

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**"Efecto antimicrobiano de nanopartículas de quitosano y
extractos naturales acuosos en *Mycobacterium tuberculosis*"**

TESIS
que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

QFB. Olivas Flores Jocelyn

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de tesis

MSP. José Román Chávez Méndez
Codirector de tesis

Tijuana B. C. septiembre 2021

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Folio No. 310

Tijuana, B.C., a 08 de septiembre del 2021

C. Jocelyn Olivas Flores
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente.-

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción: TESIS

Es propuesto, por los C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo y
MSP. José Román Chávez Méndez

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema: "Efecto antimicrobiano de nanopartículas de quitosano y
extractos naturales acuosos en Mycobacterium tuberculosis"

, el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. MARCO TEÓRICO
- III. METODOLOGÍA
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V. CONCLUSIONES
- VI. REFERENCIAS
- VII. APÉNDICES



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis

MSP. José Román Chávez Méndez
Co-Director de Tesis

M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director Provisional

DEDICATORIA

A mi madre, mis tíos y mi abuela, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos, quienes estuvieron de mi lado en cada momento y me apoyaron en todos los sentidos, dándome ánimos para seguir adelante e inspirándome a ser mejor.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis docentes y tutores, en especial al Dr. José Manuel Cornejo, a quien le doy mi respeto y admiración por ser una de las personas mas inteligentes que conozco y al MSP. José Román Chávez, por ser mi guía durante todo este proceso y por todo su apoyo y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los dos años del posgrado para el grado de maestría correspondiente al numero de apoyo 744499.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Baja California, tanto a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQI) Campus Tijuana como al Centro de Ciencias de la Salud (CISALUD) en Unidad Valle de las Palmas, por abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de sus instalaciones.

Agradezco a todos mis profesores, por su paciencia, dedicación, y todo el conocimiento que me aportaron en este proceso, en especial a la Dra. Nydia Castillo, quién con la enseñanza de sus valiosos conocimientos me permitió crecer y desarrollarme como profesional, por su apoyo incondicional y su amistad.

A mi familia, por siempre apoyarme y creer en mí incluso cuando yo dudaba, y a mis amigos, especialmente mis compañeros de maestría, por su cariño y apoyo incondicional, por estar conmigo en todo momento y apoyarme con cada duda.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al MSP. José Román Chávez, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE GRÁFICAS	XII
LISTA DE APÉNDICES	XII
RESUMEN	XIII
<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1. Antecedentes	2
1.2. Justificación	5
1.3. Hipótesis	8
1.4. Objetivo general	8
1.5. Objetivos específicos	8
<i>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</i>	<i>10</i>
2.1 Tuberculosis: una enfermedad a nivel mundial	10
2.1.1 Epidemiología de la tuberculosis a nivel mundial	12
2.1.1.1 Epidemiología de la tuberculosis en el continente americano	12
2.1.1.2 Epidemiología de la tuberculosis a nivel nacional y estatal	14
2.1.2 Mecanismo de transmisión y patogénesis de la tuberculosis	15
2.1.3 Tratamiento de la tuberculosis	17
2.1.4 Mecanismo de acción de los fármacos y farmacorresistencia	18
2.1.4.1 Fármacos de primera línea	19

2.1.4.1.1 Isoniacida (INH)	19
2.1.4.1.2 Rifampicina (RIF)	20
2.1.4.1.3 Pirazinamida (PZA)	20
2.1.4.1.4 Etambutol (EMB)	21
2.1.4.1.5 Estreptomicina (S)	22
2.1.4.2 Fármacos de segunda línea	23
2.1.4.2.1 Fluoroquinolonas	23
2.1.4.2.2 Aminoglucósidos	23
2.1.4.2.3 Etionamida (Eto), protionamida (Pto)	24
2.1.4.2.4 Ácido paraaminosalicílico (PAS)	25
2.1.4.2.5 Cicloserina (Cs)	26
2.1.4.2.6 Bedaquilina	26
2.2 Quitosano: propiedades y aplicaciones	29
2.2.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano	29
2.2.2 Sistemas nanoestructurados de quitosano	34
2.2.3 Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano	36
2.2.4 Técnicas de caracterización de nanopartículas	39
2.2.5 Actividad antibacteriana y antifúngica del quitosano como sistema nanoestructurado	42
2.3 Extractos naturales con efectos antimicrobianos	48
2.3.1 <i>Allium sativum</i> y sus componentes	50
2.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i>	51
2.4.1 Métodos de difusión	52
2.4.2 Métodos de dilución	54
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	58
3.1 Síntesis de nanopartículas por el método de gelificación ionotrópica	58
3.2 Caracterización de nanopartículas de quitosano	60
3.2.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)	60

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM)	61
3.3 Extracción acuosa de productos naturales	61
3.4 Obtención de muestras clínicas de tuberculosis	62
3.4.1 Tipos de muestra y criterios de aceptación	62
3.5 Bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis	64
3.6 Baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen	66
3.7 Aislamiento y cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en medio sólido Löwenstein-Jensen (LJ)	69
3.7.1 Preparación del medio sólido LJ	69
3.7.2 Inoculación e incubación	70
3.8 Capacidad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano <i>in vitro</i>	71
3.8.1 Método de difusión en disco	71
3.8.2 Método de microdilución en caldo	73
3.9 Actividad antimicobacteriana nanopartículas de quitosano <i>in vitro</i>	75
3.9.1 Método de difusión en disco	75
3.9.2 Método de proporciones en medio sólido	77
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	82
4.1 Síntesis de las nanopartículas de quitosano	82
4.2 Influencia del cambio de pH sobre las cargas superficiales	86
4.3 Estabilidad de las nanopartículas conservadas en solución	88
4.5 Microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM)	92
4.5 Pruebas de inhibición antibacteriana <i>in vitro</i>	93
4.5.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco	93
4.5.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de microdilución en caldo	95
4.5.3 Pruebas de inhibición de extractos naturales	98

	102
4.6 Baciloscopia y cultivo de muestras clínicas para detección y aislamiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	103
4.7 Pruebas antimicobacterianas en medios sólidos	106
4.7.1 Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco en agar LJ	106
4.7.2 Pruebas de susceptibilidad por el método de las proporciones	107
<i>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</i>	114
<i>CAPÍTULO VI: REFERENCIAS</i>	116
<i>CAPÍTULO VII: APÉNDICES</i>	129

ABREVIATURAS

Am	Amikacina
AS	Agar Sangre
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Capreomicina
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Cs	Cicloserina
CSB	Cabina de Seguridad Biológica
DA	Grado de desacetilación
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EMB	Etambutol
Eto	Etionamida
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HMWC	Quitosano de alto peso molecular
INH	Isoniacida
Km	Kanamicina
Lfx	Levofloxacin
LJ	Löwenstein-Jensen
LMWC	Quitosano de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacáridos
Mfx	Moxifloxacin
MHA	Agar Mueller-Hinton
MHB	Caldo Mueller-Hinton

MMWC	Quitosano de peso molecular medio
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBH	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
NaCl	Cloruro de sodio
NAD⁺/NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NaOH	Hidróxido de sodio
NPQ	Nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio
Ofx	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAS	Ácido paraaminosalicílico
PDI	Índice de polidispersidad
PM	Peso Molecular
Pto	Protionamida
PZA	Pirazinamida
REMA	Ensayo de Placa de Microtitulación de Resazurina
RIF	Rifampicina
S	Streptomycinina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
STEM	Microscopía electrónica de barrido y transmisión
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis Multifarmacorresistente
TB-MR	Tuberculosis Multirresistente
TB/VIH	Coinfección de Tuberculosis y VIH
TPP	Tripolifosfato de sodio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Adhikari and Yadav, 2018).....	30
Figura 2. Estructura química del quitosano que muestra grupos N-acetilo residuales de la quitina original (Islam, Dmour and Taha, 2019).	30
Figura 3. Versatilidad del quitosano en diferentes ambientes de pH. Modificada de (Kumirska et al., 2011).	32
Figura 4. Ilustración esquemática de la síntesis de nanopartículas por el método de gelificación ionotrópica. Modificada de (Yanat and Schroën, 2021).	38
Figura 5. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias gramnegativas. Modificada de (Ke et al., 2021).	44
Figura 6. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias grampositivas. Modificada de (Ke et al., 2021).	44
Figura 7. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre hongos. Modificada de (Ke et al., 2021).	45
Figura 8. Micrografía electrónica de las nanopartículas de quitosano/TPP.	92
Figura 9. Pruebas de susceptibilidad de las nanopartículas por difusión en disco en placa de MHA en cultivos de <i>E. coli</i> (a), <i>S. aureus</i> (b) <i>C. albicans</i> (c) y <i>E. faecalis</i> (d).	94
Figura 10. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de extractos de <i>Allium sativum</i> , <i>Allium neapolitanum</i> y <i>Allium sphaerocephalon</i> por difusión en disco en placa de MHA sobre <i>E. coli</i> (a), <i>S. aureus</i> (b) <i>C. albicans</i> (c) y <i>E. faecalis</i> (d).	99
Figura 11. Pruebas de susceptibilidad de polvo de <i>Allium sativum</i> por difusión en disco en placa de agar MH sobre <i>E. coli</i> (a), <i>S. aureus</i> (b) <i>C. albicans</i> (c) y <i>E. faecalis</i> (d).	102
Figura 12. Cultivos de muestras clínicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con crecimiento en monocapa (a y b) y crecimiento típico (c y d).	105
Figura 13. Prueba de susceptibilidad de las nanopartículas por difusión en disco en placa de agar LJ una cepa clínica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	107
Figura 14. Prueba de susceptibilidad de las nanopartículas por el método de las proporciones en agar sangre 5% frente a cepa clínica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de acción y genes de resistencia de los medicamentos más utilizados para el tratamiento de la tuberculosis. _____	27
Tabla 2. Variaciones de tamaño de las NPQ en relación a las concentraciones de NaCl en el proceso de síntesis. _____	83
Tabla 3. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.1%. _____	85
Tabla 4. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.2%. _____	85
Tabla 5. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.3%. _____	85
Tabla 6. Respuesta de las propiedades fisicoquímicas de las NPQ sometidas a cambios de pH. _____	87
Tabla 7. Estabilidad de las nanopartículas de quitosano/TPP conservadas en solución a pH 4. _____	89
Tabla 8. Porcentajes de rendimiento de las nanopartículas de quitosano/TPP. _____	90
Tabla 9. Resuspensión de las nanopartículas liofilizadas en ácido acético al 0.05%. ____	91
Tabla 10. Valores de CMI de las nanopartículas de quitosano/TPP en µg/mL. _____	96
Tabla 11. Valores de CMB de las nanopartículas de quitosano/TPP en µg/mL. _____	96
Tabla 12. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de extractos acuosos simples de distintos tipos de ajo mediante difusión en disco (la concentración final de cada disco fue de 300 µg). _____	98
Tabla 13. Zonas de inhibición de polvo de <i>Allium sativum</i> por el método de difusión en disco (la concentración final de cada disco fue de 100 µg). _____	101
Tabla 14. Cálculo e interpretación de resultados del crecimiento bacteriano en las placas de agar conteniendo NPQ con un tamaño de 116.6 nm. _____	108

