia de la avidina y el anticuerpo en las NPs de PLGA_PEG_RIF con anticuerpo sintetizados en el **Capítulo IV** se determinaron indirectamente utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) mediante la recuperación, durante los lavados, de la avidina y del anticuerpo no unidos y realizando un balance de masa. Se prepararon estándares de diferentes concentraciones que variaban desde 0 hasta 2000 µg/mL. La solución de trabajo para los estándares y las muestras desconocidas se prepararon mezclando el reactivo A del kit BCA con el reactivo B del kit BCA en una proporción de 50:1. Se mezclaron 25 µL de cada estándar y muestra desconocida con 200 µL de la solución de trabajo en una placa de microtitulación (Thermo Scientific Pierce 96-Well plate, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y se agitaron durante 30 s. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó a

37 °C durante 30 min. La placa se enfrió a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector de microplacas Synergy HT Multi-Detection (BioTek Instruments, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

AI.1.5 Evaluación biológica

AI.1.5.1 Cultivo de bacterias

Todos los microorganismos se cultivaron colocando una colonia en 4 mL de TSB, incubándolo durante 16 h a 37 °C con agitación continua (150 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (10^9 CFU/mL).

La actividad bactericida de los agentes bacterianos y los apósitos cargados sintetizados en el **Capítulo II** fue evaluada frente a la cepa de *S. aureus* GFP, como modelo de bacteria Gram-positiva, y frente a *E. coli* S17 como modelo de bacteria Gram-negativa.

Por otro lado, la actividad bactericida de los antibióticos libres, el apósito RIF-CIP/RS100 del **Capítulo III** y las NPs de PLGA_PEG_RIF con y sin anticuerpo sintetizadas en el **Capítulo IV**, fueron evaluadas frente a *S. aureus* ATCC 25923 y frente a *E. coli* S17.

AI.1.5.2 Actividad bactericida

Para evaluar la actividad bactericida de los compuestos libres y cargados en los materiales sintetizados, se determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC).

Para llevar a cabo la evaluación, se realizaron dos tipos de incubaciones dependiendo del tipo de material:

1. Para los compuestos libres y las nanopartículas, se incubaron junto con la bacteria (10^5 CFU/mL) seleccionada en medio de cultivo TSB durante 24 h. Después de transcurrido este tiempo se procedió a plaquear para su conteo.
2. Para los apósitos realizados, se incubaron junto con las bacterias seleccionadas en medio de cultivo TSA, siguiendo el método de prueba estándar ASTM E-2180-18²⁹². Este método involucró el corte de las membranas y su colocación en placas de 24 pocillos. Cada pocillo se llenó con 2 mL de TSA inoculado, conteniendo 10^5 CFU/mL de la bacteria seleccionada. Las placas se incubaron en una caja cerrada con agua a 37 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano.

Después de la incubación, cada muestra se transfirió a un falcon y se sometió a sonicación y agitación en vortex para despegar las bacterias. Y se procedió al plaqueo para su conteo.

El conteo celular se realizó utilizando el método de microdilución estándar. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de cada muestra en DPBS, y se sembraron tres gotas de 25 μ L de cada dilución en placas de Petri con TSA estéril. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche para permitir el crecimiento de las colonias bacterianas.

Se llevaron a cabo tres repeticiones del experimento con tres síntesis diferentes, y se incluyeron controles de bacterias no tratadas, de los materiales no cargados y con el disolvente utilizado para cada material. Además, todos los materiales fueron esterilizados mediante exposición a luz UV durante una hora.

AI.1.5.3 Actividad bactericida en cocultivo bacteriano

Para el cocultivo bacteriano realizado en el **Capítulo IV**, las bacterias *S. aureus* y *E. coli* se cultivaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado AI.1.5.1. Posteriormente, se evaluó la selectividad de las nanopartículas PLGA-PEG-RIF o PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo mediante la colocación del mismo volumen de suspensión de ambas bacterias en cada pocillo, junto con las nanopartículas.

Después de la incubación, se llevó a cabo el método de diluciones seriadas²⁹³ descrito anteriormente utilizando medios de cultivo selectivos para cada bacteria. Se empleó agar Columbia CNA suplementado con un 5% de sangre de oveja para el aislamiento y cultivo selectivo de *S. aureus*, mientras que se utilizó agar MacConkey para el aislamiento y cultivo selectivo de *E. coli*. Estos medios de cultivo proporcionaron las condiciones adecuadas para la identificación y cuantificación de las colonias bacterianas presentes en cada muestra.

AI.1.5.4 Ensayo de Susceptibilidad Antimicrobiana en Disco

Para realizar esta evaluación en las fibras cargadas con CHXD en el **Capítulo II** se cortaron discos de diferentes diámetros (12, 16 y 20 mm). Las placas de Petri con agar se inocularon con 300 μ L de una suspensión de cada bacteria (*S. aureus* GFP y *E. coli*) a 10^7 CFU/mL. Las fibras se colocaron en las placas de Petri inoculadas (3 muestras por placa, repitiendo el experimento en 3 placas diferentes) y después de una incubación

durante la noche a 37 °C se midió la zona de inhibición (área sin crecimiento) con un calibre.

AI.1.5.5 Estudio de sinergia mediante la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI)

Las posibles interacciones *in vitro* entre ambos antibióticos utilizados en el **Capítulo IV** (RIF y CIP) se evaluaron mediante el método de tablero de damas (*Checkerboard*)²⁹⁴, que representa gráficamente el comportamiento conjunto de dos compuestos. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, para cada cepa bacteriana (*S. aureus* y *E. coli*) se preparó una solución stock que contenía una concentración igual a cuatro veces la MIC de cada uno de los antibióticos (RIF y CIP). La RIF se diluyó en dirección horizontal y el CIP se diluyó en dirección vertical, haciendo una placa para cada bacteria. Se añadieron 10 µL de cada bacteria (*S. aureus* o *E. coli*) a una concentración de 10⁵ CFU/mL en cada pocillo y se utilizó una placa sin bacterias como control negativo. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se observó la turbidez mediante inspección visual. El ensayo se realizó por triplicado. Los valores de FICI se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$FICI = FIC_{RIF} + FIC_{CIP} \text{ (Eq. 3)}$$

En donde

$$FIC_{RIF} = \frac{MIC_{RIF \text{ en presencia de CIP}}}{MIC_{RIF}} \text{ (Eq. 4)} \quad \text{and} \quad FIC_{CIP} = \frac{MIC_{CIP \text{ en presencia de RIF}}}{MIC_{CIP}} \text{ (Eq. 5)}$$

Tal y como indica el método, cuando el valor de FICI ≤ 0.5, se consideró sinergia, cuando 0.5 < FICI ≤ 4, se consideró indiferente y antagonismo cuando FICI > 4.

AI.1.5.6 Formación y disrupción del biofilm

Se evaluó el efecto de los antibióticos RIF y CIP libres, así como de los apósitos RIF-CIP/RS100 (**Capítulo III**) y las NPs PLGA_PEG_RIF con y sin anticuerpo (**Capítulo IV**) tanto en la inhibición de la formación como en la eliminación de biofilms preformados de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

- Inhibición de formación de biofilms: Las bacterias se diluyeron a una concentración de 10^7 CFU/mL en placas de 24 pocillos. Luego, se expusieron a los agentes antibacterianos y se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación.
- Disrupción de biofilms: Las bacterias se diluyeron a una concentración de 10^7 CFU/mL en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h para permitir la formación de biofilms maduros. Después de este período, se eliminaron las células planctónicas y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar cualquier residuo. A continuación, se añadió el agente antibacteriano, junto con un medio de cultivo fresco, y se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación.

Tras la incubación, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar cualquier célula planctónica restante. Posteriormente, los biofilms resultantes se rompieron mediante sonicación (15 minutos, 200 W; Ultrasons, JP Selecta, Barcelona, España) para contar las bacterias viables (CFU/mL) utilizando el método estándar de diluciones seriadas descrito anteriormente. Se utilizaron bacterias no tratadas y sistemas no cargados como controles experimentales.

Para evaluar el efecto en la inhibición de biofilms, se añadieron nanopartículas a medios de cultivo inoculados con bacterias (10^7 CFU/mL) y las muestras se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación. En el caso del cocultivo, se añadió la misma cantidad de ambas bacterias para lograr una concentración final de 10^7 CFU/mL. Para la siembra de las colonias obtenidas del biofilm del cocultivo, se utilizaron los medios selectivos anteriormente mencionados.

En el **Capítulo IV**, también se realizó el estudio antibiofilm que incluyó un cocultivo de *S. aureus* y *E. coli*. Se agregó la misma cantidad de ambas bacterias para alcanzar una concentración final de 10^7 CFU/mL. Las colonias obtenidas del biofilm del cocultivo se sembraron utilizando los medios selectivos mencionados anteriormente.

Además del conteo celular, en este capítulo, se llevaron a cabo dos metodologías para evaluar el efecto de las nanopartículas de PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo en la prevención de la formación de biofilms y en la disrupción de biofilms preformados.

- **SEM:** Las bacterias se cultivaron para los análisis de inhibición y disrupción de biofilms y se trataron con las nanopartículas como se mencionó anteriormente en placas de 24 pocillos con un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Después del tratamiento, cada lámina se lavó con PBS y se sumergió en 500 μL de paraformaldehído durante la noche. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con agua destilada y etanol al 70% y se dejaron secar al aire. Los cubreobjetos se recubrieron y observaron cómo se mencionó anteriormente en el apartado AI.1.4.3.
- **Microscopía confocal:** *S. aureus*, *E. coli* y el cocultivo de ambas bacterias se cultivaron en placas de vidrio con ocho pocillos revestidos con poli-L-lisina (Ibidi, Alemania) para los análisis de formación y disgregación de biofilms. Las muestras se trataron con NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo durante 24 h, como se describió anteriormente. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron los biofilms con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente, se añadieron 300 μL de paraformaldehído al 4% en PBS a cada pocillo. Después de 45 minutos, se lavó el paraformaldehído dos veces con agua estéril y se añadieron 200 μL de SYTO 9 a una concentración de 1.67 μM y se incubaron durante 30 minutos. Se lavó cada pocillo con agua estéril y se tiñó con 200 μL de Calcofluor White al 0.025% durante 30 minutos para su posterior visualización mediante microscopía confocal (Confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan, Zeiss, Jena, Alemania). También se utilizaron biofilms no tratados y biofilms no teñidos como controles.

AI.1.5.7 Citotoxicidad

El cultivo de células para las pruebas de citotoxicidad se realizó en medio de cultivo Eagle con Dubelcco de alta glucosa (DMEM con glutamina estable, Biowest, Francia) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco, Reino Unido) y una solución de antibiótico-antimicótico al 1% (w/v) (penicilina-estreptomicina-anfotericina B, Biowest, Francia) a 37°C y 5% de CO₂. Para determinar la citocompatibilidad de los materiales del **Capítulo II** y **IV**, se utilizaron macrófagos J774 ATCC-TIB-67, mientras que para el **Capítulo III** para determinar la citotoxicidad del

apósito RIF-CIP/RS100, además de los macrófagos se emplearon HaCat y fibroblastos dérmicos humanos como modelos de líneas celulares humanas.

La citocompatibilidad se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular Cell Blue® Viability Assay Kit, el cual mide el metabolismo celular asociado con la viabilidad celular.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos para los apósitos y de 96 pocillos para los compuestos libres y nanopartículas (18,000 células/cm²), y se adicionaron los materiales a probar. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS. Luego, se incubaron las células con el reactivo celular Blue® (10% (v/v) en DMEM suplementado) y se incubaron durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂. Se midió la fluorescencia en longitudes de onda de excitación/emisión de 530/590 nm en un lector de microplacas Varioskan LUX microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, USA).

La evaluación del efecto citotóxico se realizó mediante la comparación de los valores de fluorescencia entre las células tratadas y las células no tratadas (utilizadas como control y representando una viabilidad del 100%). Cada concentración fue analizada en cuatro réplicas y se realizaron tres repeticiones independientes del experimento.

AI.1.5.8 Modelo de infección

Para evaluar la eficacia de las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo del **Capítulo IV** en una infección intracelular provocada por *S. aureus*, *E. coli* o ambas bacterias, se llevó a cabo un protocolo previamente reportado²⁹⁵. Las NPs PLGA-PEG-RIF y PLGA-PEG-RIF-Anticuerpo, se añadieron a las células sembradas en placas de microtitulación de 24 pocillos (18,000 células/cm²) a la concentración bactericida determinada previamente para las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo (0.2 µg/mL) 20 h antes de la infección. Posteriormente, los macrófagos fueron infectados con *S. aureus* a una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1, mientras que la infección por *E. coli* se indujo por separado mediante la adición de una MOI de 8:1²⁹⁵. También se realizaron pruebas con cocultivo de *S. aureus* y *E. coli* mediante la adición de ambas bacterias a las mismas MOI utilizadas por separado (20:8:1). Como control se utilizaron muestras no tratadas y no infectadas. Después de la infección, las placas se

centrifugaron a 200 *g* durante 5 minutos y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células fueron sometidas a lavados con PBS y se trataron con una solución de 100 µg/mL de sulfato de gentamicina durante 1 hora a 37 °C, con el fin de eliminar las bacterias no internalizadas. Posteriormente, se incubó con 250 µL Triton X-100 (0.5%) durante 15 min para lisar la membrana celular y obtener las bacterias intracelulares. Las suspensiones finales se diluyeron en PBS y se sembraron siguiendo el método de diluciones seriadas²⁹³ en agar TSA y para el cocultivo en los medios de cultivo diferenciales antes mencionados.

