

FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN IN VITRO DE UN SISTEMA CONJUGADO "QUITOSANO - ENROFLOXACINO" COMO ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS

Simone Angela Herrera Bejar^{a*}, Juan Reátegui Ordoñez^a, Víctor Pacheco Sánchez^a, Karin Vera López^a, Rita Nieto Montesinos^a, Arnaud Beduneau^b

^aLaboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa - Perú.

^bLaboratorio de Farmacia Galénica y Biofarmacia. Universidad de Franche-Comté. Besançon- Francia.

* simoneherrerabejar@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La endometritis, inflamación del endometrio usualmente debido a la persistencia de una infección o al retraso en la involución uterina, es uno de los principales factores que afectan la eficiencia reproductiva del vacuno lechero retrasando el retorno de la vaca en sus actividades reproductivas. En ausencia de signos clínicos de endometritis, las modificaciones del endometrio uterino pueden ser definidas como endometritis subclínicas (ES) que se caracterizan por la presencia y aumento de Polimorfo Nucleares Neutrófilos (PMN) en el lumen uterino sin descargas purulentas.

Ya que las empresas ganaderas de producción láctea requieren que sus vacas se preñen en el menor tiempo posible para lograr la mayor eficiencia reproductiva y productiva de sus hatos lecheros, la endometritis, una de las patologías reproductivas, repercuten de manera negativa sobre esa performance.

Además, en el útero con ES, las bacterias forman biofilms para sobrevivir. Estas permiten el intercambio de material genético y evitan la exposición a antibióticos, lo que conduce a la resistencia a estos fármacos. En paralelo, la vía intrauterina, ampliamente utilizada para la administración de antibióticos en la ES, tiene un mecanismo propio de limpieza. Esto ocasiona que las formas farmacéuticas convencionales como bolos intrauterinos, geles o espumas presenten un corto tiempo de residencia intrauterina. Adicionalmente, algunos antibióticos poseen un tiempo de vida media corto. Por lo tanto, la administración de fármacos en la ES se traduce en procedimientos repetitivos, complejos, caros y que sobretodo producen stress en las vacas.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue formular un sistema conjugado de liberación controlada entre el quitosano, biopolímero de propiedades mucoadhesivas, antiinflamatorias y antibacterianas, y el enrofloxacin, fluoroquinolona de uso veterinario de alta absorción y biodisponibilidad; y evaluar *in vitro* su actividad antibacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

El conjugado se obtuvo mediante una reacción entre el ácido carboxílico del enrofloxacin y el grupo amino del quitosano usando N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y N-hidroxisuccinimida, como agentes activantes, luego se realizó una purificación del conjugado en dos pasos. Finalmente, se efectuó un procedimiento de secado en el liofilizador modelo AlpHa 1-4 Ldplus. Se estudió la talla y el potencial zeta del conjugado mediante un Zetasizer

nanoZS® marca Malvern Instruments. La cuantificación del enrofloxacin contenido en el sistema conjugado se realizó por fluorescencia, mediante un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan Flash marca Thermo scientific, a una longitud de onda de excitación y emisión de 274 nm y 450 nm respectivamente. Actualmente, se está desarrollando la implementación de la prueba para determinar la cantidad mínima inhibitoria del conjugado a tres bacterias (*Trueperella pyogenes*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium necrophorum*) encontradas en endometritis subclínica. El método de elección para esta prueba fue el de microdilución o dilución en caldo.

RESULTADOS

El conjugado presenta una talla de 459.4 ± 74.39 nm y una carga positiva, lo cual le confiere a la formulación propiedades mucoadhesivas sobre las células de endometrio que presentan carga negativa. Adicionalmente, el conjugado presenta 23.1 ± 1.95 µg de enrofloxacin por mL de formulación. Este resultado es mayor al obtenido en la prueba de microdilución en caldo Müller-Hinton que se usó para determinar la concentración mínima inhibitoria del enrofloxacin a las cepas mencionadas. Actualmente, se está desarrollando la implementación de la prueba de susceptibilidad *in vitro* bacteriana; donde se evaluará si la acción de las proteasas bacterianas contenidas en el biofilm rompe el enlace amida y liberan el fármaco. En resultados preliminares se observa un sinergismo entre el quitosano y enrofloxacin como conjugado frente al enrofloxacin solo, además, el método de conjugado no altera la acción antibacteriana, lo que se tendrá que corroborar en posteriores estudios.

CONCLUSIONES

Se logró el conjugado quitosano-enrofloxacin mediante una reacción de conjugación usando dos agentes activantes de los grupos amino del quitosano y el grupo carboxilo del enrofloxacin, esto se demostró mediante la cuantificación directa por medio de fluorescencia del fármaco contenido en el conjugado. El resultado fue de 23.1 µg/mL de enrofloxacin en la formulación final. Además, en resultados preliminares se demostró que el conjugado posee igual o mayor actividad antimicrobiana frente al enrofloxacin libre. El método de conjugación no altera la actividad antimicrobiana del enrofloxacin y además existe un efecto sinérgico entre polímero y fármaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reátegui J, Arenas E, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini P. Impacto de la endometritis subclínica en la performance reproductiva de vacas lecheras. *Spermova*, 2015. 5(1): p. 15 - 19.
2. Troughon T., Lefebvre S. a Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 6, 40-58.
3. Liu, X.F.; Guan, Y.L.; Yang, D.Z.; Li, Z.; de Yao, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 79, 1324–1335.
4. Lihua Ma, Baosheng Liu, Chundan Wang, Hongcai Zhang, Xu Cheng. The Investigation of Fluorescence Spectra and Fluorescence Quantum Yield of Enrofloxacin. *Journal of Chemical, Environmental and Biological Engineering*. Vol. 2, No. 1, 2018, pp. 11-16.
5. Patel J., Miller L., Cockerill F., Nicolau D., Bradford P., Powell M., Eliopoulos G., Swenson J., Hindler J., Traczewski M., Jenkins S., Turnidge J., Lewis J., Weinstein M., Limbago B.,

Zimmer B. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition Volume 35 Number 2, 2015.

6. Bonnet R, Bru Jp, Caron F, Cattoen C, Cattoir V, Courvalin P, Dubreuil L, Jarlier V, Lefort A, Merens A, Plesiat P, Ploy M, Soussy C, Varon E, Weber P. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2019 V.1.0 Janvier. CA-SFM / EUCAST 2019.

Tabla 1. Cuantificación directa de Enrofloxacin en la formulación final por fluorescencia (n=3)

Formulación	Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS:Quitosano	µgENR/mL
F5	0.5:2:2:2.5	23.1 ± 1.95

Tabla 2. Tamaño, PDI y potencial zeta del sistema conjugado "Quitosano-Enrofloxacin" (n=3)

Formulación	Composición (mg/mL) ENR:EDC:NHS:Quitosano	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
F5	0.5:2:2:2.5	2.73±74.39	6±0.01	30.0±5.05

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formulación del sistema conjugado polímero-fármaco "Quitosano-Enrofloxacin"

Figura 2. Purificación del sistema conjugado polímero-fármaco "Quitosano-Enrofloxacin"

Figura 3. Reacción de conjugación.

Figura 4. Implementación de la prueba de microdilución o dilución en caldo.

a. Preparación de placas de poliestireno de 96 hoyos

b. Preparación de inóculo bacteriano y posterior incubación de las placas de poliestireno a 35°C.