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tamaño de nanopartícula vs concentración de NaCl. _____	83
Gráfica 2. Tamaño y potencial Z vs pH de las NPQ _____	88
Gráfica 3. Tamaño vs día _____	89
Gráfica 4. Resultados del diagnóstico de TB por baciloscopia y cultivo. _____	104

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Resumen gráfico de las pruebas de sensibilidad mediante el método de las proporciones para Mtb descrito en (OPS and OMS, 2017).	129
Apéndice 2. Identificación de BAAR mediante la tinción de Zihel-Neelsen en los controles de crecimiento de las pruebas de susceptibilidad, correspondiendo al control de crecimiento de las pruebas en NPQ1 (a), NPQ2 (b), NPQ3 (c) y NPQ4 (d).	130

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio, con variaciones de tamaño, sobre *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* y aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), así como el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de productos naturales.

Metodología: Se sintetizaron nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio mediante el método gelificación ionotrópica y se caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM). Se obtuvieron extractos acuosos de *Allium sativum* mediante el método de decocción. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo para obtener concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) frente a *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* a distintas concentraciones y tamaños (en un rango de 80-300 nm) y el método de proporciones en agar sangre para evaluar su actividad antimicobacteriana.

Resultados: Las nanopartículas de quitosano inhibieron a Mtb a 300 µg/mL con un tamaño de partícula de 116.6 nm y a 400 µg/mL con un tamaño de 364.4 nm. Se determinó la CMI y CMB contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* en cuatro tamaños distintos de nanopartículas presentando mayor actividad las nanopartículas de mayor tamaño (entre

200-280 nm), y el extracto de *Allium sativum* (ajo) generó halos de inhibición mediante el método de difusión en disco estas cepas a una concentración de 100 µg/mL.

Conclusiones: Las nanopartículas de quitosano poseen capacidad antimicrobiana contra las bacterias grampositivas, gramnegativas, un hongo y Mtb a concentraciones altas. De igual manera el extracto acuoso de ajo generó halos de inhibición, no obstante, al presentarse inestable en solución podrían mejorarse sus propiedades cargando el producto en las nanopartículas como un sistema de liberación del extracto y conservación de sus propiedades antimicrobianas.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha habido un interés cada vez mayor en el uso de nanopartículas en diferentes aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos, debido a que éstas presentan propiedades fisicoquímicas únicas, como una mayor área de superficie que les permite absorber grandes cantidades de diferentes moléculas, como fármacos, y luego esparcir estas moléculas absorbidas simplemente por el torrente sanguíneo.

La tuberculosis (TB) es clasificada como una de las enfermedades contagiosas más mortales a nivel mundial y es considerada endémica en el estado de Baja California. El régimen de tratamiento convencional aprobado, aunque es la única opción viable disponible, tiene un impacto desfavorable en la calidad de vida del individuo afectado, por lo que existe una demanda incesante de más alternativas terapéuticas, en especial en países en desarrollo como lo es México. Por lo tanto, se realizan esfuerzos continuos sustanciales para encontrar estrategias novedosas para frenar la enfermedad, siendo la nanotecnología y los productos naturales el trampolín. Este enfoque es fundamental para superar las anomalías asociadas con la terapia convencional debido a sus atributos intrigantes y conduce a la optimización del efecto terapéutico.

1.1. Antecedentes

El quitosano es uno de los biopolímeros naturales más funcionales y abundantes en el mundo. Ha sido ampliamente utilizado en el campo farmacéutico debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y sus inmensas posibilidades estructurales de modificación química y mecánica para generar nuevas propiedades y funciones. Estos privilegios lo han conducido a su aplicación en la síntesis de nanopartículas como sistemas de liberación en la farmacoterapia durante las últimas dos décadas. El quitosano nanoestructurado posee propiedades físicas y químicas superiores en comparación con el quitosano puro, tales como alta área superficial, porosidad, resistencia a la tracción, conductividad, propiedades fotoluminiscentes y mecánicas (Shukla *et al.*, 2013).

Se han reportado distintas aplicaciones y propiedades sobre el quitosano y sus modificaciones nanoestructurales. Se encontró que el quitosano de bajo peso molecular puede penetrar en las paredes celulares bacterianas, unirse al ADN e inhibir la transcripción del ADN y la síntesis de ARNm (Sudarshan, Hoover and Knorr, 1992), mientras que el quitosano de alto peso molecular puede unirse a los componentes cargados negativamente en la pared celular bacteriana, formando una capa impermeable alrededor de la célula y cambiando su permeabilidad, bloqueando así el transporte hacia la célula (Cheung *et al.*, 2015).

Con el fin de mejorar la farmacoterapia de la tuberculosis se han realizado estudios aprovechando la capacidad de incorporar medicamentos en nanosistemas para la

administración de fármacos dirigidos a las células. Garg, Rath, y Goyal reportaron nanopartículas de quitosano inhalables secadas por aspersión para la administración sostenida de fármacos antituberculosos (isoniazida y rifampicina) a los pulmones. Los resultados mostraron que las nanopartículas obtenidas tenían una forma esférica lisa con un tamaño promedio de $230 \pm 4,5$ nm, y demostraron, mediante pruebas *in vivo* en ratas, la acumulación de los fármacos en varios órganos (pulmones, hígado, bazo y riñón) hasta 24 horas después de la nebulización (Garg, Rath and Goyal, 2015).

Scolari, Páez, Sánchez-Borzone, y Granero diseñaron un sistema de nanopartículas para la administración por inhalación de rifampicina en combinación con ácido ascórbico constituido por alginato de sodio recubierto con quitosano y Tween 80 para el tratamiento de la infección tuberculosa pulmonar. Presentaron un tamaño de partícula promedio de 324.0 ± 40.7 nm, un índice de polidispersidad (PDI) de 0.226 ± 0.030 y un potencial Z de -28.52 ± 0.47 mV con superficie hidrofílica. Descubrieron que el sistema nanoportador resultó menos citotóxico que el fármaco libre y mostraró actividad significativamente mejorada contra nueve cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en comparación con el medicamento libre (Scolari *et al.*, 2019).

En otro estudio Wardani, Mahmiah, y Sudjarwo sintetizaron nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio con diámetros medios de alrededor de 500 nm, reportando propiedades antimicobacterianas por sí mismas con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1200 µg/ml y una concentración mínima bactericida (CMB) de 2400 µg/ml para Mtb H37Rv (Wardani, Mahmiah and Sudjarwo, 2018), concluyendo el posible

potencial del quitosano como fuente de compuestos que pueden desarrollarse aún más en fármacos antimicobacterianos.

Referente al uso de productos naturales como potencial agente antituberculosos se presentó el primer informe por Nair, Gaikwad, Kulkarni, y Mukne del extracto de ajo (*Allium sativum*) y sus componentes sobre la actividad antituberculosa intracelular. Se reportó que el extracto completo de *Allium sativum* mostró una mejor actividad contra Mtb H37Rv que sus constituyentes aislados, evaluado mediante el ensayo de placa de microtitulación de resazurina (REMA). Los medicamentos estándar (isoniazida, rifampicina y etambutol) mostraron una CMI significativamente mas baja en comparación con el extracto. Sin embargo, cuando se probó en macrófagos de ratón RAW 264.7 infectados con Mtb, el extracto a una concentración de 50 µg/ml mostró una actividad comparable a la rifampicina (10 µg/ml) y significativamente mejor que la isoniacida (10 µg/ml) y el etambutol (10 µg/ml) (Nair *et al.*, 2017). Con esto concluyeron que la actividad antituberculosa intracelular del extracto natural en macrófagos combinada con baja citotoxicidad lo convierte en un candidato adecuado para un mayor desarrollo como agente antituberculoso.