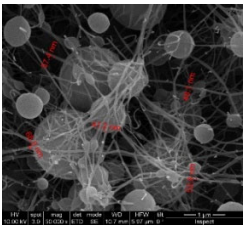
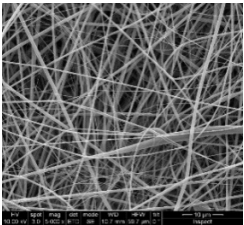
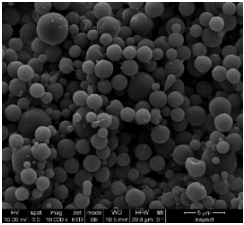
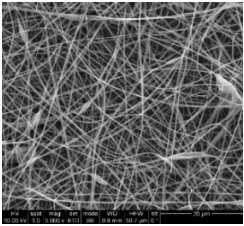
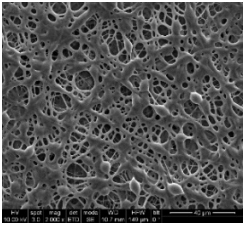
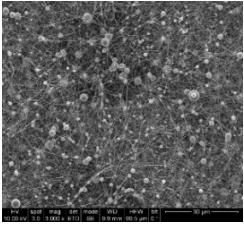
A su vez, la viabilidad de los macrófagos después de la infección se evaluó mediante microscopía confocal utilizando el kit de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead para células de mamíferos (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA). Se realizaron pruebas de viabilidad para asegurar que se utilizaran las MOIs adecuadas en el modelo de infección con las nanopartículas descritas. Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos y luego se infectaron como se describió anteriormente. Después, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió una solución que contenía 20 µL de una solución madre 2 mM de etidio homodímero-1 (EthD) y 5 µL de una solución 4 mM de calceína AM. Después de 15 minutos de incubación a 37 °C, las muestras se analizaron mediante microscopía confocal (microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP2, Wetzlar, Alemania).

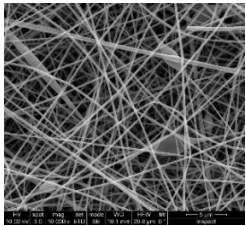
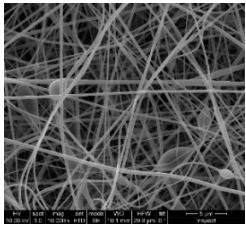
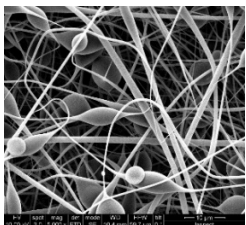
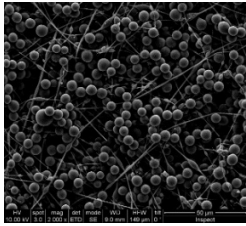
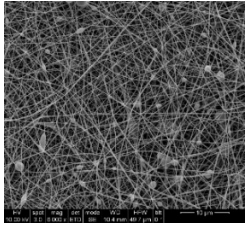
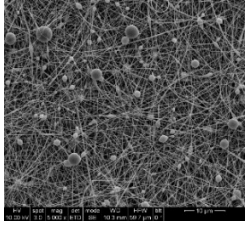
AI.1.6 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como media ± desviación estándar (DE). Los experimentos celulares se analizaron utilizando análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con el software GraphPad Prism 9 (San Diego, USA). Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor de $p \leq 0.05$.

Anexo II

Tabla 12. Pruebas de síntesis mediante la modificación de diferentes variables para identificar los valores óptimos de deposición de las fibras que conforman los apósitos finales

Eudragit	Parámetros	Desventajas	Imágenes SEM
L100-55	Polímero: 15% Fármaco: --- Disolvente: DMF:EtOH Distancia: 18.5 cm Flujo: 1 mL/h Voltaje: -3.2/ 13.1 kV	*Formación de partículas	
	Polímero: 30% Fármaco: 5% RIF Disolvente: DMF:EtOH Distancia: 18.5 cm Flujo: 1mL/h Voltaje: -3.9/ 13.8 kV	*Formación de beads *Solución más viscosa	
S100	Polímero: 15% Fármaco: --- Disolvente: CHCl ₃ Distancia: 18.5 cm Flujo: 1 mL/h Voltaje: -4.1 / 15.9 kV	*Formación de partículas	
	Polímero: 30% Fármaco: 5% RIF Disolvente: DMF:EtOH Distancia: 18.5 cm Flujo: 1 mL/h Voltaje: -3.6/ 25.3 kV	*Voltaje muy alto *Formación de beads en fibras	
	Polímero: 30% Fármaco: 20% THY Disolvente: CHCl ₃ Distancia: 15 cm Flujo: 1 mL/h Voltaje: -3.8/ 11.2 kV	*Polímero fundido	
	Polímero: 30% Fármaco: 10% CHXD Disolvente: DMF:EtOH Distancia: 18.5 cm Flujo: 1mL/h Voltaje: -3.5/ 12.5 kV	*Formación de partículas y fibras	

RS100	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 0.5 mL/h</p> <p>Voltaje: -3.6/ 14.9 kV</p>	<p>*Cono de Taylor inestable</p> <p>*Polímero seco en la punta</p> <p>*Formación de beads</p>	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 18.5 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h</p> <p>Voltaje: - 3.2 / 13.6 kV</p>	<p>*Cono de Taylor inestable</p> <p>*Polímero seco en la punta</p> <p>*Formación de beads</p>	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h (Coaxial 0.1mL/h)</p> <p>Voltaje: -3.2/ 15.6 kV</p>	<p>*Polímero seco en la punta</p> <p>*Formación de beads</p>	
	<p>Polímero: 20%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1mL/h</p> <p>Voltaje: -3.1 / 10.68 kV</p>	<p>*Formación de partículas</p>	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: DMF:EtOH</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h</p> <p>Voltaje: -3.63 /18.92 kV</p>	<p>*Formación de beads</p> <p>*Cono de Taylor inestable</p>	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: 2.5% RIF</p> <p>Disolvente: DMF:EtOH</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1mL/h</p> <p>Voltaje: -2.95/18.02 kV</p>	<p>*Formación de beads</p> <p>*Cono de Taylor inestable</p>	

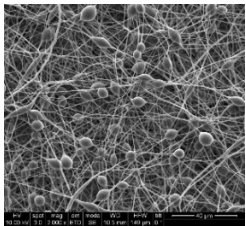
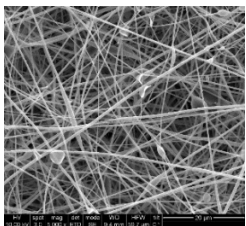

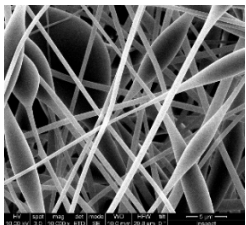
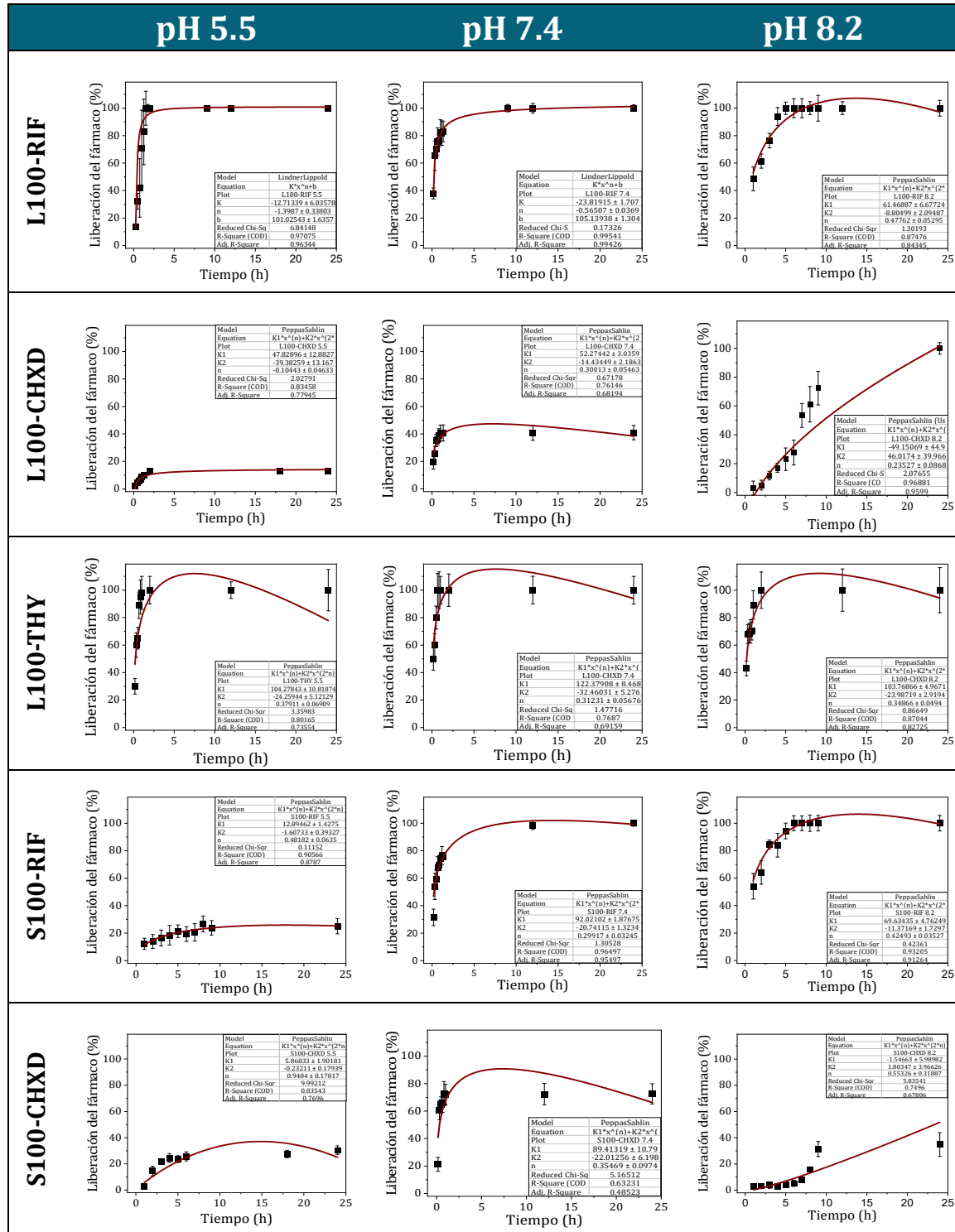
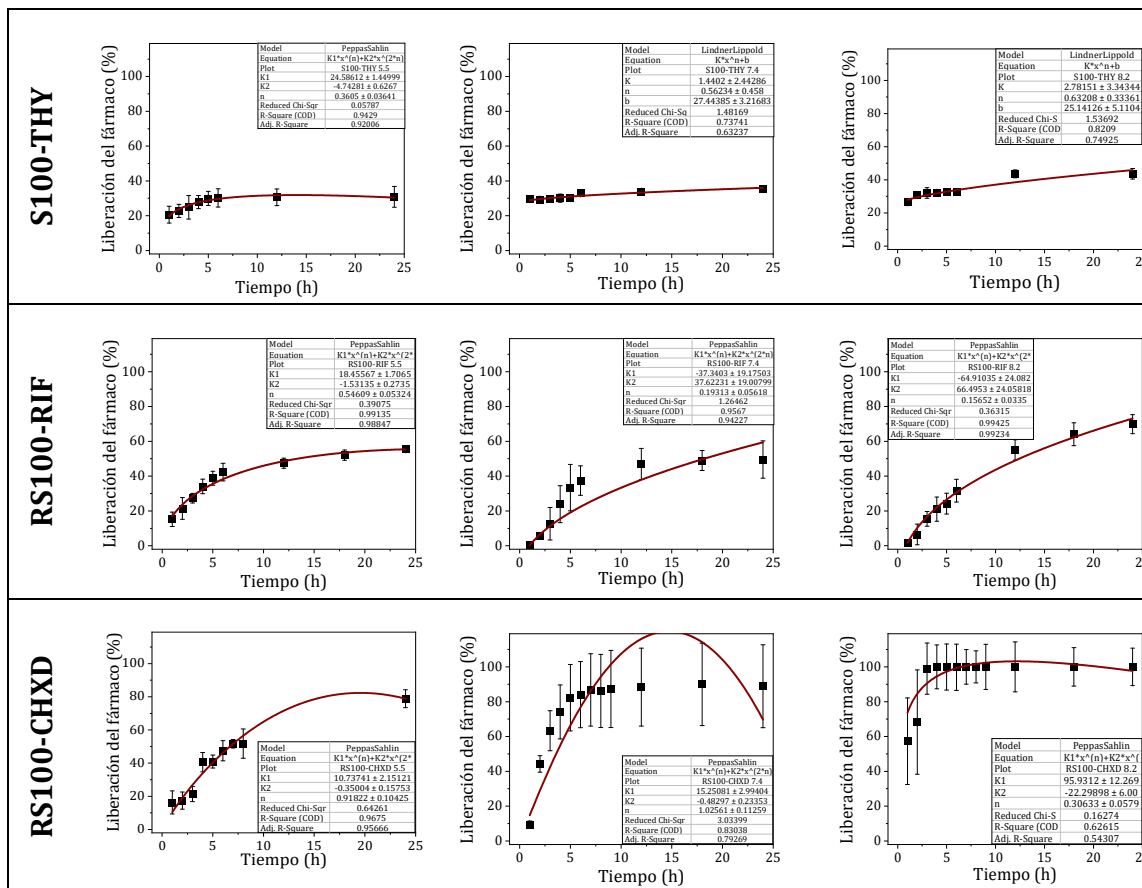
RS100	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: 10% THY</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 18.5 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h (Coaxial 0.3mL/h)</p> <p>Voltaje: -3.4/ 17.6 kV</p>	*Formación de beads	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: 5% CHXD</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h (Coaxial 0.4mL/h)</p> <p>Voltaje: -3.2 / 13.2 kV</p>	*Sales de CHXD entre fibras	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 15 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h (Coaxial 0.5mL/h)</p> <p>Voltaje: -2.9/13.4 kV</p>	*Formación de beads	
	<p>Polímero: 30%</p> <p>Fármaco: ---</p> <p>Disolvente: CHCl₃</p> <p>Distancia: 10 cm</p> <p>Flujo: 1 mL/h (Coaxial 0.2mL/h)</p> <p>Voltaje: -3.4/ 12.9 kV</p>	*Formación de beads	

Tabla 13. Cinéticas de liberación de los apósitos cargados con RIF, CHXD y THY a diferentes valores de pH





Anexo III

AIII.1 Publicaciones

Landa, G.; Miranda-Calderon, L.; Sebastian, V.; Irusta, S.; Mendoza, G.; Arruebo, M. Selective point-of-care detection of pathogenic bacteria using sialic acid functionalized gold nanoparticles. *Talanta* 2021, 234, p.122644. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122644. IF= 6.1

Miranda-Calderon L.; Yus C.; Landa G.; Mendoza G.; Arruebo M.; Irusta S. Pharmacokinetic control on the release of antimicrobial drugs from pH-responsive electrospun wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics* 2022, pp. 624:122003. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.122003. IF= 5.8

Miranda-Calderon, L.; Alejo, T.; Santos, S.; Mendoza, G.; Irusta, S.; Arruebo, M. Antibody-Functionalized Polymer Nanoparticles for Targeted Antibiotic Delivery in Models of Pathogenic Bacteria Infecting Human Macrophages. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2023. DOI:10.1021/acsami.3c07367. IF= 9.5

Miranda-Calderon, L.; Yus, C.; Ramirez de Ganuza, C.; Paesa, M.; Landa, G.; Tapia, E.; Lujan, L.; Perez, M.; Sebastian, V.; Arruebo, M.; Mendoza, G.; Irusta S. Combinatorial wound dressings loaded with synergistic antibiotics in the treatment of chronic infected wounds. (En revisión por *Chemical Engineering Journal*)

Landa, G.; Miranda-Calderon, L.; Gomez, A.; Perez, M.; Sebastian, V.; Arruebo, M.; Lamarche, I.; Tewes, F.; Irusta, S.; Mendoza, G. Real-time in vivo monitoring of the antimicrobial action of combination therapies in the management of infected topical wounds. (En revisión por *International Journal of Pharmaceutics*)

AIII.2 Congresos

XXXIX Reunión Bienal de la Sociedad Española de Química, Zaragoza, España (Junio 25-29, 2023). Poster: "Synthesis of polymer nanoparticles functionalized with antibodies for drug delivery in intracellular infections"

II Encuentro de Investigadores Predoctorales en Biomedicina, (Junio 2, 2023). Poster: "Synthesis of polymeric nanoparticles functionalized with antibodies for targeted drug delivery in intracellular pathogenic infections".