1.2. Justificación

La TB continúa siendo un desafío para la salud pública mundial, ya que, debido a su tratamiento prolongado, es una enfermedad difícil de controlar. Por lo general del 80 al 90% de los pacientes con TB sensible a los medicamentos se curan después de recibir de 6 a 8 meses de tratamiento antibiótico intensivo. Sin embargo, los efectos secundarios de los cócteles de las terapias con antibióticos utilizados han ocasionado problemas de falta de adherencia o pérdida en el seguimiento del tratamiento, aumentando el número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistente a los medicamentos (Mainbourg, Belchior and Goncalves, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 10.0 millones de personas enfermaron de TB en el año 2018, siendo una de las 10 principales causas de mortalidad y la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso (clasificada por encima del VIH/SIDA) a nivel mundial. En México la tasa de incidencia de casos de tuberculosis pulmonar para la semana 52 del 2018 fue de 14.0 casos por cada 100,000 habitantes. Baja California registra una elevada incidencia de tuberculosis, entidad federativa que ocupa el primer lugar a nivel nacional de infección por Mtb en todas las formas. La tasa de incidencia para la semana 52 del 2018 fue de 45.7 casos por cada 100,000 habitantes. La tuberculosis es considerada endémica en el estado, y Tijuana se considera como la ciudad que ha recibido el peor de los golpes por esta enfermedad durante más de dos décadas (Boletín Epidemiológico, 2018).

Cada año se diagnostican y tratan eficazmente millones de personas con TB, se estima que entre el 2000 y 2019 se salvaron 60 millones de vidas gracias al diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis, pero sigue habiendo grandes brechas en la detección y el tratamiento (OMS, 2020).

La utilización de estrategias diferentes para el manejo de la enfermedad es un aspecto importante de su combate. El uso de productos naturales como medicina tradicional se ha descrito a lo largo de la historia desde las primeras civilizaciones de China, India y el Oriente, pero sin duda es un arte tan antiguo como la humanidad. La última década evidentemente ha sido testigo de un enorme aumento en la aceptación y el interés público en las terapias naturales tanto en los países en desarrollo como en los países desarrollados. La utilización de dichos productos naturales es generalmente más barata, más efectiva y con menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos sintéticos (Dias, Urban and Roessner, 2012; Ekor, 2013).

El quitosano se deriva de fuentes naturales entre los que se encuentran los exoesqueletos de los insectos, los artrópodos, las conchas de crustáceos, los mariscos como los camarones, langostinos, cangrejos y picos de cefalópodos, así como las paredes celulares de los hongos. A este compuesto se le ha descubierto propiedades antimicrobianas importantes que se atribuyen a sus propiedades de polielectrolito (Cheung *et al.*, 2015). Referente a la nanotecnología se ha reportado que la generación de sistemas nanoestructurados aumenta las propiedades de los polímeros para atacar a microorganismos en varios procesos celulares, entre los que se encuentra su capacidad de interrumpir procesos

bioquímicos importantes mediante su interacción con el ADN y proteínas; esta actividad en diversas ocasiones se ha visto relacionada con el tamaño y estructura de los nanocompuestos (Sudarshan, Hoover and Knorr, 1992).

Las nanopartículas de quitosano se pueden preparar fácilmente mediante el método de gelificación ionotrópica utilizando tripolifosfato de sodio (TPP) como agente reticulante. La ventaja de este método se atribuye a sus condiciones de procesamiento suaves y no tóxicas, evitando la aplicación de solventes orgánicos nocivos, calor o agitación vigorosa. Además, los efectos antimicrobianos de las nanopartículas a base de quitosano para los sistemas de administración de fármacos y sin fármacos se han investigado intensamente contra bacterias y hongos (Dounighi *et al.*, 2012; Ke *et al.*, 2021).

La utilización de las nanopartículas de quitosano como un agente antituberculoso ha sido investigado en el pasado (Garg, Rath and Goyal, 2015; Wardani, Mahmiah and Sudjarwo, 2018; Scolari *et al.*, 2019), sin embargo, aunque los estudios han mostrado evidencias importantes que apoyan su utilización con estos fines, no han sido concluyentes. Este estudio nos permitirá analizar los efectos antimicrobianos del tamaño de partícula sobre la capacidad inhibitoria microbiológica *in vitro* del quitosano nanoestructurado, con el fin de descubrir si este compuesto es un candidato para combatir la tuberculosis.

1.3. Hipótesis

Las nanopartículas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio preparadas por el método de gelificación ionotrópica, con variaciones de tamaño, y alguno de los extractos acuosos de productos naturales, presentan capacidad antimicrobiana, específicamente contra *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4. Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio con estructura esférica y variaciones de tamaño en el orden de 80 – 300 nm y la extracción acuosa de productos naturales para evaluar sus propiedades antimicrobianas mediante el método de difusión en disco y microdilución en caldo, y para su evaluación en cepas clínicas de Mtb el método de las proporciones en agar sangre.

1.5. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de quitosano con variación de tamaño en un rango de 80 – 300 nm por medio del método de gelificación ionotrópica con tripolifosfato de sodio.

2. Caracterizar las nanopartículas para evaluar su tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z (carga superficial) mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y su morfología mediante microscopía por transmisión electrónica de barrido (STEM).
3. Obtener extractos acuosos simples de productos naturales de uso común en la región.
4. Recolectar muestras clínicas de pacientes sospechosos de infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), diagnosticar mediante baciloscopia y cultivo en medio Löwenstein-Jensen (LJ) y almacenar los cultivos positivos para su uso posterior en pruebas de susceptibilidad.
5. Estandarizar el crecimiento de la micobacteria en medio LJ y en medio de Agar Sangre (AS) para su evaluación antimicrobiana por la técnica de difusión en disco.
6. Evaluar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas generadas (a distintos tamaños y concentraciones) y los extractos naturales acuosos *in vitro* contra cepas de referencia ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de difusión en disco.
7. Evaluar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas a distintos tamaños y concentraciones contra cepas de referencia ATCC de *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* y *S. aureus* mediante la técnica de microdilución en caldo.
8. Evaluar las propiedades antimicobacterianas de las nanopartículas de quitosano a de diferentes tamaños y concentraciones sobre aislados clínicos de Mtb mediante la técnica de difusión en disco en placa de medio LJ y mediante el método de las proporciones en AS.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Tuberculosis: una enfermedad a nivel mundial

La TB es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso. Es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que se transmite cuando las personas enfermas con TB expulsan bacterias al aire; por ejemplo, al toser. Típicamente afecta los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar), como el sistema nervioso, los huesos, la piel, los intestinos, los genitales y los ganglios. De todas las formas de tuberculosis, únicamente la pulmonar es contagiosa y por lo tanto la de mayor interés para su prevención y control debido al alto riesgo de contagio (UNAM, 2018).

Alrededor de una cuarta parte de la población mundial está infectada con Mtb y, por lo tanto, corre el riesgo de desarrollar la enfermedad. Con un diagnóstico oportuno y un tratamiento con antibióticos de primera línea durante 6 meses, la mayoría de las personas que desarrollan TB pueden curarse y reducir la transmisión de la infección. El número de casos que ocurren cada año (y, por lo tanto, el número de muertes relacionadas con TB) también puede disminuirse al reducir la prevalencia de factores de riesgo para la tuberculosis relacionados con la salud (por ejemplo fumar, diabetes e infección por VIH), brindando tratamiento preventivo a las personas con una infección tuberculosa latente y tomar medidas multisectoriales sobre determinantes más amplios de la infección y la enfermedad de la

tuberculosis (por ejemplo, pobreza, calidad de la vivienda y desnutrición) (Comisión de salud, 2019).

Cuando una persona respira la micobacteria, ésta puede asentarse en los pulmones y comenzar a crecer. A partir de ahí, puede moverse a través de la sangre e infectar otras partes del cuerpo, como el riñón, la columna vertebral y el cerebro. Los síntomas más característicos de la tuberculosis pulmonar son la tos y la expectoración que persisten por 2 semanas o más. Otras manifestaciones pueden ser pérdida de peso, sudores nocturnos y dolor de tórax. No todas las personas infectadas con tuberculosis desarrollan la enfermedad. Existen dos afecciones relacionadas con la tuberculosis: la infección de TB latente y enfermedad de TB. Durante la infección latente la bacteria de la tuberculosis puede vivir en el cuerpo hospedero sin enfermarlo, debido a que la mayoría de las personas que se infectan con la micobacteria logran combatirla y evitar que ésta se multiplique. En estos casos hay ausencia de sintomatología y la enfermedad no es transmisible, sin embargo, es posible llegar a desarrollarla si no se recibe tratamiento, aunque existen casos en los que nunca se desarrolla y la bacteria permanece inactiva durante toda la vida. Cuando las bacterias de la tuberculosis están activas (multiplicándose en el cuerpo), esto se llama enfermedad de tuberculosis. La enfermedad es activa cuando el sistema inmunitario no puede detener el crecimiento de las micobacterias. En estos casos la enfermedad se vuelve transmisible. Algunas personas desarrollan la enfermedad de la tuberculosis poco después de infectarse (en unas semanas) antes de que su sistema inmunitario pueda combatirla. Otras personas se enferman años después, cuando su sistema inmunitario se debilita por otra razón, como casos de inmunosupresión especialmente aquellos con infección por VIH (WHO, 2018).

2.1.1 Epidemiología de la tuberculosis a nivel mundial

A nivel mundial la OMS estima que 10.0 millones (rango, 9.0–11.1 millones) de personas enfermaron de TB en el año 2018, un número que se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. La carga de morbilidad varía enormemente entre países, desde menos de cinco hasta más de 500 casos nuevos por cada 100,000 habitantes por año, con un promedio mundial de alrededor de 130. Hubo un estimado de 1.2 millones de muertes por tuberculosis (rango, 1.1–1.3 millones) entre personas VIH negativas en 2018 (una reducción del 27% de 1.7 millones en el 2000), y 251,000 muertes adicionales (rango, 223,000–281,000) entre las personas VIH positivas (una reducción del 60% de 620,000 en el año 2000). En el 2018 se presentaron aproximadamente medio millón de casos nuevos de TB resistente a la rifampicina (de los cuales el 78% tenía TB multirresistente). Los tres países con la mayor parte de la carga mundial fueron India (27%), China (14%) y Federación de Rusia (9%). A nivel mundial, el 3,4% de los casos nuevos de TB y el 18% de los casos tratados previamente tenían TB multirresistente (TB-MR) o TB resistente a la rifampicina, con las proporciones más altas (> 50% en casos tratados previamente) en países de la antigua Unión Soviética (WHO, 2018).