I Encuentro de Investigadores Predoctorales en Biomedicina, Zaragoza, España (Mayo 31, 2022). Poster: "Desarrollo de nuevos sistemas poliméricos de liberación de agentes terapéuticos para prevenir infecciones crónicas".

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Lisboa, Portugal (Abril 23-26, 2022). Poster: "Evaluation of fibre-particle hybrid material based a commercial antimicrobial controlled-release system".

XIV Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, Tenerife, España. (Enero 26-28, 2022). Poster: "Evaluation of Eudragit s100 nanofibers as pH responsive antimicrobial release system".

XXII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica, La Plata, Argentina. (Abril 19-29, 2021). Poster: "Influencia del pH en nanofibras de Eudragit l100-55 cargado con agentes terapéuticos para su evaluación como sistema de liberación controlada".

1er Congreso Internacional de Educación Química-en línea: la enseñanza de la Química y los retos de los Objetivos del Desarrollo Sostenible. (Noviembre 12-14, 2020). Asistente.

II Congreso Internacional de NanoBioIngeniería, Foro Virtual del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (Octubre 24-30, 2020). Asistente.

REFERENCIAS

- (1) Clark, R. A. F.; Ghosh, K.; Tonnesen, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *J Invest Dermatol* **2007**, *127* (5), 1018–1029. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700715>.
- (2) Guarín-Corredor¹, C.; Quiroga-Santamaría¹, P.; Stella, N.; Msc², L.-P.; Resumen, J. Proceso de Cicatrización de Heridas de Piel, Campos Endógenos y Su Relación Con Las Heridas Crónicas Wound Healing Process of Skin, Endogenous Fields Related and Chronic Wounds.
- (3) Li, D.; Wu, N. Mechanism and Application of Exosomes in the Wound Healing Process in Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **2022**, *187*, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109882>.
- (4) Kirsner, R. S.; Eaglstein, W. H. The Wound Healing Process. *Dermatol Clin* **1993**, *11* (4), 629–640. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(18\)30216-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(18)30216-X).
- (5) Zhao, R.; Liang, H.; Clarke, E.; Jackson, C.; Xue, M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* **2016**, *17* (12). <https://doi.org/10.3390/IJMS17122085>.
- (6) Falanga, V.; Isseroff, R. R.; Soulika, A. M.; Romanelli, M.; Margolis, D.; Kapp, S.; Granick, M.; Harding, K. Chronic Wounds. *Nature Reviews Disease Primers* **2022**, *8* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00377-3>.
- (7) Rahim, K.; Saleha, S.; Zhu, X.; Huo, L.; Basit, A.; Franco, O. L. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol* **2017**, *73* (3), 710–721. <https://doi.org/10.1007/S00248-016-0867-9/METRICS>.
- (8) Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B. B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J. C. N.; Mbanya, J. C.; Pavkov, M. E.; Ramachandaran, A.; Wild, S. H.; James, S.; Herman, W. H.; Zhang, P.; Bommer, C.; Kuo, S.; Boyko, E. J.; Magliano, D. J. IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* **2022**, *183*. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2021.109119>.
- (9) Homaeigohar, S.; Boccaccini, A. R. Antibacterial Biohybrid Nanofibers for Wound Dressings. *Acta Biomater* **2020**, *107*, 25–49. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.02.022>.
- (10) Powers, J. G.; Higham, C.; Broussard, K.; Phillips, T. J. Wound Healing and Treating Wounds: Chronic Wound Care and Management. *J Am Acad Dermatol* **2016**, *74* (4), 607–625. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2015.08.070>.
- (11) Schneider, L. A.; Korber, A.; Grabbe, S.; Dissemmond, J. Influence of PH on Wound-Healing: A New Perspective for Wound-Therapy? *Arch Dermatol Res* **2007**, *298* (9), 413–420. <https://doi.org/10.1007/S00403-006-0713-X>.
- (12) Metcalf, D. G.; Haalboom, M.; Bowler, P. G.; Gamerith, C.; Sigl, E.; Heinzle, A.; Burnet, M. W. M. Elevated Wound Fluid PH Correlates with Increased Risk of Wound Infection. *Wound Medicine* **2019**, *26* (1), 100166. <https://doi.org/10.1016/J.WNDM.2019.100166>.

- (13) Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural Skin Surface PH Is on Average below 5, Which Is Beneficial for Its Resident Flora. *Int J Cosmet Sci* **2006**, *28* (5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/J.1467-2494.2006.00344.X>.
- (14) Hunt, T. K.; Twomey, P.; Zederfeldt, B.; Dunphy, J. E. Respiratory Gas Tensions and PH in Healing Wounds. *Am J Surg* **1967**, *114* (2), 302–307. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(67\)90388-1](https://doi.org/10.1016/0002-9610(67)90388-1).
- (15) Kurabayashi, H.; Tamura, K.; Machida, I.; Kubota, K. Inhibiting Bacteria and Skin PH in Hemiplegia: Effects of Washing Hands with Acidic Mineral Water. *Am J Phys Med Rehabil* **2002**, *81* (1), 40–46. <https://doi.org/10.1097/00002060-200201000-00007>.
- (16) Percival, S. L.; McCarty, S.; Hunt, J. A.; Woods, E. J. The Effects of PH on Wound Healing, Biofilms, and Antimicrobial Efficacy. *Wound Repair Regen* **2014**, *22* (2), 174–186. <https://doi.org/10.1111/WRR.12125>.
- (17) Ono, S.; Imai, R.; Ida, Y.; Shibata, D.; Komiya, T.; Matsumura, H. Increased Wound PH as an Indicator of Local Wound Infection in Second Degree Burns. *Burns* **2015**, *41* (4), 820–824. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2014.10.023>.
- (18) Lengheden, A.; Jansson, L. PH Effects on Experimental Wound Healing of Human Fibroblasts in Vitro. *Eur J Oral Sci* **1995**, *103* (3), 148–155. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1995.TB00016.X>.
- (19) Shukla, V. K.; Shukla, D.; Tiwary, S. K.; Agrawal, S.; Rastogi, A. Evaluation of PH Measurement as a Method of Wound Assessment. *J Wound Care* **2007**, *16* (7), 291–294. <https://doi.org/10.12968/JOWC.2007.16.7.27062>.
- (20) *The pH of varicose ulcer surfaces and its relationship to healing - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/44410/> (accessed 2023-04-24).
- (21) Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural Skin Surface PH Is on Average below 5, Which Is Beneficial for Its Resident Flora. *Int J Cosmet Sci* **2006**, *28* (5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/J.1467-2494.2006.00344.X>.
- (22) Sim, P.; Strudwick, X. L.; Song, Y. M.; Cowin, A. J.; Garg, S. Influence of Acidic PH on Wound Healing In Vivo: A Novel Perspective for Wound Treatment. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (21). <https://doi.org/10.3390/IJMS232113655>.
- (23) Han, G.; Ceilley, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther* **2017**, *34* (3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/S12325-017-0478-Y>.
- (24) Trengove, N. J.; Stacey, M. C.; McGeachie, D. F.; Mata, S. Qualitative Bacteriology and Leg Ulcer Healing. <https://doi.org/10.12968/jowc.1996.5.6.277> **2016**, *5* (6), 277–280. <https://doi.org/10.12968/JOWC.1996.5.6.277>.
- (25) Cutting, K. F.; Harding, K. G. Criteria for Identifying Wound Infection. *J Wound Care* **1994**, *3* (4), 198–201. <https://doi.org/10.12968/JOWC.1994.3.4.198>.

- (26) Mihai, M. M.; Preda, M.; Lungu, I.; Gestal, M. C.; Popa, M. I.; Holban, A. M. Nanocoatings for Chronic Wound Repair—Modulation of Microbial Colonization and Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 1179 **2018**, 19 (4), 1179. <https://doi.org/10.3390/IJMS19041179>.
- (27) Siddiqui, A. R.; Bernstein, J. M. Chronic Wound Infection: Facts and Controversies. *Clin Dermatol* **2010**, 28 (5), 519–526. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2010.03.009>.
- (28) *Evolution of the wound infection continuum - Wounds International*. <https://www.woundsinternational.com/resources/details/evolution-wound-infection-continuum1> (accessed 2023-04-25).
- (29) Percival, S. L.; McCarty, S. M.; Lipsky, B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2015**, 4 (7), 373. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2014.0557>.
- (30) Karygianni, L.; Ren, Z.; Koo, H.; Thurnheer, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol* **2020**, 28 (8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.03.016>.
- (31) Davis, S. C.; Ricotti, C.; Cazzaniga, A.; Welsh, E.; Eaglstein, W. H.; Mertz, P. M. Microscopic and Physiologic Evidence for Biofilm-Associated Wound Colonization in Vivo. *Wound Repair Regen* **2008**, 16 (1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/J.1524-475X.2007.00303.X>.
- (32) Oliveira, M. M. M. de; Brugnera, D. F.; Cardoso, M. das G.; Alves, E.; Piccoli, R. H. Disinfectant Action of Cymbopogon Sp. Essential Oils in Different Phases of Biofilm Formation by *Listeria Monocytogenes* on Stainless Steel Surface. *Food Control* **2010**, 21 (4), 549–553. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2009.08.003>.
- (33) O’Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol* **2000**, 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.54.1.49>.
- (34) Gordon, V.; Bakhtiari, L.; Kovach, K.; Billings, N.; Birjiniuk, A.; Samad, T. S.; Lambert, G.; Bergman, A.; Zhang, Q.; Bortz, D.; Austin, R. Physics of Biofilms: The Initial Stages of Biofilm Formation and Dynamics You May Also like From Molecules to Multispecies Ecosystems: The Roles of Structure in Bacterial Biofilms Material Properties of Biofilms-a Review of Methods for Understanding Permeability and Mechanics Physics of Biofilms: The Initial Stages of Biofilm Formation and Dynamics. *New J Phys* **2014**, 16, 45005. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/4/045005>.
- (35) Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D. M.; Hall-Stoodley, L.; Burmølle, M.; Stewart, P. S.; Bjarnsholt, T. The Biofilm Life Cycle: Expanding the Conceptual Model of Biofilm Formation. *Nature Reviews Microbiology* 2022 20:10 **2022**, 20 (10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- (36) Leaper, D.; Assadian, O.; Edmiston, C. E. Approach to Chronic Wound Infections. *Br J Dermatol* **2015**, 173 (2), 351–358. <https://doi.org/10.1111/BJD.13677>.

- (37) Swanson, J.; Kalan; Lindsay; Keast; David, D. J.; Schultz, G.; Black, J.; Call, E. Wound Infection in Clinical Practice : Principles of Best Practice Original Citation.
- (38) Buffo, J.; Herman, M. A.; Soll, D. R. 9 Dr W. Junk Publishers, The Hague. *Mycopathologia* **1984**, *85*, 21–30.
- (39) Peters, B. M.; Jabra-Rizk, M. A.; Scheper, M. A.; Leid, J. G.; Costerton, J. W.; Shirtliff, M. E. Microbial Interactions and Differential Protein Expression in Staphylococcus Aureus – Candida Albicans Dual-Species Biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2010**, *59* (3), 493. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2010.00710.X>.
- (40) Church, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B.; Lindsay, R. Burn Wound Infections. *Clin Microbiol Rev* **2006**, *19* (2), 403–434. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.403-434.2006>.
- (41) Krumkamp, R.; Oppong, K.; Hogan, B.; Strauss, R.; Frickmann, H.; Wiafe-Akten, C.; Boahen, K. G.; Rickerts, V.; Smith, I. M. C.; Groß, U.; Schulze, M.; Jaeger, A.; Loderstädt, U.; Sarpong, N.; Owusu-Dabo, E.; May, J.; Dekker, D. Spectrum of Antibiotic Resistant Bacteria and Fungi Isolated from Chronically Infected Wounds in a Rural District Hospital in Ghana. *PLoS One* **2020**, *15* (8), e0237263. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237263>.
- (42) Dana, A. N.; Bauman, W. A. Bacteriology of Pressure Ulcers in Individuals with Spinal Cord Injury: What We Know and What We Should Know. *J Spinal Cord Med* **2015**, *38* (2), 147–160. <https://doi.org/10.1179/2045772314Y.0000000234>.
- (43) Price, C. E.; Brown, D. G.; Limoli, D. H.; Phelan, V. V.; O’Toole, G. A. Exogenous Alginate Protects Staphylococcus Aureus from Killing by Pseudomonas Aeruginosa. *J Bacteriol* **2020**, *202* (8). <https://doi.org/10.1128/JB.00559-19>.
- (44) Grice, E. A.; Segre, J. A. Interaction of Microbiome and the Innate Immune Response in Chronic Wounds. *Adv Exp Med Biol* **2012**, *946*, 55. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_4.
- (45) Zheng, D.; Liwinski, T.; Elinav, E. Interaction between Microbiota and Immunity in Health and Disease. *Cell Research 2020 30:6* **2020**, *30* (6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>.
- (46) Verbanic, S.; Shen, Y.; Lee, J.; Deacon, J. M.; Chen, I. A. Microbial Predictors of Healing and Short-Term Effect of Debridement on the Microbiome of Chronic Wounds. *npj Biofilms and Microbiomes 2020 6:1* **2020**, *6* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0130-5>.
- (47) Bessa, L. J.; Fazii, P.; Di Giulio, M.; Cellini, L. Bacterial Isolates from Infected Wounds and Their Antibiotic Susceptibility Pattern: Some Remarks about Wound Infection. *Int Wound J* **2015**, *12* (1), 47–52. <https://doi.org/10.1111/IWJ.12049>.
- (48) Olszewski, W. L. Role of Bacteria in Pathogenesis of Lower Leg Ulcers. *Ulcers of the Lower Extremity* **2016**, 125–140. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2635-2_9/COVER.
- (49) Maksimova, Y. G. Microbial Biofilms in Biotechnological Processes. *Appl Biochem Microbiol* **2014**, *50* (8), 750–760. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080043/METRICS>.