2.1.1.1 Epidemiología de la tuberculosis en el continente americano

La epidemiología de la tuberculosis varía considerablemente entre los países de América Latina. Tres países, Brasil, Perú y México, representan poco más de la mitad de

todos los casos en las Américas. Perú tiene una tasa de incidencia de 116, Brasil 44 y México 22 por cada 100,000 habitantes. En toda América, la resistencia a los medicamentos presenta una crisis particular. En Perú, la tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR) representa el 9% de sus casos, en comparación con el 3% (cada uno) de Brasil y México. En el 2017, solo el 33% de los pacientes recibió pruebas de susceptibilidad a los medicamentos, lo que resultó en un estimado de 7,000 pacientes con tuberculosis resistente a los medicamentos que permanecen sin diagnosticar o sin tratar. Además, la proporción de resultados de tratamiento exitosos para la TB-MFR en las Américas en 2015 fue del 56%, con un 26% de pérdidas durante el seguimiento (Woodman, Haeusler and Grandjean, 2019).

La OMS estimó 282,000 casos nuevos y recaídas de TB para la región de las Américas en el 2017, un 3% de la carga mundial de TB (10 millones de casos) y una tasa de incidencia de 28 por 100,000 habitantes. En las Américas, la tasa de incidencia más alta se observó en el Caribe (61,2 por 100.000 habitantes), seguido de América del Sur (46,2), América Central y México (25,9) y Norte América (3,3).

Los casos de TB notificados (nuevos y recaídas) en 2017 fueron 228,943 en el continente, un 82% del total de casos estimados. La brecha en el diagnóstico no ha disminuido en los últimos años, alrededor de 50,000 casos, con un leve aumento entre 2016 y 2017 de 3,000 casos. El acceso universal a las pruebas de sensibilidad de fármacos es clave para mejorar la detección de casos TB resistente y multirresistente. En 2017 tan solo el 33% de los pacientes recibieron pruebas de sensibilidad, tres mil pacientes menos que en el año anterior. En los pacientes antes tratados el 45,8% accedieron a esta prueba (una mejoría del

18% respecto al 2016); sin embargo, en los casos nuevos disminuyó el acceso en un 11% (OPS | OMS, 2018).

2.1.1.2 Epidemiología de la tuberculosis a nivel nacional y estatal

En el 2017, en México se presentaron 17,120 casos nuevos de TB pulmonar lo que representa una tasa de 13.9 casos por cada 100 mil habitantes de los cuales se presentaron 1,688 defunciones para una tasa de 14 defunciones por cada 100 mil habitantes (Mota, Carlos and Ledezma, 2019).

Se ha reportado en el año 2018 un total de 22,173 casos nuevos de infección por tuberculosis. De dichos casos el 79.3% de ellos (17,582) son de tipo pulmonar, 2.1% (518) corresponden a tuberculosis meníngea y un 18.4% (4,073) a otros tipos de tuberculosis. De los casos presentados 337 resultaron ser cepas farmacorresistentes, 27.1% de los casos fueron asociados a diabetes, 7.5% se relacionaron a coinfección de tuberculosis y VIH (TB/VIH) y 3.4% (753) fueron casos pediátricos (menores de 15 años). Clasificando por grupos de edades hubo 1,914 (8.4%) casos en hombres y mujeres menores a 19 años, 16,933 (74.6%) casos en >20 y <64 años y 3,326 (15%) en mayores a 65 años. Para el 2017 se reportaron 2,006 defunciones por tuberculosis. La tasa de incidencia Nacional de casos de tuberculosis pulmonar para el 2010 fue de 13.8 casos por cada 100,000 habitantes. Los estados que tuvieron mayor incidencia de casos de tuberculosis pulmonar para el 2010 fueron Baja California con 41.1, Tamaulipas 32.9, Guerrero 31.7, Nayarit 29.0 y Sonora 28.9; y para la

semana 52 del 2018 fueron Baja California 45.7, Sonora 33.1, Tamaulipas 30.7, Guerrero 29.1 y Sinaloa 27.6 (Secretaría de Salud - Dirección General de Epidemiología, 2019).

En base a los casos nuevos reportados en México en el 2017, Sonora ocupa el 2° lugar a nivel nacional con 919 casos durante este año con una tasa de 30.9 casos por cada 100 mil habitantes y 94 defunciones con una tasa de 3.62 defunciones por cada 100 mil habitantes. Baja California ocupa el 1° lugar con una tasa de 44.5 casos por cada 100 mil habitantes (Mota, Carlos and Ledezma, 2019). En relación a casos de tuberculosis con resistencia a fármacos, del 2010 al 2018 se han registrado en promedio 250 casos por año en esta situación (ingresando a tratamiento el 86%) con esquemas de tratamiento específico con fármacos antituberculosos de segunda línea, con una conversión bacteriológica de 79% a los seis meses de haber iniciado su tratamiento y un éxito terapéutico del 71%. El 70% de la carga de tuberculosis con resistencia a fármacos se concentra en ocho entidades federativas: Nuevo León, Veracruz, Baja California, Guerrero, Tamaulipas, Puebla, Estado de México y Chiapas (Secretaría de Salud - Dirección General de Epidemiología, 2019).

2.1.2 Mecanismo de transmisión y patogénesis de la tuberculosis

La infección primaria ocurre por la inhalación del patógeno en partículas de aerosol provenientes de una persona infectada. Cuando las defensas de la inmunidad innata del hospedador fallan en eliminar la bacteria, el bacilo Mtb comienza su replicación en los macrófagos alveolares para después diseminarse a otros tejidos a través del torrente

sanguíneo y el sistema linfático. Esto induce una respuesta inflamatoria localizada que conduce al reclutamiento de células mononucleares de los vasos sanguíneos vecinos, proporcionando células huésped nuevas para la población bacteriana en expansión (Russell, Barry and Flynn, 2010).

Estas células son los componentes básicos del granuloma, que es la característica patológica definitoria de la enfermedad. Inicialmente el granuloma es una masa amorfa de macrófagos, monocitos y neutrófilos, sin embargo, los macrófagos se diferencian en varios tipos de células especializadas, que incluyen. Con el desarrollo de una respuesta inmune adquirida y la llegada de linfocitos, el granuloma adquiere una estructura más organizada y estratificada (Yuan and Sampson, 2018).

A medida que *Mtb* se multiplica y la inflamación se desarrolla, la estructura del granuloma madura. Con la formación de una capa fibrosa, los vasos sanguíneos dentro de la estructura comienzan a disminuir. La pérdida de vascularización conduce a necrosis y a un ambiente hipóxico, con la acumulación de cáseum en el núcleo del granuloma. En esta estructura sólida, el número de bacilos permanece constante y al menos algunas de las micobacterias entran en un estado persistente no replicante. La destrucción de *Mtb* por el macrófago está limitada en esta etapa debido a la inhibición de la producción de superóxido y óxido nítrico en el ambiente hipóxico. Además, durante esta etapa persistente, *Mtb* arresta la biogénesis del fagolisosoma para evitar el medio ambiente antimicobacteriano intracelular (Álvarez *et al.*, 2009).

2.1.3 Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento para la tuberculosis en México está establecido en la NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y el control de la tuberculosis, con el fin de uniformar los criterios y procedimientos del tratamiento. Los fármacos indicados como tratamiento de primera línea son isoniacida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) y estreptomicina (S). Como tratamiento de segunda línea se sugiere el uso de aminoglucósidos como kanamicina (Km) y amikacina (Am), sin diferencia de eficacia con la capreomicina (Cm), bacteriostáticos como etionamida (Eto), protionamida (Pto), cicloserina (Cs), terizidona (Trd) y ácido p-aminosalicílico (PAS), fluoroquinolonas como ofloxacina (Ofx), levofloxacina (Lfx) y moxifloxacina (Mfx).

El tipo de tratamiento se distingue mediante una clasificación en pirámide comenzando con el tratamiento primario acortado (para casos nuevos), con indicación de cuatro fármacos de primera línea (INH, RIF, PZA y EMB) por dos meses, y una fase de mantenimiento con H y R durante cuatro meses, finalizando el tratamiento con un periodo total de 6 meses. El retratamiento primario (en casos de abandono, recaída o reconquista) consiste en la administración de los cinco fármacos de primera línea (INH, RIF, PZA, EMB y S) durante dos meses, un mes excluyendo S y cinco meses con solo INH, RIF y EMB, con un periodo total de 8 meses. El retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea (en caso de fracaso al tratamiento y retratamiento primario) se indica por un periodo de 24 meses, en el que se administran Km o Am o Cm, Lfx, Pto, Cs, PZA, y EMB por seis meses, durante los 18 meses restantes solo se administran Lfx, Pto, Cs, PZA y EMB. Por último, se

encuentra el retratamiento individualizado con fármacos de segunda línea para tuberculosis multirresistente (TB-MR) o de acuerdo a antecedente de tratamiento, en el que se administran medicamentos de 2da línea y algunos clasificados como fármacos de eficiencia poco clara como clofazimina (Cfz), amoxicilina/clavulanato (Amx/Clv), claritromicina (Clr), linezolid (Lzd), tioacetazona (Th), imipenem/cilastatín (Ipm/Cln), dosis altas de isoniazida, y claritromicina (Clr). Sin embargo, por ser de poca eficacia no son recomendados por la OMS para su uso en pacientes con TB-MR (Diario Oficial de la Federación, 2013).

2.1.4 Mecanismo de acción de los fármacos y farmacorresistencia

Los principales mecanismos de acción de los fármacos antituberculosos son la acción bactericida, definida como su capacidad para matar rápidamente bacilos en crecimiento activo, tales como isoniacida y en menor grado, rifampicina y estreptomina; acción esterilizante, definida como su capacidad para matar los organismos semi-latentes (rifampicina y pirazinamida), y prevención de la aparición de resistencias bacilares a fármacos (isoniacida y rifampicina, en menor grado estreptomina, etambutol y pirazinamida) (Yew, Lange and Leung, 2011).

2.1.4.1 Fármacos de primera línea

2.1.4.1.1 Isoniacida (INH)

La INH es un profármaco que requiere una activación *in vivo*. La activación se lleva a cabo al ser captado por la bacteria por la enzima catalasa-peroxidasa (*katG*), transformándola a su forma activa (ácido nicotínico) que posteriormente se acopla con el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para formar un aducto, inhibiendo así la síntesis de los ácidos micólicos de la pared de Mtb. Una de las dianas intracelulares del derivado activo sería la reductasa de la proteína transportadora de ácidos grasos acilenólicos codificada por el gen *inhA*. La ausencia de actividad catalasa, debido a mutaciones en el gen *katG*, es uno de los mecanismos de resistencia a la isoniácida incapacitando la activación de la INH, sin embargo, mantiene el 50% de su actividad catalasa-peroxidasa, asegurando un nivel de protección oxidativa suficiente. Presenta actividad bactericida temprana más alta en casos de TB sensible a fármacos. En los primeros 2 días de tratamiento puede matar >95% de los bacilos que se encuentran en el esputo (bacterias extracelulares). Sin embargo, después de los primeros días de tratamiento, con la erradicación de la subpoblación que se replica activamente, la eficacia de INH comienza a disminuir. La implicación es que la INH tiene una eficacia limitada para matar y esterilizar Mtb no replicable en el pulmón (Coll, 2009; Dilia Fontalvo Rivera and Doris Gómez Camargo, 2015; Yuan and Sampson, 2018).

2.1.4.1.2 Rifampicina (RIF)

RIF es un antimicrobiano semisintético con actividad bactericida. Actúa como inhibidor de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) al unirse a la ARN polimerasa de la micobacteria, específicamente la fracción beta, inhibiendo la síntesis de proteínas. Presenta un efecto bactericida constante sobre las células de Mtb metabólicamente activas y acción esterilizante en las bacterias en estado de latencia (que sólo presentan ocasionalmente actividad metabólica), tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos. Este perfil da como resultado una esterilización excelente e implica que RIF también mata subpoblaciones no replicantes de Mtb en el pulmón (Silva Carlos *et al.*, 2007; Yuan and Sampson, 2018).

Las micobacterias adquieren resistencia a la RIF mediante mutaciones en una región definida de la subunidad β de la ARN polimerasa, que es codificada por el gen *rpoB*. Más del 96% de las cepas resistentes presentan mutaciones en esta región. La resistencia a la RIF se asocia a la resistencia a la INH en más del 95% de los casos, por lo que su detección constituye un marcador de multirresistencia (Coll, 2009).

2.1.4.1.3 Pirazinamida (PZA)

La PZA es un derivado sintético de la nicotinamida. Al ser un profármaco requiere un proceso de bioactivación por el efecto de la pirazinamidasa, que es la enzima que transforma la PZA en su metabolito activo, el ácido pirazinoico. Aunque su mecanismo de

acción no está completamente definido se han señalado múltiples objetivos celulares incluida la biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de NAD⁺, función de transporte de membrana y metabolismo de ARN y ADN. Posee un potente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes mediante la acumulación de su derivado activo intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo. Gracias a dicho efecto, cuando se usa en combinación con la RIF, acorta la duración del tratamiento de la tuberculosis no complicada a 6 meses (Zimhony *et al.*, 2007; Yuan and Sampson, 2018).

En los bacilos resistentes se han identificado interrupciones en el gen *pncA*, codificante de la enzima pirazinamidasa, con la subsecuente pérdida de la capacidad de activar el antibiótico. Entre el 72 y el 97% de las cepas resistentes posee mutaciones en este gen, no obstante, existen cepas resistentes que no presentan mutaciones, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con la permeabilidad o el eflujo (Coll, 2009).

2.1.4.1.4 Etambutol (EMB)

EMB es un compuesto sintético que actúa como bacteriostático, inhibiendo de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana al actuar sobre la arabinosil transferasa, que media la polimerización de la arabinosa en arabinogalactano. La resistencia se asocia a mutaciones en una región definida, el operón *embCAB*, que codifica a la enzima arabinosil transferasa. Entre el 47 y el 69% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes presenta mutaciones en la región *EmbB*. La resistencia de alto nivel se debe a un proceso múltiple que

incluye como primer paso una sobreexpresión de las proteínas Emb, para posteriormente añadirse mutaciones en la región *EmbB* o cambios adicionales en los niveles de expresión. En las cepas que no presentan mutaciones en la región *EmbB* la resistencia suele ser menor (Belanger *et al.*, 1996; Coll, 2009).

2.1.4.1.5 Estreptomicina (S)

Es un antibiótico aminoglicósido con acción bactericida. Fue el primer fármaco clínicamente eficaz que se dispuso para combatir la tuberculosis, actuando contra bacilos tuberculosos extracelulares de crecimiento rápido y en medio alcalino. Su mecanismo de acción se basa en la interferencia con la síntesis de proteínas ribosomales uniéndose al ARNr 16s ubicado en el componente 30s más pequeño del ribosoma bacteriano, deteniendo así la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la formación de enlaces peptídicos. En las micobacterias, el mecanismo conocido de resistencia es por alteración de la diana sobre la que actúan, generando mutaciones en los genes que codifican el ARNr 16s (*rrs*) y la proteína ribosómica S12 (*rpsL*). Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en el 52–59% de las cepas resistentes y producen una resistencia de alto nivel, mientras que las que afectan al gen *rrs* se observan en el 8–21% de las cepas y producen una resistencia de nivel intermedio (Coll, 2009; Johnson, 2017).

2.1.4.2 Fármacos de segunda línea

2.1.4.2.1 Fluoroquinolonas

En este grupo se encuentran la ciprofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina y gatifloxacina, como fármacos utilizados en caso de resistencia a los medicamentos de primera línea. La actividad de las fluoroquinolonas tiene lugar a nivel de la ADN-girasa, una topoisomerasa de tipo II que está compuesta por las subunidades A y B que están codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente, interfiriendo así con la replicación del ADN. El desarrollo de la resistencia a las quinolonas se debe a mutaciones que afectan la ADN-girasa o a proteínas de membrana que regulan la permeabilidad y el eflujo del fármaco. Las más frecuente son en los genes *gyrA* (85%) y *gyrB* (10%), así como una bomba de eflujo (gen *lfrA*) que confiere una resistencia de bajo nivel. Las mutaciones asociadas con altos niveles de resistencia se encuentran agrupadas en una región de 40 aminoácidos en el gen *gyrA* conocida como Región Determinante de Resistencia a la Quinolona (Coll, 2009; Alcaide *et al.*, 2017).

2.1.4.2.2 Aminoglucósidos

La amikacina y kanamicina (junto con la S) son aminoglucósidos similares estructuralmente que presentan actividad antituberculosa, y son los medicamentos inyectables de segunda línea más usados para el tratamiento de la TB-MR. La capreomicina y la viomicina son antimicrobianos peptídicos básicos que comparten el mecanismo de acción con los aminoglucósidos (Coll, 2009).

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se centra en el impedimento de la síntesis de proteínas por inhibición de la función normal de los ribosomas. El mecanismo molecular más común de resistencia en kanamicina y amikacina se ha asociado con una mutación en el gen *rrs*. Las mutaciones en el gen *tlyA* que codifica la 2'-O-metiltransferasa que modifica un nucleótido de ARNr 16S y de ARNr 23S (subunidad 50S), está implicado en la resistencia a la capreomicina y viomicina (Dilia Fontalvo Rivera and Doris Gómez Camargo, 2015; Gómez-Tangarife *et al.*, 2018).

2.1.4.2.3 Etionamida (Eto), protionamida (Pto)

La etionamida y la protionamida son profármacos, similares entre sí, derivados del ácido isonicotínico. Su mecanismo de acción es parecido al de la INH, solo que en este caso la activación de la etionamida se da por la monooxigenasa *EthA* (en lugar de *katG*, que activa a INH) y actúa inhibiendo la actividad de la enzima enoil-ACP-reductasa (*inhA*), responsable de la síntesis del ácido micólico de la pared celular. Por tanto, las mutaciones en la región promotora *inhA*, causantes de una sobreexpresión de esta enzima, conducen a una resistencia cruzada de INH y etionamida. De hecho, las mutaciones del gen *inhA*, que confieren una resistencia de bajo nivel a la INH, también producen resistencia a etionamida, sin embargo, las cepas con resistencia de alto nivel a INH por alteración del gen *katG* permanecen sensibles a esta (Coll, 2009; Sandoval *et al.*, 2020).

Los mecanismos de resistencia específicos para etionamida se dan por mutaciones en los genes que codifican a su activador (*ethA*), su diana (*inhA*), o el regulador de *ethA* (*ethR*). En un análisis de 47 aislados clínicos resistentes a etionamida se detectaron mutaciones en *ethA*, *ethR*, *inhA*, *ndh* o *mshA*. De estos, el 62% de los casos de resistencia presentó mutaciones en *inhA*, mientras que un 47% se identificó con mutaciones en *ethA*. Las mutaciones en *ethR* representan tan solo el 4%, por lo que es posible que *ethR* solo juegue un papel menor en la resistencia (Vilchèze and Jacobs JR., 2014).