- (50) EVANS, C. A.; SMITH, W. M.; JOHNSTON, E. A.; GIBLETT, E. R. Bacterial Flora of the Normal Human Skin. *J Invest Dermatol* **1950**, *15* (4), 305–324. <https://doi.org/10.1038/JID.1950.105>.
- (51) Liu, C.; Ponsero, A. J.; Armstrong, D. G.; Lipsky, B. A.; Hurwitz, B. L. The Dynamic Wound Microbiome. *BMC Med* **2020**, *18* (1). <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01820-6>.
- (52) Stewart, E. J. Growing Unculturable Bacteria. *J Bacteriol* **2012**, *194* (16), 4151. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>.
- (53) Hassan, M.; Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Lotfipour, F. Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance. *J Appl Microbiol* **2012**, *113* (4), 723–736. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05338.X>.
- (54) Savage, V. J.; Chopra, I.; O'Neill, A. J. Staphylococcus Aureus Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57* (4), 1968. <https://doi.org/10.1128/AAC.02008-12>.
- (55) Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. Antibiotic Resistance. *J Infect Public Health* **2017**, *10* (4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2016.08.007>.
- (56) *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed 2023-04-24).
- (57) C Reygaert, W. An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiol* **2018**, *4* (3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>.
- (58) Gupta, A.; Mumtaz, S.; Li, C. H.; Hussain, I.; Rotello, V. M. Combatting Antibiotic-Resistant Bacteria Using Nanomaterials. *Chem Soc Rev* **2019**, *48* (2), 415. <https://doi.org/10.1039/C7CS00748E>.
- (59) J, Z.; MF, V.; MB, M.; N, M.; U, Q.; Y, S.; LM, W.; EB, H.; EB, B.; G, L. Chronic Venous Ulcers: A Comparative Effectiveness Review of Treatment Modalities. *Chronic Venous Ulcers: A Comparative Effectiveness Review of Treatment Modalities* **2014**.
- (60) *Black's Student Medical Dictionary: : Harvey Marcovitch: Bloomsbury Information*. <https://www.bloomsbury.com/us/blacks-student-medical-dictionary-9781472975904/> (accessed 2023-04-24).
- (61) Romero-Collado, Á.; Verdú-Soriano, J.; Homs-Romero, E.; Romero-Collado, Á.; Verdú-Soriano, J.; Homs-Romero, E. Recomendaciones Del Uso de Antimicrobianos En Heridas Crónicas. *Gerokomos* **2022**, *33* (2), 111–118.
- (62) Echols, K.; Graves, M.; LeBlanc, K. G.; Marzolf, S.; Yount, A. Role of Antiseptics in the Prevention of Surgical Site Infections. *Dermatol Surg* **2015**, *41* (6), 667–676. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000375>.
- (63) Steinsapir, K. D.; Woodward, J. A. Chlorhexidine Keratitis: Safety of Chlorhexidine as a Facial Antiseptic. *Dermatol Surg* **2017**, *43* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000822>.

- (64) Verma, U. P.; Gupta, A.; Yadav, R. K.; Tiwari, R.; Sharma, R.; Balapure, A. K. Cytotoxicity of Chlorhexidine and Neem Extract on Cultured Human Gingival Fibroblasts through Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis : An in-Vitro Study. *Eur J Dent* **2018**, *12* (3), 344–349. https://doi.org/10.4103/EJD.EJD_149_17.
- (65) LOWBURY, E. J. Chlorhexidine. *Practitioner* **2016**, *179* (1072), 239–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00474-1>.
- (66) Alves, P. J.; Gryson, L.; Hajjar, J.; Lepelletier, D.; Reners, M.; Rodríguez Salazar, J.; Simon, A. Role of Antiseptics in the Prevention and Treatment of Infections in Nursing Homes. *J Hosp Infect* **2023**, *131*, 58–69. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2022.09.021>.
- (67) Razdan, K.; Garcia-Lara, J.; Sinha, V. R.; Singh, K. K. Pharmaceutical Strategies for the Treatment of Bacterial Biofilms in Chronic Wounds. *Drug Discov Today* **2022**, *27* (8), 2137–2150. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2022.04.020>.
- (68) Seabrook, G. R.; Edmiston, C. E.; Schmitt, D. D.; Krepel, C.; Bandyk, D. F.; Towne, J. B. Comparison of Serum and Tissue Antibiotic Levels in Diabetes-Related Foot Infections. *Surgery* **1991**, *110* (4), 671–676; discussion 676.
- (69) Razdan, K.; Sinha, V. R.; Singh, K. K. New Paradigms in the Treatment of Skin Infections: Lipid Nanocarriers to the Rescue. *Nanomedicine for Bioactives: Healthcare applications* **2020**, 317–339. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1664-1_11.
- (70) Lipsky, B. A.; Hoey, C. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds. <https://doi.org/10.1086/644732>.
- (71) Frank, C.; Bayoumi, I.; Westendorp, C. Approach to Infected Skin Ulcers. *Canadian Family Physician* **2005**, *51* (10), 1352.
- (72) Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **2017**, *33* (3), 300–305. https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP_349_15.
- (73) *Antibiotics: Volume I Mechanism of Action - David Gottlieb, Paul Dale Shaw - Google Libros*. https://books.google.es/books/about/Antibiotics.html?id=Gm4iswEACAAJ&redir_esc=y (accessed 2023-04-24).
- (74) Strathdee, S. A.; Davies, S. C.; Marcelin, J. R. Confronting Antimicrobial Resistance beyond the COVID-19 Pandemic and the 2020 US Election. *Lancet* **2020**, *396* (10257), 1050. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32063-8).
- (75) Oluwole, D. O.; Coleman, L.; Buchanan, W.; Chen, T.; La Ragione, R. M.; Liu, L. X. Antibiotics-Free Compounds for Chronic Wound Healing. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (5). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14051021>.
- (76) Plumet, L.; Ahmad-Mansour, N.; Dunyach-Remy, C.; Kissa, K.; Sotto, A.; Lavigne, J. P.; Costechareyre, D.; Molle, V. Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *12*, 907314. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.907314/BIBTEX>.

- (77) Melo, R. S.; Azevedo, Á. M. A.; Pereira, A. M. G.; Rocha, R. R.; Cavalcante, R. M. B.; Matos, M. N. C.; Lopes, P. H. R.; Gomes, G. A.; Rodrigues, T. H. S.; Dos Santos, H. S.; Ponte, I. L.; Costa, R. A.; Brito, G. S.; Catunda, F. E. A.; Carneiro, V. A. Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum Gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Molecules* **2019**, *24* (21). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24213864>.
- (78) Chukwuma, I. F.; Uchendu, N. O.; Asomadu, R. O.; Ezeorba, W. F. C.; Ezeorba, T. P. C. African and Holy Basil - a Review of Ethnobotany, Phytochemistry, and Toxicity of Their Essential Oil: Current Trends and Prospects for Antimicrobial/Anti-Parasitic Pharmacology. *Arabian Journal of Chemistry* **2023**, *16* (7), 104870. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2023.104870>.
- (79) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils--a Review. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46* (2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.09.106>.
- (80) Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science* **2006**, *311* (5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1118510>.
- (81) Topa, S. H.; Subramoni, S.; Palombo, E. A.; Kingshott, P.; Rice, S. A.; Blackall, L. L. Cinnamaldehyde Disrupts Biofilm Formation and Swarming Motility of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* **2018**, *164* (9), 1087–1097. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000692>.
- (82) Garcia-Salinas, S.; Gámez, E.; Landa, G.; Arruebo, M.; Irusta, S.; Mendoza, G. Antimicrobial Wound Dressings against Fluorescent and Methicillin-Sensitive Intracellular Pathogenic Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces* **2020**, *12* (46), 51302–51313. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C17043>.
- (83) Pires, A. L. R.; de Azevedo Motta, L.; Dias, A. M. A.; de Sousa, H. C.; Moraes, Â. M.; Braga, M. E. M. Towards Wound Dressings with Improved Properties: Effects of Poly(Dimethylsiloxane) on Chitosan-Alginate Films Loaded with Thymol and Beta-Carotene. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *93*, 595–605. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.08.005>.
- (84) García-Salinas, S.; Evangelopoulos, M.; Gámez-Herrera, E.; Arruebo, M.; Irusta, S.; Taraballi, F.; Mendoza, G.; Tasciotti, E. Electrospun Anti-Inflammatory Patch Loaded with Essential Oils for Wound Healing. *Int J Pharm* **2020**, *577*. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119067>.
- (85) Gheorghita, D.; Grosu, E.; Robu, A.; Ditu, L. M.; Deleanu, I. M.; Gradisteanu Pircalabioru, G.; Raiciu, A. D.; Bitu, A. I.; Antoniac, A.; Antoniac, V. I. Essential Oils as Antimicrobial Active Substances in Wound Dressings. *Materials (Basel)* **2022**, *15* (19). <https://doi.org/10.3390/MA15196923>.
- (86) Wińska, K.; Mączka, W.; Łyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czubaszek, A.; Szumny, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* **2019**, *24* (11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112130>.

- (87) Muthukrishnan, L. An Overview on Electrospinning and Its Advancement toward Hard and Soft Tissue Engineering Applications. *Colloid Polym Sci* **2022**, *300* (8). <https://doi.org/10.1007/S00396-022-04997-9>.
- (88) Bao, G.; Mitragotri, S.; Tong, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annu Rev Biomed Eng* **2013**, *15*, 253–282. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071812-152409>.
- (89) Borm, P. J. A.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, K.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D. B.; Oberdorster, E. The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* **2006**, *3* (1), 1–35. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-11>.
- (90) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/S41573-020-0090-8>.
- (91) Holloway, S.; Harding, K. G. Wound Dressings. *Surgery (Oxford)* **2022**, *40* (1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2021.11.002>.
- (92) Adamu, B. F.; Gao, J.; Jhatial, A. K.; Kumelachew, D. M. A Review of Medicinal Plant-Based Bioactive Electrospun Nano Fibrous Wound Dressings. *Mater Des* **2021**, *209*. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2021.109942>.
- (93) Broussard, K. C.; Powers, J. G. Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. *Am J Clin Dermatol* **2013**, *14* (6), 449–459. <https://doi.org/10.1007/S40257-013-0046-4>.
- (94) Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *J Adv Res* **2015**, *6* (2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2013.07.006>.
- (95) Ezzelarab, M. H.; Nouh, O.; Ahmed, A. N.; Anany, M. G.; Rachidi, N. G. El; Salem, A. S. A Randomized Control Trial Comparing Transparent Film Dressings and Conventional Occlusive Dressings for Elective Surgical Procedures. *Open Access Maced J Med Sci* **2019**, *7* (17), 2844. <https://doi.org/10.3889/OAMJMS.2019.809>.
- (96) Dhivya, S.; Padma, V. V.; Santhini, E. Wound Dressings – a Review. *Biomedicine (Taipei)* **2015**, *5* (4), 24–28. <https://doi.org/10.7603/S40681-015-0022-9>.
- (97) Ramos-E-Silva, M.; Ribeiro de Castro, M. C. New Dressings, Including Tissue-Engineered Living Skin. *Clin Dermatol* **2002**, *20* (6), 715–723. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(02\)00298-5](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(02)00298-5).
- (98) Martin, L.; Wilson, C. G.; Koosha, F.; Tetley, L.; Gray, A. I.; Senel, S.; Uchegbu, I. F. The Release of Model Macromolecules May Be Controlled by the Hydrophobicity of Palmitoyl Glycol Chitosan Hydrogels. *Journal of Controlled Release* **2002**, *80* (1–3), 87–100. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00005-6).
- (99) Liang, Y.; He, J.; Guo, B. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano* **2021**, *15* (8), 12687–12722.

https://doi.org/10.1021/ACSNANO.1C04206/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NN1C04206_0016.GIF.

- (100) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J Pharm Sci* **2008**, *97* (8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/JPS.21210>.
- (101) Thomas, A.; Harding, K. G.; Moore, K. Alginates from Wound Dressings Activate Human Macrophages to Secrete Tumour Necrosis Factor-Alpha. *Biomaterials* **2000**, *21* (17), 1797–1802. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00072-7).
- (102) Warriner, R.; Burrell, R. Infection and the Chronic Wound: A Focus on Silver. *Adv Skin Wound Care* **2005**, *18 Suppl 1*, 2–12. <https://doi.org/10.1097/00129334-200510001-00001>.
- (103) Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J* **2014**, *55* (2), 283. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2014.55.2.283>.
- (104) Leaper, D. Appropriate Use of Silver Dressings in Wounds: International Consensus Document. *Int Wound J* **2012**, *9* (5), 461. <https://doi.org/10.1111/J.1742-481X.2012.01091.X>.
- (105) Norton, R.; Finley, P. J. Clinically Isolated Bacteria Resistance to Silver-Based Wound Dressings. *J Wound Care* **2021**, *30* (3), 238–247. <https://doi.org/10.12968/JOWC.2021.30.3.238>.
- (106) Dissemmond, J.; Gerber, V.; Kramer, A.; Riepe, G.; Strohal, R.; Vassel-Biergans, A.; Eberlein, T. A Practice-Oriented Recommendation for Treatment of Critically Colonised and Locally Infected Wounds Using Polihexanide. *J Tissue Viability* **2010**, *19* (3), 106–115. <https://doi.org/10.1016/J.JTV.2010.06.002>.
- (107) Eberlein, T.; Haemmerle, G.; Signer, M.; Gruber-Moesenbacher, U.; Traber, J.; Mittlboeck, M.; Abel, M.; Strohal, R. Comparison of PHMB-Containing Dressing and Silver Dressings in Patients with Critically Colonised or Locally Infected Wounds. *J Wound Care* **2012**, *21* (1), 12–20. <https://doi.org/10.12968/JOWC.2012.21.1.12>.
- (108) Worsley, A.; Vassileva, K.; Tsui, J.; Song, W.; Good, L. Polyhexamethylene Biguanide:Polyurethane Blend Nanofibrous Membranes for Wound Infection Control. *Polymers (Basel)* **2019**, *11* (5). <https://doi.org/10.3390/POLYM11050915>.
- (109) Antiseptics on Wounds: An Area of Controversy (PART ONE). *Wounds* **2003**.
- (110) Parker, D. M.; Koch, J. A.; Gish, C. G.; Brothers, K. M.; Li, W.; Gilbertie, J.; Rowe, S. E.; Conlon, B. P.; Byrapogu, V. K. C.; Urish, K. L. Hydrogen Peroxide, Povidone-Iodine and Chlorhexidine Fail to Eradicate Staphylococcus Aureus Biofilm from Infected Implant Materials. *Life* **2023**, *Vol. 13, Page 1230* **2023**, *13* (6), 1230. <https://doi.org/10.3390/LIFE13061230>.
- (111) Contardi, M.; Russo, D.; Suarato, G.; Heredia-Guerrero, J. A.; Ceseracciu, L.; Penna, I.; Margaroli, N.; Summa, M.; Spanò, R.; Tassistro, G.; Vezzulli, L.; Bandiera, T.; Bertorelli, R.; Athanassiou, A.; Bayer, I. S. Polyvinylpyrrolidone/Hyaluronic Acid-Based Bilayer Constructs

for Sequential Delivery of Cutaneous Antiseptic and Antibiotic. *Chemical Engineering Journal* **2019**, *358*, 912–923. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.10.048>.

- (112) Hao, J. Y.; Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Wu, Y. B.; Schoung, J. Y.; Tsai, Y. H.; Huang, Y. Bin. Control of Wound Infections Using a Bilayer Chitosan Wound Dressing with Sustainable Antibiotic Delivery. *J Biomed Mater Res* **2002**, *59* (3), 438–449. <https://doi.org/10.1002/JBM.1260>.
- (113) Tamahkar, E.; Özkahraman, B.; Süloğlu, A. K.; İdil, N.; Perçin, I. A Novel Multilayer Hydrogel Wound Dressing for Antibiotic Release. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *58*, 101536. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101536>.
- (114) Mana, T. S. C.; Donskey, C.; Carty, N.; Perry, L.; Leaper, D.; Edmiston, C. E. Preliminary Analysis of the Antimicrobial Activity of a Postoperative Wound Dressing Containing Chlorhexidine Gluconate against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in an in Vivo Porcine Incisional Wound Model. *Am J Infect Control* **2019**, *47* (9), 1048–1052. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2019.05.012>.
- (115) Aubert-Viard, F.; Mogrovejo-Valdivia, A.; Tabary, N.; Maton, M.; Chai, F.; Neut, C.; Martel, B.; Blanchemain, N. Evaluation of Antibacterial Textile Covered by Layer-by-Layer Coating and Loaded with Chlorhexidine for Wound Dressing Application. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *100*, 554–563. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.03.044>.
- (116) Norman, G.; Dumville, J. C.; Mohapatra, D. P.; Owens, G. L.; Crosbie, E. J. Antibiotics and Antiseptics for Surgical Wounds Healing by Secondary Intention. *Cochrane Database Syst Rev* **2016**, *2016* (3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011712.PUB2>.
- (117) Contardi, M.; Heredia-Guerrero, J. A.; Perotto, G.; Valentini, P.; Pompa, P. P.; Spanò, R.; Goldoni, L.; Bertorelli, R.; Athanassiou, A.; Bayer, I. S. Transparent Ciprofloxacin-Povidone Antibiotic Films and Nanofiber Mats as Potential Skin and Wound Care Dressings. *Eur J Pharm Sci* **2017**, *104*, 133–144. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.03.044>.
- (118) Phaechamud, T.; Issarayungyuen, P.; Pichayakorn, W. Gentamicin Sulfate-Loaded Porous Natural Rubber Films for Wound Dressing. *Int J Biol Macromol* **2016**, *85*, 634–644. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.01.040>.
- (119) Özcan Bülbül, E.; Okur, M. E.; Üstündağ Okur, N.; Sıfaka, P. I. Traditional and Advanced Wound Dressings: Physical Characterization and Desirable Properties for Wound Healing. *Natural Polymers in Wound Healing and Repair: From Basic Concepts to Emerging Trends* **2022**, 19–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90514-5.00020-1>.
- (120) Sethuram, L.; Thomas, J. Therapeutic Applications of Electrospun Nanofibers Impregnated with Various Biological Macromolecules for Effective Wound Healing Strategy - A Review. *Biomed Pharmacother* **2023**, *157*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113996>.
- (121) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol Adv* **2010**, *28* (3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.01.004>.
- (122) Augustine, R.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. An in Vitro Method for the Determination of Microbial Barrier Property (MBP) of Porous Polymeric Membranes for Skin Substitute and

Wound Dressing Applications. *Tissue Eng Regen Med* **2015**, *12* (1), 12–19.
<https://doi.org/10.1007/S13770-014-0032-9/METRICS>.

- (123) Zupančič, Š.; Rijavec, T.; Lapanje, A.; Petelin, M.; Kristl, J.; Kocbek, P. Nanofibers with Incorporated Autochthonous Bacteria as Potential Probiotics for Local Treatment of Periodontal Disease. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (11), 4299–4306.
<https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.8B01181>.
- (124) Škrlec, K.; Zupančič, Š.; Prpar Mihevc, S.; Kocbek, P.; Kristl, J.; Berlec, A. Development of Electrospun Nanofibers That Enable High Loading and Long-Term Viability of Probiotics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2019**, *136*, 108–119.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2019.01.013>.
- (125) Gizaw, M.; Faglie, A.; Pieper, M.; Poudel, S.; Chou, S.-F. The Role of Electrospun Fiber Scaffolds in Stem Cell Therapy for Skin Tissue Regeneration. *Med One* **2019**, *4*.
<https://doi.org/10.20900/MO.20190002>.
- (126) Liu, X.; Xu, H.; Zhang, M.; Yu, D. G. Electrospun Medicated Nanofibers for Wound Healing: Review. *Membranes* **2021**, Vol. 11, Page 770 **2021**, *11* (10), 770.
<https://doi.org/10.3390/MEMBRANES11100770>.
- (127) Rather, A. H.; Wani, T. U.; Khan, R. S.; Pant, B.; Park, M.; Sheikh, F. A. Prospects of Polymeric Nanofibers Loaded with Essential Oils for Biomedical and Food-Packaging Applications. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22084017>.
- (128) Alven, S.; Peter, S.; Mbese, Z.; Aderibigbe, B. A. Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. *Polymers (Basel)* **2022**, *14* (4). <https://doi.org/10.3390/POLYM14040724>.
- (129) Dwivedi, C.; Pandey, I.; Pandey, H.; Patil, S.; Mishra, S. B.; Pandey, A. C.; Zamboni, P.; Ramteke, P. W.; Singh, A. V. In Vivo Diabetic Wound Healing with Nanofibrous Scaffolds Modified with Gentamicin and Recombinant Human Epidermal Growth Factor. *J Biomed Mater Res A* **2018**, *106* (3), 641–651. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.36268>.
- (130) Fu, C.; Qi, Z.; Zhao, C.; Kong, W.; Li, H.; Guo, W.; Yang, X. Enhanced Wound Repair Ability of Arginine-Chitosan Nanocomposite Membrane through the Antimicrobial Peptides-Loaded Polydopamine-Modified Graphene Oxide. *J Biol Eng* **2021**, *15* (1).
<https://doi.org/10.1186/S13036-021-00268-3>.
- (131) Zhu, L.; Chen, L. Facile Design and Development of Nano-Clustery Graphene-Based Macromolecular Protein Hydrogel Loaded with Ciprofloxacin to Antibacterial Improvement for the Treatment of Burn Wound Injury. *Polym Bull (Berl)* **2022**, *79* (9), 7953–7968.
<https://doi.org/10.1007/S00289-021-03875-8>.
- (132) Gámez-Herrera, E.; García-Salinas, S.; Salido, S.; Sancho-Albero, M.; Andreu, V.; Pérez, M.; Luján, L.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Mendoza, G. Drug-Eluting Wound Dressings Having Sustained Release of Antimicrobial Compounds. *Eur J Pharm Biopharm* **2020**, *152*, 327–339.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2020.05.025>.

- (133) Rajendran, N. K.; Kumar, S. S. D.; Houreld, N. N.; Abrahamse, H. A Review on Nanoparticle Based Treatment for Wound Healing. *J Drug Deliv Sci Technol* **2018**, *44*, 421–430. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2018.01.009>.
- (134) González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles for Bioimaging and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol* **2016**, *4* (JUN). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2016.00047>.
- (135) Hamdan, S.; Pastar, I.; Drakulich, S.; Dikici, E.; Tomic-Canic, M.; Deo, S.; Daunert, S. Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Cent Sci* **2017**, *3* (3), 163–175. <https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.6B00371>.
- (136) Ferrari, M. Nanogeometry: Beyond Drug Delivery. *Nat Nanotechnol* **2008**, *3* (3), 131–132. <https://doi.org/10.1038/NNANO.2008.46>.
- (137) George, S.; Lin, S.; Ji, Z.; Thomas, C. R.; Li, L.; Mecklenburg, M.; Meng, H.; Wang, X.; Zhang, H.; Xia, T.; Hohman, J. N.; Lin, S.; Zink, J. I.; Weiss, P. S.; Nel, A. E. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. *ACS Nano* **2012**, *6* (5), 3745. <https://doi.org/10.1021/NN204671V>.
- (138) Vijayakumar, V.; Samal, S. K.; Mohanty, S.; Nayak, S. K. Recent Advancements in Biopolymer and Metal Nanoparticle-Based Materials in Diabetic Wound Healing Management. *Int J Biol Macromol* **2019**, *122*, 137–148. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.120>.
- (139) Brittain, H. G. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology Volume 37. 472.
- (140) Erdoğar, N.; Akkın, S.; Bilensoy, E. Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade. *Recent Pat Drug Deliv Formul* **2018**, *12* (4), 252–266. <https://doi.org/10.2174/1872211313666190123153711>.
- (141) Berthet, M.; Gauthier, Y.; Lacroix, C.; Verrier, B.; Monge, C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol* **2017**, *35* (8), 770–784. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.05.005>.
- (142) Chahal, S.; Kumar, A.; Hussian, F. S. J. Development of Biomimetic Electrospun Polymeric Biomaterials for Bone Tissue Engineering. A Review. *J Biomater Sci Polym Ed* **2019**, *30* (14), 1308–1355. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1630699>.
- (143) Mir, M.; Ali, M. N.; Barakullah, A.; Gulzar, A.; Arshad, M.; Fatima, S.; Asad, M. Synthetic Polymeric Biomaterials for Wound Healing: A Review. *Prog Biomater* **2018**, *7* (1). <https://doi.org/10.1007/S40204-018-0083-4>.
- (144) Mi, H. Y.; Jing, X.; Turng, L. S. Fabrication of Porous Synthetic Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. <http://dx.doi.org/10.1177/0021955X14531002> **2014**, *51* (2), 165–196. <https://doi.org/10.1177/0021955X14531002>.
- (145) Urrejola, M. C.; Soto, L. V.; Zumarán, C. C.; Peñalosa, J. P.; Álvarez, B.; Fuentesvilla, I.; Haidar, Z. S.; Urrejola, M. C.; Soto, L. V.; Zumarán, C. C.; Peñalosa, J. P.; Álvarez, B.; Fuentesvilla, I.;

- Haidar, Z. S. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa Por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology* **2018**, *36* (4), 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022018000401463>.
- (146) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Prog Polym Sci* **2011**, *36* (7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.01.001>.
- (147) Sridhar, R.; Ramakrishna, S. Electrospayed Nanoparticles for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. *Biomatter* **2013**, *3* (3). <https://doi.org/10.4161/BIOM.24281>.
- (148) Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine* **2006**, *2* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2005.12.003>.
- (149) Lee, B. K.; Yun, Y.; Park, K. PLA Micro- and Nano-Particles. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *107*, 176–191. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.05.020>.
- (150) Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. <http://dx.doi.org/10.1177/147323000903700531> **2009**, *37* (5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>.
- (151) Kalan, L.; Grice, E. A. Fungi in the Wound Microbiome. <https://home.liebertpub.com/wound> **2018**, *7* (7), 247–255. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2017.0756>.
- (152) Schloss, P. D.; Handelsman, J. Status of the Microbial Census. *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68* (4), 686–691. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004>.
- (153) Olsson, M.; Järbrink, K.; Divakar, U.; Bajpai, R.; Upton, Z.; Schmidtchen, A.; Car, J. The Humanistic and Economic Burden of Chronic Wounds: A Systematic Review. *Wound Repair and Regeneration* **2019**, *27* (1), 114–125. <https://doi.org/10.1111/WRR.12683>.
- (154) Edmonds, M.; Manu, C.; Vas, P. The Current Burden of Diabetic Foot Disease. *J Clin Orthop Trauma* **2021**, *17*, 88–93. <https://doi.org/10.1016/J.JCOT.2021.01.017>.
- (155) Shiferaw, W. S.; Akalu, T. Y.; Mulugeta, H.; Aynalem, Y. A. The Global Burden of Pressure Ulcers among Patients with Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Musculoskelet Disord* **2020**, *21* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12891-020-03369-0/FIGURES/6>.
- (156) Bigliardi, P. L.; Alsagoff, S. A. L.; El-Kafrawi, H. Y.; Pyon, J. K.; Wa, C. T. C.; Villa, M. A. Povidone Iodine in Wound Healing: A Review of Current Concepts and Practices. *International Journal of Surgery* **2017**, *44*, 260–268. <https://doi.org/10.1016/J.IJSU.2017.06.073>.
- (157) Kramer, A.; Dissemmond, J.; Kim, S.; Willy, C.; Mayer, D.; Papke, R.; Tuchmann, F.; Assadian, O. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacol Physiol* **2018**, *31* (1), 28–58. <https://doi.org/10.1159/000481545>.