2.1.4.2.4 Ácido paraaminosalicílico (PAS)

Este antimicrobiano es activo casi exclusivamente frente al complejo *M. tuberculosis*, en especial sobre la población de crecimiento extracelular. El interés por este antibiótico se debe al aumento de las resistencias, a pesar de su baja biodisponibilidad y su mala tolerabilidad. En el 3% de los adultos tratados con PAS aparecen reacciones de hipersensibilidad. Es un profármaco que se dirige a la vía de síntesis del ácido fólico en *Mtb*, inhibiendo la síntesis del mismo, el metabolismo del ácido salicílico y del transporte de hierro. Su activación se da por la enzima dihidrofolato sintasa, codificada por el gen *folC*, generando un antimetabolito hidroxil dihidrofolato, que actúa inhibiendo la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa, codificada por *dfrA* (Miotto *et al.*, 2018).

La resistencia a PAS se asocia a mutaciones del gen *folC* que finalmente causan la inhibición de la activación del profármaco. Además, las mutaciones en *dfrA* y *thyA*, que codifica la timidilato sintasa A y es necesaria para la biosíntesis de timina en la vía del folato,

también podrían estar correlacionadas con la resistencia a PAS (Mathys *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2013).

2.1.4.2.5 Cicloserina (Cs)

La Cs es un agente bacteriostático que inhibe la biosíntesis de peptidoglicano y la conversión de L-alanina en D-alanina. Generalmente actúa inhibiendo la alanina racemasa, L-alanina deshidrogenasa y D-alanina–D-alanina ligasa, que están codificadas por los genes *alr*, *ald* y *ddlA*, respectivamente. La resistencia a la Cs parece depender de alteraciones en la D-alanil-D-alanina sintetasa. Recientemente se estableció la relación causal entre las mutaciones de pérdida de función en *ald* y *alr*, sin embargo, las mutaciones genéticas asociadas con la resistencia siguen siendo poco conocidas (Miotto *et al.*, 2018).

2.1.4.2.6 Bedaquilina

La bedaquilina es el primer medicamento contra la tuberculosis aprobado por la FDA en casi 50 años. Tiene actividad bactericida contra Mtb tanto en condiciones de replicación como en condiciones de hipoxia no replicantes. Actúa inhibiendo la enzima ATP sintasa unida a la membrana de Mtb. La ATP sintasa convierte ADP en ATP utilizando el gradiente de iones electroquímicos transmembrana (H^+ o Na^+). La subunidad c de la ATP sintasa tiene sitios de unión de iones que los a través de la membrana y generan energía para la síntesis de ATP. La bedaquilina bloquea estos sitios de unión a iones interfiriendo así con la bomba de protones, lo que da como resultado una disminución de los niveles de ATP intracelular. Un

estudio reciente sugirió que, además de la subunidad c, la bedaquilina también se dirige a la subunidad ϵ de la ATP sintasa. El principal mecanismo de resistencia al bedaquilina implica la regulación ascendente de la bomba de eflujo MmpL5, codificada por *mmpL5* (Bahuguna and Rawat, 2020).

Tabla 1. Mecanismos de acción y genes de resistencia de los medicamentos más utilizados para el tratamiento de la tuberculosis.

Medicamentos de primera línea para la tuberculosis, utilizados principalmente para el tratamiento de la tuberculosis sensible a los medicamentos				
Fármaco	Objetivo de la proteína target	Mecanismo de acción	Actividad	Genes de resistencia
INH	Enoil-ACP reductasa (<i>InhA</i>)	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos	Bactericida en bacilos activos; Bacteriostática en latencia	<i>katG</i> (42–58%). Promotor <i>mabA-inhA</i> (21–34%)
RIF	ARN polimerasa subunidad β (<i>RpoB</i>)	Inhibe la síntesis/transcripción de ARN	Bactericida en bacilos activos. Actividad en los latentes y con crecimiento intermitente	<i>rpoB</i> (96–98%)
PZA	Pleiotrópico	Posibles objetivos: FAS I, QAPRTase, RpsA, PanD, Rv2783	Bactericida, bacilos en estado de latencia en el interior de los macrófagos	<i>pncA</i> (72–97%)
EMB	Arabinosil transferasa EmbB	Inhibe la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinogalactano	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	<i>embCAB</i> (47–65%)
S	Subunidad de ARNr 16S	Inhibe la síntesis de proteínas	Bactericida, bacilos metabólicamente activos	<i>rpsL</i> (52–89%); <i>rrs</i> (8–21%)

Medicamentos de segunda línea para la tuberculosis, utilizados principalmente para el tratamiento de la tuberculosis resistente a los medicamentos				
Kanamicina Amikacina Capreomicina Viomicina	Subunidad de ARNr 30S	Inhibir la síntesis de proteínas	Bactericidas, bacilos metabólicamente activos	<i>rrs; rpsL; gen tlyA</i>
Etionamida Protionamida	Enoil-ACP reductasa (<i>InhA</i>)	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos	Bacteriostático en bacilos metabólicamente activos	<i>Promotor mabA-inhA, ethA</i>
Ofloxacina Levofloxacina Moxifloxacina	ADN girasa y topoisomerasa	Inhibir la síntesis de ADN	Bactericida	<i>gyrA, gyrB, lfra</i>
PAS	Dihidrofolato reductasa	Inhibe la síntesis de precursores de ADN	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	<i>folC; dfrA; thyA</i>
Cs	Alanina racemasa y D-alanina ligasa	Inhibe la síntesis de la pared celular	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	<i>alr; ald</i>
Bedaquilina	Subunidad de ATP sintasa ϵ	Inhibe la producción de ATP	Bactericida	<i>gen mmpR</i>

2.2 Quitosano: propiedades y aplicaciones

El quitosano es un polisacárido natural que ha ganado atención en los últimos años en el campo de la investigación, especialmente en el área de formulaciones. Éste compuesto se deriva de la quitina y se encuentra como el componente principal de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, las paredes celulares de los hongos y las escamas de los peces. Es único polímero catiónico pseudonatural y debido a su sensibilidad al pH, biocompatibilidad y funciones bioactivas ha atraído más atención que su polímero base (quitina) (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009; Yanat and Schroën, 2021).

La quitina está compuesta de monómeros de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa (unidades de N-acetilglucosamina) unidos a través de enlaces β -(1-4). El quitosano se puede obtener mediante desacetilación de quitina con NaOH después de la desmineralización y desproteinización de los caparazones o exoesqueletos de crustáceos (Figura 1). Cuando el grado de desacetilación de la quitina alcanza aproximadamente el 50% (dependiendo del origen del polímero), se vuelve soluble en medios ácidos acuosos y se le llama quitosano (Rinaudo, 2006; Adhikari and Yadav, 2018).

2.2.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano

El quitosano, por lo tanto, está compuesto por monómeros 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina y N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, unidos por enlaces glicosídicos β -(1-4) (Figura 2). Los residuos de glucosamina llevan cargas positivas a valores de pH

ligeramente ácidos, lo que hace que el quitosano sea un biopolímero policationico y que puede interactuar fácilmente con moléculas polianiónicas como proteínas, ADN o fosfolípidos. Además, la presencia de grupos hidroxilo y amino proporcionan muchas opciones para la modificación química. Los grupos amino activos actúan como sitio reactivo para una variedad de nuevos grupos de unión usando condiciones de reacción suaves y su distribución es aleatoria, lo que facilita la generación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares (Zhang *et al.*, 2010; Ali and Ahmed, 2018; Islam, Dmour and Taha, 2019).

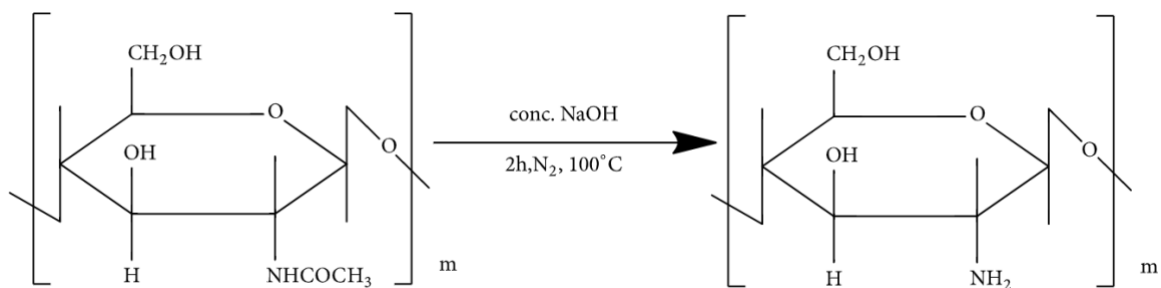


Figura 1. Desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Adhikari and Yadav, 2018).

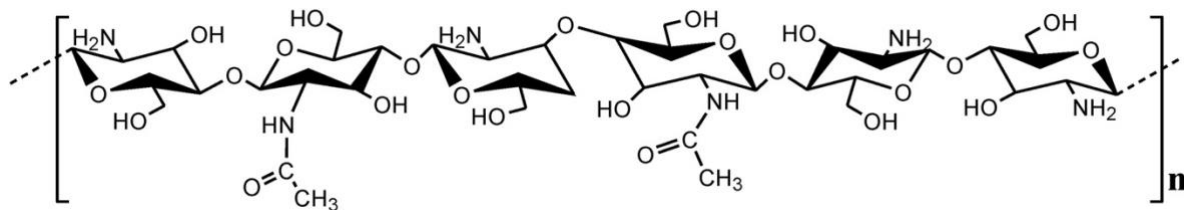


Figura 2. Estructura química del quitosano que muestra grupos N-acetilo residuales de la quitina original (Islam, Dmour and Taha, 2019).

Las características fisicoquímicas del quitosano dependen en gran medida del pH del disolvente en el que se encuentre (es soluble sólo en ácidos inorgánicos y orgánicos diluidos con un pH inferior a 6.3), del peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (DA). El parámetro más importante para la caracterización del quitosano es la determinación del DA, que representa la proporción de unidades de N-acetil-d-glucosamina con respecto al número total de unidades. Para algunos investigadores, la quitina con más del 50% de DA se considera quitosano, mientras que otros la definen como tal cuando es superior al 60%. Comúnmente, el DA del quitosano está en el rango del 60% al 98%. Las técnicas más comunes para su determinación precisa son la espectroscopia infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN), así como la titulación potenciométrica (Zargar, Asghari and Dashti, 2015; Sánchez-Machado *et al.*, 2018).

El quitosano disponible comercialmente se extrae a partir de conchas de crustáceos y cuenta con un DA de aproximadamente 70-90% y un PM de entre 50 y 2000 kDa. Se puede clasificar con base en el rango de su peso molecular en tres tipos diferentes, quitosano de alto peso molecular (HMWC) con pesos >700 kDa, quitosano de peso molecular medio (MMWC) de aproximadamente 150-700 kDa y quitosano de bajo peso molecular (LMWC) con valores <150 kDa. El HMWC se ha empleado para formar grandes agregados en los procesos de separación sólido/líquido, sin embargo, su escasa solubilidad a valores de pH neutros y alta viscosidad dificultan su uso. En contraste, se encontró que las soluciones de LMWC presentan baja viscosidad, lo que vuelve mas sencilla su aplicación a gran escala.

Además, se informó que penetran más rápida y fácilmente en las membranas bacterianas, lo que sugiere su mayor actividad antibacteriana y antioxidante que el HMWC. Tomando esta propiedad única, se han llevado a cabo grandes estudios utilizando LMWC como estimulante biológico, material antibacteriano, agente antifúngico y como antioxidante (Minh, Van Hoa and Trung, 2020).

El PM del quitosano se puede determinar mediante diferentes técnicas como la cromatografía de permeación en gel, la dispersión de luz estática y la medición de la viscosidad intrínseca (Berat *et al.*, 2013).

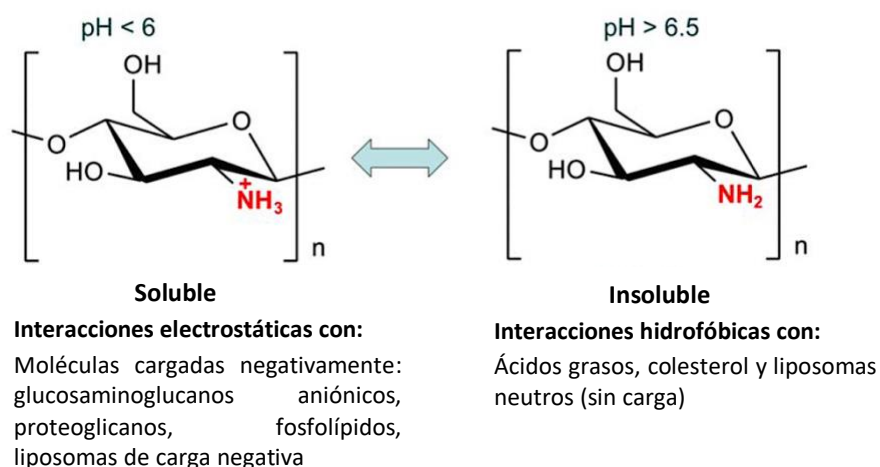


Figura 3. Versatilidad del quitosano en diferentes ambientes de pH. Modificada de (Kumirska *et al.*, 2011).

Sus propiedades de solubilidad se ven afectadas por la presencia de grupos amino y el estado de carga dependiendo del pH del disolvente o medio biológico en el que se encuentre (figura 3). A pH > 6.5, las soluciones de quitosano presentan separación de fases,

mientras que a pH <6.5 se vuelve soluble y adquiere una carga positiva debido a la protonación de los grupos amino. A un pH entre 6,0 y 6,5 en solución, los grupos amino libres del quitosano se vuelven menos protonados y aumenta la hidrofobicidad a lo largo de la cadena del polímero. Como polielectrolito catiónico, a pH bajo puede interactuar electrostáticamente con moléculas o polímeros cargados negativamente (Kumirska *et al.*, 2011).

El quitosano ha sido reconocido en los últimos años por su baja toxicidad, alta biodegradabilidad, biocompatibilidad, y por sus propiedades biológicas como antialérgico, anticoagulante, antioxidante, hemostático, analgésico, antiesterolémico, antitumoral y propiedades antimicrobianas decentes contra una amplia gama de microorganismos. Además, ha alcanzado el estado de Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), por lo que es un biopolímero atractivo para aplicaciones farmacéuticas (Escárcega-Galaz *et al.*, 2018; Perinelli *et al.*, 2018).

Aunque el mecanismo de acción aún no se comprende completamente, el más aceptado se basa en las interacciones electrostáticas entre el quitosano cargado positivamente y la membrana del microorganismo cargado negativamente. Sin embargo, se han considerado otros mecanismos, como las interacciones con el ADN o la formación de complejos con iones metálicos. Su actividad antimicrobiana se ve fuertemente afectada por sus características estructurales como el PM o DA, y por las condiciones ambientales como el pH del medio biológico, la temperatura o la fuerza iónica (Muñoz-Bonilla *et al.*, 2019).

La biodegradación desempeña un papel importante en el destino metabólico del quitosano en el cuerpo. Enzimáticamente, el quitosano puede ser degradado por enzimas capaces de hidrolizar los enlaces de la sustancia polimérica en fracciones más pequeñas como monómeros (D-glucosamina, N-acetil-glucosamina). Se sabe que el quitosano se degrada en los vertebrados predominantemente por la lisozima y por ciertas enzimas bacterianas en el colon. Hasta el momento se han identificado ocho quitinasas humanas, tres de las cuales han mostrado actividad enzimática. A pesar de que se han realizado numerosos estudios hasta ahora, el mecanismo de degradación del quitosano aún no se comprende completamente (Matica, Menghiu and Ostafe, 2017; Islam, Dmour and Taha, 2019).

2.2.2 Sistemas nanoestructurados de quitosano

La nanotecnología es un área emergente de la ciencia que involucra la ingeniería de partículas nanométricas de diversos materiales. Se han impuesto varias restricciones sobre qué es exactamente la nanotecnología; según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la nanotecnología se define como "la creación y el uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones novedosas debido a su pequeño tamaño". Sin embargo, el consenso más común descrito por La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI, 2010) describe la nanotecnología como "la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nm, donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas" (Otto and de Villiers, 2009; Khare, Williams and Gokulan, 2014).

Las propiedades de los materiales cambian a medida que su tamaño se acerca a la nanoescala porque el porcentaje de átomos en la superficie de un material se vuelve significativamente mayor. A medida que se modifica el tamaño de la partícula, la química de la superficie cambia, lo que lleva a diferentes interacciones superficiales en el entorno de la partícula. La absorción de nanopartículas en el sistema biológico está controlada por el tamaño y la química de la superficie del nanomaterial. Dependiendo del tamaño y las propiedades de las partículas, un material puede tener diferentes mecanismos de captación celular y, por lo tanto, una respuesta intracelular diferente, así como un resultado metabólico diferente en el entorno biológico (Khare, Williams and Gokulan, 2014).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria farmacéutica como sistema de administración de fármacos en diferentes formas, como tabletas, microesferas, micelas, vacunas, ácidos nucleicos, hidrogeles, nanopartículas y conjugados, tanto en forma implantable como inyectable a través de las vías oral, nasal y ocular.

La capacidad de los sistemas nanoestructurados para atacar a los microorganismos depende de varios factores entre los que se encuentra su capacidad de interrumpir procesos bioquímicos importantes mediante su unión al material genético y proteínas; interacción que en diversas ocasiones se ha visto relacionado con el tamaño y estructura de los nanocompuestos (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Las nanopartículas de quitosano se pueden sintetizar a través de varias técnicas. Estos incluyen electropulverización, microemulsión, gelificación iónica, difusión de emulsionante

solvente, etc. Entre ellos, la gelificación iónica con tripolifosfato de sodio (TPP) como reticulante es la técnica más adoptada para su fabricación, ya que este método es simple, suave, menos tóxico y adecuado para la ampliación. Además, el tamaño de las nanopartículas puede ajustarse con precisión ajustando los parámetros del proceso, por ejemplo, concentración de quitosano y TPP, relación de peso y relación de volumen de los mismos, valor de pH (Mohammed *et al.*, 2017).

2.2.3 Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano

Existen distintas metodologías para la obtención de las nanopartículas de quitosano (NPQ) debido a sus propiedades fisicoquímicas que le permiten formar nuevas estructuras y potenciar sus propiedades. A partir de la literatura se concluye que las propiedades de las NPQ pueden variar considerablemente según los métodos de preparación que se utilicen y las técnicas de modificación de la superficie que se apliquen, lo que puede dar lugar a aplicaciones en campos completamente diferentes. La reticulación en emulsión fue el primer método descrito en la literatura para la preparación de NPQ utilizando el grupo amino de quitosano y el grupo aldehído de un agente de reticulación (Yanat and Schroën, 2021).

Este método involucra la mezcla de una solución acuosa de quitosano con una fase orgánica oleosa para generar una emulsión de agua en aceite. Posteriormente, se agrega un agente de entrecruzamiento. La primera síntesis reportada mediante este método se generó de una solución acuosa de quitosano y una fase oleosa de Span 80, tolueno y glutaraldehído como reticulante. Obtuvieron tamaños de nanopartículas de 250 a 300 nm con una

distribución estrecha. Sin embargo, el glutaraldehído ya no es tan utilizado debido a que causa problemas evidentes de toxicidad e integridad del fármaco (Ohya *et al.*, 1994).