- (158) Committee for Risk Assessment RAC Opinion Proposing Harmonised Classification and Labelling at Community Level of Polyhexamethylene Biguanide or Poly(Hexamethylene) Biguanide Hydrochloride or PHMB. **2011**.
- (159) Kuyyakanond, T.; Quesnel, L. B. The Mechanism of Action of Chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett* **1992**, *100* (1–3), 211–215. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1992.TB14042.X>.
- (160) LOWBURY, E. J. Chlorhexidine. *Practitioner* **2016**, *179* (1072), 239–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00474-1>.
- (161) Roberts, C. D.; Leaper, D. J.; Assadian, O. The Role of Topical Antiseptic Agents Within Antimicrobial Stewardship Strategies for Prevention and Treatment of Surgical Site and Chronic Open Wound Infection. <https://home.liebertpub.com/wound> **2017**, *6* (2), 63–71. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2016.0701>.
- (162) Wehrli, W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Rev Infect Dis* **1983**, *5* (Supplement_3), S407–S411. https://doi.org/10.1093/CLINIDS/5.SUPPLEMENT_3.S407.
- (163) Grobbelaar, M.; Louw, G. E.; Sampson, S. L.; van Helden, P. D.; Donald, P. R.; Warren, R. M. Evolution of Rifampicin Treatment for Tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution* **2019**, *74*, 103937. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.103937>.
- (164) Chen, H.; Khemtong, C.; Yang, X.; Chang, X.; Gao, J. Nanonization Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs. *Drug Discov Today* **2010**, *00*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.02.009>.
- (165) Betancourt, L.; Phandanauvong, V.; Patiño, R.; Ariza-Nieto, C.; Afanador-Téllez, G. COMPOSITION AND BACTERICIDAL ACTIVITY AGAINST BENEFICIAL AND PATHOGENIC BACTERIA OF OREGANO ESSENTIAL OILS FROM FOUR CHEMOTYPES OF *Origanum* AND *Lippia* GENUS. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* **2012**, *59* (I), 21–31.
- (166) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1451. <https://doi.org/10.3390/PH6121451>.
- (167) Jones, E. M.; Cochrane, C. A.; Percival, S. L. The Effect of PH on the Extracellular Matrix and Biofilms. <https://home.liebertpub.com/wound> **2015**, *4* (7), 431–439. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2014.0538>.
- (168) Sauer, D.; McGinity, J. Properties of Theophylline Tablets Dry Powder Coated with Eudragit E PO and Eudragit L 100-55. *Pharm Dev Technol* **2009**, *14* (6), 632–641. <https://doi.org/10.3109/10837450902882369>.
- (169) Aguilar, L. E.; Unnithan, A. R.; Amarjargal, A.; Tiwari, A. P.; Hong, S. T.; Park, C. H.; Kim, C. S. Electrospun Polyurethane/Eudragit® L100-55 Composite Mats for the PH Dependent Release of Paclitaxel on Duodenal Stent Cover Application. *Int J Pharm* **2015**, *478* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.10.057>.

- (170) Nikam, A.; Sahoo, P. R.; Musale, S.; Pagar, R. R.; Paiva-Santos, A. C.; Giram, P. S. A Systematic Overview of Eudragit® Based Copolymer for Smart Healthcare. *Pharmaceutics* **2023**, *Vol. 15*, Page 587 **2023**, *15* (2), 587. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15020587>.
- (171) Sonje, A.; Chandra, A. COMPREHENSIVE REVIEW ON EUDRAGIT POLYMERS. *International Research Journal of Pharmacy* **2013**, *4* (5), 71–74. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04515>.
- (172) Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) in Polymeric or Hydrophobic Materials Title: Staff Scientist Title: Quality Manager.
- (173) Reda, R. I.; Wen, M. M.; El-Kamel, A. H. Ketoprofen-Loaded Eudragit Electrospun Nanofibers for the Treatment of Oral Mucositis. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 2335. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131253>.
- (174) Ibrahim, H. M.; Klingner, A. A Review on Electrospun Polymeric Nanofibers: Production Parameters and Potential Applications. *Polym Test* **2020**, *90*, 106647. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106647>.
- (175) Meechaisue, C.; Dubin, R.; Supaphol, P.; Hoven, V. P.; Kohn, J. Electrospun Mat of Tyrosine-Derived Polycarbonate Fibers for Potential Use as Tissue Scaffolding Material. <http://dx.doi.org/10.1163/156856206778365988> **2012**, *17* (9), 1039–1056. <https://doi.org/10.1163/156856206778365988>.
- (176) Gilchrist, S. E.; Lange, D.; Letchford, K.; Bach, H.; Fazli, L.; Burt, H. M. Fusidic Acid and Rifampicin Co-Loaded PLGA Nanofibers for the Prevention of Orthopedic Implant Associated Infections. *Journal of Controlled Release* **2013**, *170* (1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.04.012>.
- (177) Obeidat, W. M.; Price, J. C. Viscosity of Polymer Solution Phase and Other Factors Controlling the Dissolution of Theophylline Microspheres Prepared by the Emulsion Solvent Evaporation Method. *J Microencapsul* **2003**, *20* (1), 57–65. <https://doi.org/10.1080/0265204021000022716>.
- (178) Zeng, J.; Zhao, Y.; Li, K.; Long, D.; Li, W.; Liang, L. A Coordinated Ruthenium-Rifampicin Complex Reprogramming the Colon Carcinoma Micro-Environment Mediated by Modulation of P53/AkT/MTOR/VEGF Pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **2021**, *426*, 115618. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2021.115618>.
- (179) Liu, X.; Ma, X.; Kun, E.; Guo, X.; Yu, Z.; Zhang, F. Influence of Lidocaine Forms (Salt vs. Freebase) on Properties of Drug–Eudragit® L100-55 Extrudates Prepared by Reactive Melt Extrusion. *Int J Pharm* **2018**, *547* (1–2), 291–302. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.06.009>.
- (180) Al-Ani, E.; Martin, C.; Britland, S. T.; Doudin, K.; Hill, D. J. The Effect of the Source and the Concentration of Polymers on the Release of Chlorhexidine from Mucoadhesive Buccal Tablets. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2019**, *27* (6), 756–766. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2019.04.012>.

- (181) Lukic, I.; Vulic, J.; Ivanovic, J. Antioxidant Activity of PLA/PCL Films Loaded with Thymol and/or Carvacrol Using ScCO₂ for Active Food Packaging. *Food Packag Shelf Life* **2020**, *26*, 100578. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2020.100578>.
- (182) Holešová, S.; Samlíková, M.; Ritz, M.; Pazdziora, E. Antibacterial Polyethylene/Clay Nanocomposites Using Chlorhexidine as Organic Modifier. *Mater Today Proc* **2015**, *2* (1), 246–252. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2015.04.031>.
- (183) Filgueiras, A. L.; Lima, F. R. A.; De Carvalho, D. F.; Meirelles, M. A.; Paschoal, D.; Dos Santos, H. F.; Sanchez-Cortes, S.; Sant'ana, A. C. The Adsorption of Rifampicin on Gold or Silver Surfaces Mediated by 2-Mercaptoethanol Investigated by Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. *Vib Spectrosc* **2016**, *86*, 75–80. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2016.06.006>.
- (184) Chen, L.; Bromberg, L.; Hatton, T. A.; Rutledge, G. C. Electrospun Cellulose Acetate Fibers Containing Chlorhexidine as a Bactericide. *Polymer (Guildf)* **2008**, *49* (5), 1266–1275. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2008.01.003>.
- (185) Xia, W.; Razi, M. R. M.; Ashley, P.; Neel, E. A. A.; Hofmann, M. P.; Young, A. M. Quantifying Effects of Interactions between Polyacrylic Acid and Chlorhexidine in Dicalcium Phosphate – Forming Cements. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (12), 1673–1680. <https://doi.org/10.1039/C3TB21533D>.
- (186) Suci, P. A.; Geesey, G. G.; Tyler, B. J. Integration of Raman Microscopy, Differential Interference Contrast Microscopy, and Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Investigate Chlorhexidine Spatial and Temporal Distribution in *Candida Albicans* Biofilms. *J Microbiol Methods* **2001**, *46* (3), 193–208. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00268-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00268-8).
- (187) Martín-Illana, A.; Cazorla-Luna, R.; Notario-Pérez, F.; Bedoya, L. M.; Rubio, J.; Tamayo, A.; Ruiz-Caro, R.; Veiga, M. D. Smart Vaginal Bilayer Films of Tenofovir Based on Eudragit® L100/Natural Polymer for the Prevention of the Sexual Transmission of HIV. *Int J Pharm* **2021**, *602*, 120665. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120665>.
- (188) Saraiva, A. G. Q.; Saraiva, G. D.; Albuquerque, R. L.; Nogueira, C. E. S.; Teixeira, A. M. R.; Lima, L. B.; Cruz, B. G.; de Sousa, F. F. Chemical Analysis and Vibrational Spectroscopy Study of Essential Oils from *Lippia Sidoides* and of Its Major Constituent. *Vib Spectrosc* **2020**, *110*, 103111. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2020.103111>.
- (189) Patra, Ch. N.; Priya, R.; Swain, S.; Kumar Jena, G.; Panigrahi, K. C.; Ghose, D. Pharmaceutical Significance of Eudragit: A Review. *Futur J Pharm Sci* **2017**, *3* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/J.FJPS.2017.02.001>.
- (190) Pignatello, R.; Amico, D.; Chiechio, S.; Spadaro, C.; Puglisi, G.; Giunchedi, P. Preparation and Analgesic Activity of Eudragit RS100 Microparticles Containing Diflunisal. *Drug Deliv* **2001**, *8* (1), 35–45. <https://doi.org/10.1080/107175401300002748>.

- (191) Giménez-Martín, E.; López-Andrade, M.; Ontiveros-Ortega, A.; Espinosa-Jiménez, M. Adsorption of Chlorhexidine onto Cellulosic Fibers. *Cellulose* **2009**, *16* (3), 467–479. <https://doi.org/10.1007/S10570-009-9281-5/METRICS>.
- (192) Taeger, C. D.; Wallner, S.; Martini, T.; Schiltz, D.; Kehrer, A.; Prantl, L.; Biermann, N. Analysis of Rinsing Fluid during Negative Pressure Wound Therapy with Instillation: A Potential Monitoring Tool in Acute and Chronic Wound Treatment. A Pilot Study. *Cells* **2021**, *Vol. 10*, Page 732 **2021**, *10* (4), 732. <https://doi.org/10.3390/CELLS10040732>.
- (193) Haller, H. L.; Sander, F.; Popp, D.; Rapp, M.; Hartmann, B.; Demircan, M.; Nischwitz, S. P.; Kamolz, L. P. Oxygen, PH, Lactate, and Metabolism—How Old Knowledge and New Insights Might Be Combined for New Wound Treatment. *Medicina* **2021**, *Vol. 57*, Page 1190 **2021**, *57* (11), 1190. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA57111190>.
- (194) Wiegand, C.; Abel, M.; Ruth, P.; Elsner, P.; Hipler, U. C. PH Influence on Antibacterial Efficacy of Common Antiseptic Substances. *Skin Pharmacol Physiol* **2015**, *28* (3), 147–158. <https://doi.org/10.1159/000367632>.
- (195) Drapeau, C. M. J.; Grilli, E.; Petrosillo, N. Rifampicin Combined Regimens for Gram-Negative Infections: Data from the Literature. *Int J Antimicrob Agents* **2010**, *35* (1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.08.011>.
- (196) Aragón, J.; Feoli, S.; Irusta, S.; Mendoza, G. Composite Scaffold Obtained by Electro-Hydrodynamic Technique for Infection Prevention and Treatment in Bone Repair. *Int J Pharm* **2019**, *557*, 162–169. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.12.002>.
- (197) Juven, B. J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. *Journal of Applied Bacteriology* **1994**, *76* (6), 626–631. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1994.TB01661.X>.
- (198) Gámez-Herrera, E.; García-Salinas, S.; Salido, S.; Sancho-Albero, M.; Andreu, V.; Pérez, M.; Luján, L.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Mendoza, G. Drug-Eluting Wound Dressings Having Sustained Release of Antimicrobial Compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, *152*, 327–339. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2020.05.025>.
- (199) Gámez, E.; Mendoza, G.; Salido, S.; Arruebo, M.; Irusta, S. Antimicrobial Electrospun Polycaprolactone-Based Wound Dressings: An In Vitro Study About the Importance of the Direct Contact to Elicit Bactericidal Activity. <https://home.liebertpub.com/wound> **2019**, *8* (9), 438–451. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2018.0893>.
- (200) Garcia-Salinas, S.; Gámez, E.; Landa, G.; Arruebo, M.; Irusta, S.; Mendoza, G. Antimicrobial Wound Dressings against Fluorescent and Methicillin-Sensitive Intracellular Pathogenic Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces* **2020**, *12* (46), 51302–51313. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C17043/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AM0C17043_0009.GIF.
- (201) Luddin, N.; Aly Ahmed, H. M. The Antibacterial Activity of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine against *Enterococcus Faecalis*: A Review on Agar Diffusion and Direct Contact Methods. *J Conserv Dent* **2013**, *16* (1), 9. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.105291>.

- (202) Kavoosi, G.; Dadfar, S. M. M.; Purfard, A. M. Mechanical, Physical, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Gelatin Films Incorporated with Thymol for Potential Use as Nano Wound Dressing. *J Food Sci* **2013**, *78* (2), E244–E250. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12015>.
- (203) Lee, J. H.; Baik, J. M.; Yu, Y. S.; Kim, J. H.; Ahn, C. B.; Son, K. H.; Kim, J. H.; Choi, E. S.; Lee, J. W. Development of a Heat Labile Antibiotic Eluting 3D Printed Scaffold for the Treatment of Osteomyelitis. *Sci Rep* **2020**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-64573-5>.
- (204) Goller, S.; Turner, N. J. The Antimicrobial Effectiveness and Cytotoxicity of the Antibiotic-Loaded Chitosan: ECM Scaffolds. *Applied Sciences* **2020**, Vol. 10, Page 3446 **2020**, *10* (10), 3446. <https://doi.org/10.3390/APP10103446>.
- (205) Aubert-Viard, F.; Mogrovejo-Valdivia, A.; Tabary, N.; Maton, M.; Chai, F.; Neut, C.; Martel, B.; Blanchemain, N. Evaluation of Antibacterial Textile Covered by Layer-by-Layer Coating and Loaded with Chlorhexidine for Wound Dressing Application. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *100*, 554–563. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.03.044>.
- (206) Al Thaher, Y.; Alotaibi, H. F.; Yang, L.; Prokopovich, P. PMMA Bone Cement Containing Long Releasing Silica-Based Chlorhexidine Nanocarriers. *PLoS One* **2021**, *16* (9), e0257947. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0257947>.
- (207) Thet, N. T.; Mercer-Chalmers, J.; Greenwood, R. J.; Young, A. E. R.; Coy, K.; Booth, S.; Sack, A.; Jenkins, A. T. A. SPaCE Swab: Point-of-Care Sensor for Simple and Rapid Detection of Acute Wound Infection. *ACS Sens* **2020**, *5* (8), 2652–2657. https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.0C01265/SUPPL_FILE/SE0C01265_LIVESLIDES.MP4.
- (208) Waterbrook, A. L.; Hiller, K.; Hays, D. P.; Berkman, M. Do Topical Antibiotics Help Prevent Infection in Minor Traumatic Uncomplicated Soft Tissue Wounds? *Ann Emerg Med* **2013**, *61* (1), 86–88. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEMERGEMED.2012.08.002>.
- (209) Heal, C. F.; Banks, J. L.; Lepper, P.; Kontopantelis, E.; van Driel, M. L. Meta-Analysis of Randomized and Quasi-Randomized Clinical Trials of Topical Antibiotics after Primary Closure for the Prevention of Surgical-Site Infection. *Br J Surg* **2017**, *104* (9), 1123–1130. <https://doi.org/10.1002/BJS.10588>.
- (210) Roberts, C. D.; Leaper, D. J.; Assadian, O. The Role of Topical Antiseptic Agents Within Antimicrobial Stewardship Strategies for Prevention and Treatment of Surgical Site and Chronic Open Wound Infection. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2017**, *6* (2), 63–71. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2016.0701>.
- (211) O’Meara, S.; Al-Kurdi, D.; Ologun, Y.; Ovington, L. G.; Martyn-St James, M.; Richardson, R. Antibiotics and Antiseptics for Venous Leg Ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2014**, *2014* (1). https://doi.org/10.1002/14651858.CD003557.PUB5/MEDIA/CDSR/CD003557/IMAGE_N/NC D003557-CMP-028-03.PNG.
- (212) Payab, S.; Jafari-Aghdam, N.; Barzegar-Jalali, M.; Mohammadi, G.; Lotfipour, F.; Gholikhani, T.; Adibkia, K. Preparation and Physicochemical Characterization of the Azithromycin-

- Eudragit RS100 Nanobeads and Nanofibers Using Electrospinning Method. *J Drug Deliv Sci Technol* **2014**, *24* (6), 585–590. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50123-2](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50123-2).
- (213) Chen, J.; Xu, F.; Wei, Y.; Qi, J. Dual-Carrier Drug-Loaded Composite Membrane Dressings of Mesoporous Silica and Layered Double Hydroxides. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *75*, 103634. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103634>.
- (214) Vučić, D.; Cvitkušić-Lukenda, K.; Dunđer, I.; Gabaldo, K.; Knežević-Praveček, M.; Miškić, B. Diagnostic Complexity of Rifampicin-Induced Coagulopathy in a Patient with Spontaneous Muscle Bleeding: A Case Report. *Medicine* **2021**, *100* (26), E26234. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026234>.
- (215) Bahulkar, H. V.; Joshi, D.; Joglekar, P. R.; Sahasrabudde, B. S. Rifampin. *MAHARASHTRA MED.J.* **2016**, *21* (2), 709–711. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00503-9>.
- (216) Rand, K. H.; Houck, H. Daptomycin Synergy with Rifampicin and Ampicillin against Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Antimicrob Chemother* **2004**, *53* (3), 530–532. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKH104>.
- (217) García, M. C.; Aldana, A. A.; Tártara, L. I.; Alovero, F.; Strumia, M. C.; Manzo, R. H.; Martinelli, M.; Jimenez-Kairuz, A. F. Bioadhesive and Biocompatible Films as Wound Dressing Materials Based on a Novel Dendronized Chitosan Loaded with Ciprofloxacin. *Carbohydr Polym* **2017**, *175*, 75–86. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.07.053>.
- (218) Tsou, T. L.; Tang, S. T.; Huang, Y. C.; Wu, J. R.; Young, J. J.; Wang, H. J. Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) Wound Dressing Containing Ciprofloxacin and Its Drug Release Studies. *J Mater Sci Mater Med* **2005**, *16* (2), 95–100. <https://doi.org/10.1007/S10856-005-5954-2/METRICS>.
- (219) Berdal, J. E.; Skråmm, I.; Mowinckel, P.; Gulbrandsen, P.; Bjørnholt, J. V. Use of Rifampicin and Ciprofloxacin Combination Therapy after Surgical Debridement in the Treatment of Early Manifestation Prosthetic Joint Infections. *Clin Microbiol Infect* **2005**, *11* (10), 843–845. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2005.01230.X>.
- (220) Wells, C. M.; Beenken, K. E.; Smeltzer, M. S.; Courtney, H. S.; Jennings, J. A.; Haggard, W. O. Ciprofloxacin and Rifampin Dual Antibiotic-Loaded Biopolymer Chitosan Sponge for Bacterial Inhibition. *Mil Med* **2018**, *183* (suppl_1), 433–444. <https://doi.org/10.1093/MILMED/USX150>.
- (221) Kang, Y. R.; Chung, D. R.; Kim, J.; Baek, J. Y.; Kim, S. H.; Ha, Y. E.; Kang, C. I.; Peck, K. R.; Song, J. H. In Vitro Synergistic Effects of Various Combinations of Vancomycin and Non-Beta-Lactams against Staphylococcus Aureus with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2016**, *86* (3), 293–299. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.08.009>.
- (222) Gradelski, E.; Kolek, B.; Bonner, D. P.; Valera, L.; Minassian, B.; Fung-Tomc, J. Activity of Gatifloxacin and Ciprofloxacin in Combination with Other Antimicrobial Agents. *Int J Antimicrob Agents* **2001**, *17* (2), 103–107. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00317-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00317-4).

- (223) Coe, C. J.; Doss, S. A.; Tillotson, G. S.; Amyes, S. G. B. Interaction of Sub-Inhibitory Concentrations of Ciprofloxacin and Rifampicin against *Staphylococcus Aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **1995**, *5* (2), 135–139. [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(95\)90674-L](https://doi.org/10.1016/0924-8579(95)90674-L).
- (224) König, D. P.; Schierholz, J. M.; Münnich, U.; Rütt, J. Treatment of Staphylococcal Implant Infection with Rifampicin-Ciprofloxacin in Stable Implants. *Arch Orthop Trauma Surg* **2001**, *121* (5), 297–299. <https://doi.org/10.1007/S004020000242>.
- (225) Lázár, V.; Snitser, O.; Barkan, D.; Kishony, R. Antibiotic Combinations Reduce *Staphylococcus Aureus* Clearance. *Nature 2022 610:7932* **2022**, *610* (7932), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05260-5>.
- (226) Sofokleous, P.; Stride, E.; Edirisinghe, M. Preparation, Characterization, and Release of Amoxicillin from Electrospun Fibrous Wound Dressing Patches. *Pharm Res* **2013**, *30* (7), 1926–1938. <https://doi.org/10.1007/S11095-013-1035-2>.
- (227) Yus Argón, C. Desarrollo de Sistemas Poliméricos Mucoadhesivos de Liberación Controlada Para La Distribución Localizada de Agentes Terapéuticos Bioactivos. **2020**, *1*.
- (228) Dillen, K.; Vandervoort, J.; Van den Mooter, G.; Ludwig, A. Evaluation of Ciprofloxacin-Loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA Nanoparticles. *Int J Pharm* **2006**, *314* (1), 72–82. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2006.01.041>.
- (229) Arauzo, B.; Lobera, M. P.; Monzon, A.; Santamaria, J. Dry Powder Formulation for Pulmonary Infections: Ciprofloxacin Loaded in Chitosan Sub-Micron Particles Generated by Electro spray. *Carbohydr Polym* **2021**, *273*, 118543. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118543>.
- (230) Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C. The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles. *Polymer (Guildf)* **2001**, *42* (1), 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0).
- (231) Demirci, S.; Celebioglu, A.; Aytac, Z.; Uyar, T. PH-Responsive Nanofibers with Controlled Drug Release Properties. *Polym Chem* **2014**, *5* (6), 2050–2056. <https://doi.org/10.1039/C3PY01276J>.
- (232) Rongthong, T.; Sungthongjeen, S.; Siepmann, J.; Pongjanyakul, T. Quaternary Polymethacrylate–Magnesium Aluminum Silicate Films: Molecular Interactions, Mechanical Properties and Tackiness. *Int J Pharm* **2013**, *458* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.10.016>.
- (233) Yasir, M.; Dutta, D.; Willcox, M. D. P. Enhancement of Antibiofilm Activity of Ciprofloxacin against *Staphylococcus Aureus* by Administration of Antimicrobial Peptides. *Antibiotics (Basel)* **2021**, *10* (10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101159>.
- (234) Yus, C.; Irusta, S.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Controlling Particle Size and Release Kinetics in the Sustained Delivery of Oral Antibiotics Using PH-Independent Mucoadhesive Polymers. *Mol Pharm* **2020**, *17* (9), 3314–3327.

https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C00408/SUPPL_FILE/MPOC00408_SI_001.PDF.

- (235) Masadeh, M. M.; Alzoubi, K. H.; Khabour, O. F.; Al-Azzam, S. I. Ciprofloxacin-Induced Antibacterial Activity Is Attenuated by Phosphodiesterase Inhibitors. *Curr Ther Res Clin Exp* **2015**, *77*, 14. <https://doi.org/10.1016/J.CURTHERES.2014.11.001>.
- (236) Baker, K. R.; Jana, B.; Hansen, A. M.; Nielsen, H. M.; Franzyk, H.; Guardabassi, L. Repurposing Azithromycin and Rifampicin Against Gram-Negative Pathogens by Combination With Peptidomimetics. *Front Cell Infect Microbiol* **2019**, *9* (JUL). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00236>.
- (237) Rahal, E. A.; Kazzi, N.; Kanbar, A.; Abdelnoor, A. M.; Matar, G. M. Role of Rifampicin in Limiting Escherichia Coli O157:H7 Shiga-like Toxin Expression and Enhancement of Survival of Infected BALB/c Mice. *Int J Antimicrob Agents* **2011**, *37* (2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.10.009>.
- (238) Aktas, G.; Derbentli, S. In Vitro Activity of Daptomycin Combinations with Rifampicin, Gentamicin, Fosfomycin and Fusidic Acid against MRSA Strains. *J Glob Antimicrob Resist* **2017**, *10*, 223–227. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2017.05.022>.
- (239) Patel, Y. S.; Mehra, S. Synergistic Response of Rifampicin with Hydroperoxides on Mycobacterium: A Mechanistic Study. *Front Microbiol* **2017**, *8* (OCT), 2075. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02075/BIBTEX>.
- (240) Yang, S.; Li, X.; Liu, P.; Zhang, M.; Wang, C.; Zhang, B. Multifunctional Chitosan/Polycaprolactone Nanofiber Scaffolds with Varied Dual-Drug Release for Wound-Healing Applications. *ACS Biomater Sci Eng* **2020**, *6* (8), 4666–4676. https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.0C00674/SUPPL_FILE/ABOC00674_SI_001.PDF.
- (241) Wang, B.; Chen, X.; Ahmad, Z.; Huang, J.; Chang, M. W. Engineering On-Demand Magnetic Core–Shell Composite Wound Dressing Matrices via Electrohydrodynamic Micro-Scale Printing. *Adv Eng Mater* **2019**, *21* (10), 1900699. <https://doi.org/10.1002/ADEM.201900699>.
- (242) Chen, J.; Liu, Z.; Chen, M.; Zhang, H.; Li, X. Electrospun Gelatin Fibers with a Multiple Release of Antibiotics Accelerate Dermal Regeneration in Infected Deep Burns. *Macromol Biosci* **2016**, *16* (9), 1368–1380. <https://doi.org/10.1002/MABI.201600108>.
- (243) Hetrick, E. M.; Shin, J. H.; Paul, H. S.; Schoenfisch, M. H. Anti-Biofilm Efficacy of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30* (14), 2782–2789. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.01.052>.
- (244) Raval, Y. S.; Mohamed, A.; Flurin, L.; Mandrekar, J. N.; Greenwood Quaintance, K. E.; Beyenal, H.; Patel, R. Hydrogen-Peroxide Generating Electrochemical Bandage Is Active in Vitro against Mono- and Dual-Species Biofilms. *Biofilm* **2021**, *3*, 100055. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2021.100055>.

- (245) Fulaz, S.; Devlin, H.; Vitale, S.; Quinn, L.; O'gara, J. P.; Casey, E. Tailoring Nanoparticle-Biofilm Interactions to Increase the Efficacy of Antimicrobial Agents Against *Staphylococcus Aureus*. *Int J Nanomedicine* **2020**, *15*, 4779. <https://doi.org/10.2147/IJN.S256227>.
- (246) Gámez, E.; Mendoza, G.; Salido, S.; Arruebo, M.; Irusta, S. Antimicrobial Electrospun Polycaprolactone-Based Wound Dressings: An In Vitro Study About the Importance of the Direct Contact to Elicit Bactericidal Activity. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2019**, *8* (9), 438–451. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2018.0893>.
- (247) Kerekes, E. B.; Vidács, A.; Takó, M.; Petkovits, T.; Vágvölgyi, C.; Horváth, G.; Balázs, V. L.; Krisch, J. Anti-Biofilm Effect of Selected Essential Oils and Main Components on Mono- and Polymicrobial Bacterial Cultures. *Microorganisms* **2019**, *7* (9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7090345>.
- (248) Pandur, Ž.; Dular, M.; Kostanjšek, R.; Stopar, D. Bacterial Cell Wall Material Properties Determine *E. Coli* Resistance to Sonolysis. *Ultrason Sonochem* **2022**, *83*, 105919. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.105919>.
- (249) *ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed 2023-05-26).
- (250) Vivas, R.; Barbosa, A. A. T.; Dolabela, S. S.; Jain, S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. <https://home.liebertpub.com/mdr> **2019**, *25* (6), 890–908. <https://doi.org/10.1089/MDR.2018.0319>.
- (251) Makabenta, J. M. V.; Nabawy, A.; Li, C. H.; Schmidt-Malan, S.; Patel, R.; Rotello, V. M. Nanomaterial-Based Therapeutics for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Nature Reviews Microbiology* **2020**, *19* (1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0420-1>.
- (252) Zhao, Z.; Ukidve, A.; Kim, J.; Mitragotri, S. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell* **2020**, *181* (1), 151–167. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.001>.
- (253) Le, H.; Karakasyan, C.; Jouenne, T.; Cerf, D. Le; Dé, E. Application of Polymeric Nanocarriers for Enhancing the Bioavailability of Antibiotics at the Target Site and Overcoming Antimicrobial Resistance. *Applied Sciences* **2021**, *11* (22), 10695. <https://doi.org/10.3390/APP112210695>.
- (254) Tong, S. Y. C.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. *Staphylococcus Aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* **2015**, *28* (3), 603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- (255) Wang, J.; Wu, X.; Wang, C.; Rong, Z.; Ding, H.; Li, H.; Li, S.; Shao, N.; Dong, P.; Xiao, R.; Wang, S. Facile Synthesis of Au-Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application in Bacteria Detection via a SERS Method. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (31), 19958–19967. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B07528/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2016-07528U_0009.JPEG.

- (256) Nemr, C. R.; Smith, S. J.; Liu, W.; Mephram, A. H.; Mohamadi, R. M.; Labib, M.; Kelley, S. O. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Anal Chem* **2019**.
<https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.8B04792>/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2018-04792M_0004.JPEG.
- (257) Huo, D.; Ding, J.; Cui, Y. X.; Xia, L. Y.; Li, H.; He, J.; Zhou, Z. Y.; Wang, H. W.; Hu, Y. X-Ray CT and Pneumonia Inhibition Properties of Gold–Silver Nanoparticles for Targeting MRSA Induced Pneumonia. *Biomaterials* **2014**, *35* (25), 7032–7041.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.04.092>.
- (258) Kim, M. H.; Yamayoshi, I.; Mathew, S.; Lin, H.; Nayfach, J.; Simon, S. I. Magnetic Nanoparticle Targeted Hyperthermia of Cutaneous Staphylococcus Aureus Infection. *Ann Biomed Eng* **2013**, *41* (3), 598–609. <https://doi.org/10.1007/S10439-012-0698-X>/FIGURES/5.
- (259) Meeker, D. G.; Wang, T.; Harrington, W. N.; Zharov, V. P.; Johnson, S. A.; Jenkins, S. V.; Oyibo, S. E.; Walker, C. M.; Mills, W. B.; Shirtliff, M. E.; Beenken, K. E.; Chen, J.; Smeltzer, M. S. Versatility of Targeted Antibiotic-Loaded Gold Nanoconstructs for the Treatment of Biofilm-Associated Bacterial Infections. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1392047> **2018**, *34* (2), 209–219. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1392047>.
- (260) Wang, K. K.; Shin, E. P.; Lee, H. J.; Jung, S. J.; Hwang, J. W.; Heo, I.; Kim, J. H.; Oh, M. K.; Kim, Y. R. Target-Oriented Photofunctional Nanoparticles (TOPFNs) for Selective Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). *J Photochem Photobiol B* **2018**, *183*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOB.2018.04.037>.
- (261) Hussain, S.; Joo, J.; Kang, J.; Kim, B.; Braun, G. B.; She, Z. G.; Kim, D.; Mann, A. P.; Mölder, T.; Teesalu, T.; Carnazza, S.; Guglielmino, S.; Sailor, M. J.; Ruoslahti, E. Antibiotic-Loaded Nanoparticles Targeted to the Site of Infection Enhance Antibacterial Efficacy. *Nat Biomed Eng* **2018**, *2* (2), 95. <https://doi.org/10.1038/S41551-017-0187-5>.
- (262) Le, H.; Arnoult, C.; Dé, E.; Schapman, D.; Galas, L.; Le Cerf, D.; Karakasyan, C. Antibody-Conjugated Nanocarriers for Targeted Antibiotic Delivery: Application in the Treatment of Bacterial Biofilms. **2021**, *22*, 1639–1653. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00082>.
- (263) Lehar, S. M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K. K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W. L.; Hiroshi Morisaki, J.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B. C.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J. P.; Strandh, M.; Koefoed, K.; Andersen, P. S.; Flygare, J. A.; Wah Tan, M.; Brown, E. J.; Mariathasan, S. Novel Antibody–Antibiotic Conjugate Eliminates Intracellular S. Aureus. *Nature* *2015* *527*:7578 **2015**, *527* (7578), 323–328.
<https://doi.org/10.1038/nature16057>.
- (264) Sendi, P.; Proctor, R. A. Staphylococcus Aureus as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants. *Trends Microbiol* **2009**, *17* (2), 54–58.
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.11.004>.

- (265) Fraunholz, M.; Sinha, B. Intracellular Staphylococcus Aureus: Live-in and Let Die. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 43. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2012.00043>.
- (266) Peyrusson, F.; Varet, H.; Nguyen, T. K.; Legendre, R.; Sismeiro, O.; Coppée, J. Y.; Wolz, C.; Tenson, T.; Van Bambeke, F. Intracellular Staphylococcus Aureus Persists upon Antibiotic Exposure. *Nature Communications* **2020**, *11* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15966-7>.
- (267) Bowler, P. G.; Duerden, B. I.; Armstrong, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clin Microbiol Rev* **2001**, *14* (2), 244. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>.
- (268) Brogden, K. A.; Guthmiller, J. M.; Taylor, C. E. Human Polymicrobial Infections. *Lancet* **2005**, *365* (9455), 253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17745-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17745-9).
- (269) Townsend, S. A.; Evrony, G. D.; Gu, F. X.; Schulz, M. P.; Brown, R. H.; Langer, R. Tetanus Toxin C Fragment Conjugated Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Neurons. *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5176. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.011>.
- (270) Lyu, Y.; Martínez, Á.; D'incà, F.; Mancin, F.; Scrimin, P. The Biotin-Avidin Interaction in Biotinylated Gold Nanoparticles and the Modulation of Their Aggregation. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/NANO11061559>.
- (271) Henwood, S. Q.; Liebenberg, W.; Tiedt, L. R.; Lötter, A. P.; De Villiers, M. M. Characterization of the Solubility and Dissolution Properties of Several New Rifampicin Polymorphs, Solvates, and Hydrates. <http://dx.doi.org/10.1081/DDC-100108364> **2001**, *27* (10), 1017–1030. <https://doi.org/10.1081/DDC-100108364>.
- (272) Duskey, J. T.; Baraldi, C.; Gamberini, M. C.; Ottonelli, I.; Ros, F. Da; Tosi, G.; Forni, F.; Vandelli, M. A.; Ruozi, B. Investigating Novel Syntheses of a Series of Unique Hybrid PLGA-Chitosan Polymers for Potential Therapeutic Delivery Applications. *Polymers* **2020**, *12* (4), 823. <https://doi.org/10.3390/POLYM12040823>.
- (273) Sharma, A.; Puri, V.; Kumar, P.; Singh, I.; Huanbutta, K. Development and Evaluation of Rifampicin Loaded Alginate–Gelatin Biocomposite Microfibers. *Polymers* **2021**, *13* (9), 1514. <https://doi.org/10.3390/POLYM13091514>.
- (274) Snejdrova, E.; Loskot, J.; Martiska, J.; Soukup, T.; Prokes, L.; Frolov, V.; Kucera, T. Rifampicin-Loaded PLGA Nanoparticles for Local Treatment of Musculoskeletal Infections: Formulation and Characterization. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *73*, 103435. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103435>.
- (275) Makino, K.; Nakajima, T.; Shikamura, M.; Ito, F.; Ando, S.; Kochi, C.; Inagawa, H.; Soma, G. I.; Terada, H. Efficient Intracellular Delivery of Rifampicin to Alveolar Macrophages Using Rifampicin-Loaded PLGA Microspheres: Effects of Molecular Weight and Composition of PLGA on Release of Rifampicin. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2004**, *36* (1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2004.03.018>.

- (276) Lobritz, M. A.; Belenky, P.; Porter, C. B. M.; Gutierrez, A.; Yang, J. H.; Schwarz, E. G.; Dwyer, D. J.; Khalil, A. S.; Collins, J. J. Antibiotic Efficacy Is Linked to Bacterial Cellular Respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112* (27), 8173–8180. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1509743112>.
- (277) Winston, L. G.; Deck, D.; Bolger, A. F. ENDOCARDITIS. *Pharmacol Ther* **2009**, 1121–1140. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3291-5.50085-8>.
- (278) Ding, X.; Yang, C.; Moreira, W.; Yuan, P.; Periaswamy, B.; Florez de Sessions, P.; Zhao, H.; Tan, J.; Lee, A.; Xun Ong, K.; Park, N.; Chang Liang, Z.; Hedrick, J. L.; Yan Yang, Y.; Ding, X.; Yuan, P.; Zhao, H.; Yang, C.; Periaswamy, B.; Tan, J.; Lee, A.; Liang, Z. C.; Yang, Y. Y.; Moreira, W.; Ong, K. X.; de Sessions, P. F.; Park, N.; Hedrick, J. L. A Macromolecule Reversing Antibiotic Resistance Phenotype and Repurposing Drugs as Potent Antibiotics. *Advanced Science* **2020**, *7* (17), 2001374. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202001374>.
- (279) Rendueles, O.; Travier, L.; Latour-Lambert, P.; Fontaine, T.; Magnus, J.; Denamur, E.; Ghigo, J. M. Screening of Escherichia Coli Species Biodiversity Reveals New Biofilm- Associated Antiadhesion Polysaccharides. *mBio* **2011**, *2* (3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00043-11/-/DCSUPPLEMENTAL/MBIO.00043-11-SF06.PDF>.
- (280) Douthit, C.; Gudenkauf, B.; Hamood, A.; Mudaliar, N.; Caroom, C.; Jenkins, M. Effects of Powdered Rifampin and Vancomycin Solutions on Biofilm Production of Staphylococcus Aureus on Orthopedic Implants. *J Clin Orthop Trauma* **2020**, *11* (Suppl 1), S113–S117. <https://doi.org/10.1016/J.JCOT.2019.10.002>.
- (281) Laverty, G.; Alkawareek, M. Y.; Gilmore, B. F. The In Vitro Susceptibility of Biofilm Forming Medical Device Related Pathogens to Conventional Antibiotics . *Dataset Papers in Science* **2014**, *2014*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/250694>.
- (282) Thill, P.; Robineau, O.; Roosen, G.; Patoz, P.; Gachet, B.; Lafon-Desmurs, B.; Tetart, M.; Nadji, S.; Senneville, E.; Blondiaux, N. Rifabutin versus Rifampicin Bactericidal and Antibiofilm Activities against Clinical Strains of Staphylococcus Spp. Isolated from Bone and Joint Infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2022**, *77* (4), 1036–1040. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB486>.
- (283) Reiter, K. C.; Villa, B.; Paim, T. G. da S.; Sambrano, G. E.; de Oliveira, C. F.; d’Azevedo, P. A. Enhancement of Antistaphylococcal Activities of Six Antimicrobials against SasG-Negative Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus: An in Vitro Biofilm Model. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2012**, *74* (2), 101–105. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2012.05.034>.
- (284) Kong, C.; Chee, C. F.; Richter, K.; Thomas, N.; Abd. Rahman, N.; Nathan, S. Suppression of Staphylococcus Aureus Biofilm Formation and Virulence by a Benzimidazole Derivative, UM-C162. *Sci Rep* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-21141-2>.
- (285) Limoli, D. H.; Jones, C. J.; Wozniak, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* **2015**, *3* (3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.MB-0011-2014>.

- (286) Lajhar, S. A.; Brownlie, J.; Barlow, R. Characterization of Biofilm-Forming Capacity and Resistance to Sanitizers of a Range of *E. Coli* O26 Pathotypes from Clinical Cases and Cattle in Australia. *BMC Microbiol* **2018**, *18* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12866-018-1182-Z/FIGURES/4>.
- (287) UNE-EN ISO 10993-5:2009 *Evaluación biológica de productos sani...*
<https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?Tipo=N&c=N0044389>
(accessed 2023-02-28).
- (288) Prieto, M.; Rwei, A. Y.; Alejo, T.; Wei, T.; Lopez-Franco, M. T.; Mendoza, G.; Sebastian, V.; Kohane, D. S.; Arruebo, M. Light-Emitting Photon-Upconversion Nanoparticles in the Generation of Transdermal Reactive-Oxygen Species. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9* (48), 41737–41747.
https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B14812/SUPPL_FILE/AM7B14812_SI_001.PDF.
- (289) Vieira, A. C. C.; Magalhães, J.; Rocha, S.; Cardoso, M. S.; Santos, S. G.; Borges, M.; Pinheiro, M.; Reis, S. Targeted Macrophages Delivery of Rifampicin-Loaded Lipid Nanoparticles to Improve Tuberculosis Treatment. *Nanomedicine (Lond)* **2017**, *12* (24), 2721–2736.
<https://doi.org/10.2217/NNM-2017-0248>.
- (290) Lall, N.; Meyer, J. J. M.; Wang, Y.; Bapela, N. B.; Van Rensburg, C. E. J.; Fourie, B.; Franzblau, S. G. Characterization of Intracellular Activity of Antitubercular Constituents the Roots of *Euclea Natalensis*. *Pharm Biol* **2005**, *43* (4), 353–357.
<https://doi.org/10.1080/13880200590951829>.
- (291) International, A. *ASTM-E2180 Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials*.
<https://doi.org/10.1520/E2180-18>. (accessed 2023-07-19).
- (292) CLSI. *M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition.*; 2012.
- (293) Patel, J.; Cockerill, F.; Bradford, P.; Eliopoulos, G.; Hindler, J.; Jenkins, S.; Lewis, S.; Limbago, B.; Miller, A. Mo7 -A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptability Test for Bacteria That Growth Aerobically. *Clinical and Laboratory Standards Institute* **2015**, *35*.
- (294) Mendoza, G.; Regiel-Futyra, A.; Andreu, V.; Sebastián, V.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Arruebo, M. Bactericidal Effect of Gold-Chitosan Nanocomposites in Coculture Models of Pathogenic Bacteria and Human Macrophages. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9* (21), 17693–17701.
https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B15123/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2016-15123B_0006.JPEG.