El método de micelización inversa (microemulsión) se basa en la reticulación covalente. Es caracterizado por la producción de emulsiones a base de surfactantes lipofílicos disueltos en medio orgánico, principalmente el bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico. Al igual que en el proceso de emulsión ordinaria, el glutaraldehído es el agente entrecruzante más utilizado, sin embargo, debido a su toxicidad como se mencionó anteriormente, se han probado nuevas alternativas de origen biológico como la genipina. El procedimiento de micelización inversa permite la obtención de nanopartículas con baja polidispersidad con tamaños promedio inferiores a 100 nm (Caro-León *et al.*, 2019).

La gelificación iónica es uno de los métodos de preparación más utilizados para la generación de nanopartículas de quitosano. Se basa en la reticulación iónica mediante agregación de las moléculas poliméricas producto de la interacción del polisacárido de carga positiva y especies cargadas negativamente. El TPP es el agente entrecruzante más común para producir nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica. La adición de TPP a una solución de quitosano, en condiciones apropiadas de temperatura y agitación produce las nanopartículas debido a la interacción de cargas opuestas (Fig. 4). Las sustancias que no han reaccionado se eliminan mediante diálisis o múltiples pasos de lavado con agua (Caro-León *et al.*, 2019).

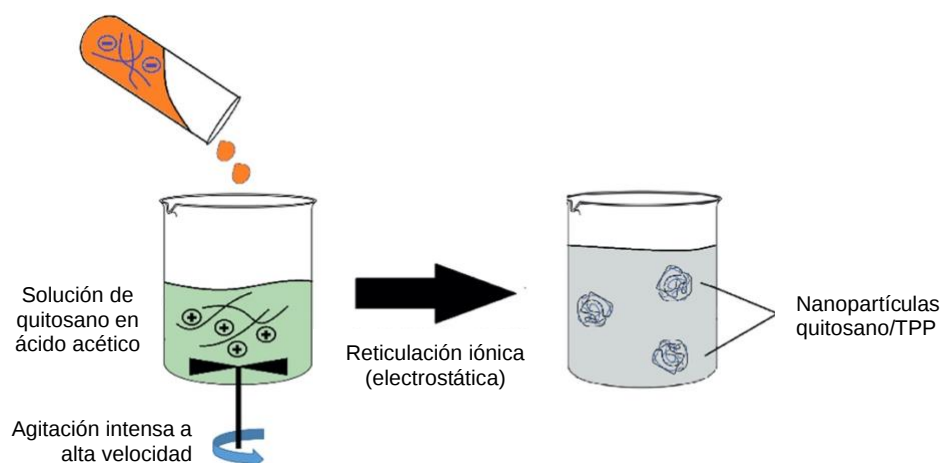


Figura 4. Ilustración esquemática de la síntesis de nanopartículas por el método de gelificación ionotrópica. Modificada de (Yanat and Schroën, 2021).

El método de precipitación por inversión de fase se basa en la emulsificación combinada con la precipitación. La emulsión de aceite en agua se prepara con una fase orgánica y una solución acuosa de quitosano, en presencia de un estabilizador. Subsecuentemente se aplica homogeneización a alta presión para obtener la emulsión en gotas bien dispersas de tamaño nanométrico. La fase orgánica se separa de la emulsión por evaporación a baja presión, lo que hace que este se difunda fuera de las gotas disminuyendo la solubilidad del polímero y produciendo su precipitación, dando como resultado la formación de las nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas por el método de precipitación por inversión de fase tienen una alta eficiencia de encapsulación para fármacos hidrófobos (Caro-León *et al.*, 2019).

Otro método para la producción de nanopartículas es por autoensamblaje, que implica una adsorción alternativa de polielectrolitos cargados de forma opuesta sobre materiales del

núcleo y son considerados herramientas prometedoras para la administración de fármacos y como biosensores. El polielectrolito de quitosano puede formar complejos con materiales aniónicos naturales. Esto se lleva a cabo principalmente combinando soluciones del polímero mediante agitación. Las nanopartículas generadas por este método son especialmente favorables para encapsular fármacos hidrófilos y lipófilos, lo que permite que el activo permanezca estable en la matriz biocompatible (Urrejola *et al.*, 2018).

Entre otros métodos para la obtención de nanopartículas se encuentran la forma descendente (*top-down*), que se basa en la reducción del material base a escalas nanométricas de forma mecánica. La formación de NPQ mediante este método se basa en dos pasos principales, la hidrólisis ácida y la desacetilación de la quitina (cambiando el grupo acetilo de la quitina por un grupo amino). En la hidrólisis ácida se rompen los enlaces glicosídicos y la parte amorfa se elimina mediante un par de etapas de centrifugación y lavado. La desacetilación se realiza mediante un tratamiento alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) que conduce a la formación de las nanopartículas de quitosano (Ricra Méndez, 2018).

2.2.4 Técnicas de caracterización de nanopartículas

2.2.4.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La técnica de dispersión de luz dinámica es de las más utilizadas para medir el tamaño de las nanopartículas, también sirve para evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo en suspensión a diferentes condiciones de pH y temperatura (Carvalho *et al.*, 2018).

Mide el movimiento aleatorio e incontrolado de partículas en un fluido cuando chocan constantemente con otras moléculas, lo que se le denomina movimiento browniano. Al medir en el tiempo las fluctuaciones de la intensidad de la luz permite determinar el coeficiente de difusión (D), que se relaciona con el diámetro hidrodinámico (d_H) (tamaño de partícula) a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_H = kT / 3\pi\eta D$$

donde d_H es el diámetro hidrodinámico, k es la constante de Boltzmann (1.380×10^{-23} kg.m²s⁻²K⁻¹), T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad del medio y D es el coeficiente de difusión. Como se muestra en la ecuación la difusión de partículas depende de la temperatura, la viscosidad del medio y el tamaño de la partícula (Malvern Panalytical, 2021).

El rango de distribución de tamaño de las partículas se representa como índice de polidispersidad (PDI), que es una salida de la función de autocorrelación. Los valores de PDI se encuentran entre 0 y 1, donde 1 es la población altamente heterogénea y 0 es la población de nanopartículas altamente homogénea. La dispersión es el principal factor limitante para obtener una buena correlación y, por lo tanto, una determinación precisa del tamaño. La razón es que no existe un control absoluto sobre el proceso de síntesis y una reacción química para desarrollar nanopartículas no es un proceso homogéneo. Esto da como resultado el desarrollo de nanopartículas con una variedad de formas y tamaños que introducen variabilidades entre lotes. Sin embargo, la optimización fina y los ajustes pueden proporcionar muestras casi homogéneas (Mujica Álvarez, Matiacevich and Bustos, 2019).

2.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM)

El microscopio electrónico de barrido y transmisión se ha convertido en uno de los instrumentos preeminentes para la obtención de imágenes de alta resolución espacial y espectroscopia de materiales, sobre todo en resolución atómica. El principio de STEM es bastante sencillo. La óptica electrónica enfoca un haz de electrones para formar una pequeña sonda luminosa que se escanea por tramas a través de una muestra. La muestra se adelgaza de manera que la gran mayoría de los electrones se transmiten y los electrones dispersos se detectan utilizando alguna geometría del detector. La intensidad en función de la posición de la sonda forma una imagen (Nellist, 2019).

2.2.4.3 Análisis de carga superficial (potencial Z)

La medición del potencial Z es una técnica para determinar la carga superficial de nanopartículas en una solución coloidal. Se toma una medida aplicando una carga eléctrica a través de la muestra en una celda de flujo capilar plegada. Las nanopartículas tienen una carga en la superficie que atrae una fina capa de contraiones a la superficie de las nanopartículas. Esta doble capa de iones viaja con la nanopartícula a medida que se difunde por la solución. El potencial eléctrico en el límite de la doble capa se conoce como potencial zeta. La magnitud del potencial zeta predice la estabilidad coloidal de la solución. En general, las nanopartículas con valores de potencial zeta superiores a 30 mV positivos o inferiores a 30 mV negativos tienen altos grados de estabilidad. Cuando el potencial es bajo, se tiene

atracción entre las partículas, lo que conlleva a una aglomeración debido a las interacciones entre partículas, incluidas las interacciones de van der Waals e hidrófobas y los enlaces de hidrógeno. Es una herramienta importante para comprender la superficie de la nanopartícula y predecir la estabilidad de la misma en una solución. Para una mejor medición las muestras deben ser muy monodispersas y de concentración óptima para dispersar eficazmente la luz (Mayoral, Moreno and San Martín-Martínez, 2014).

2.2.5 Actividad antibacteriana y antifúngica del quitosano como sistema nanoestructurado

La capacidad de los sistemas nanoestructurados para atacar a los microorganismos depende de varios factores entre los que se encuentra su capacidad de interrumpir procesos bioquímicos importantes mediante su unión al material genético y proteínas; interacción que en diversas ocasiones se ha visto relacionado con el tamaño y estructura de los nano compuestos. (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Los mecanismos de acción del quitosano contra bacterias y hongos se han investigado y reportado en repetidas ocasiones. Aunque las propiedades antimicrobianas del quitosano están altamente asociadas con su estructura, características fisicoquímicas y condiciones ambientales, además de los grupos hidroxilo reactivos en las posiciones C-3 y C-6, el modo de acción del quitosano puede clasificarse como efectos extracelulares, efectos intracelulares o ambos, en función del sitio de destino de los efectos antimicrobianos. Debido a que el HMWC generalmente no puede penetrar la pared celular y la membrana celular, es

posibles que presente sus efectos antimicrobianos extracelularmente actuando como quelante de metales esenciales, evitando la absorción de nutrientes de las células y alterando la permeabilidad celular. Sin embargo, el LMWC no solo tiene actividad antimicrobiana extracelular sino también intracelular, lo que afecta al ARN, la síntesis de proteínas y la función mitocondrial. Por lo tanto, el modo de acción antimicrobiana del quitosano depende en gran medida del tipo de microorganismo al que se enfrente (Ke *et al.*, 2021).

Las bacterias grampositivas y gramnegativas exhiben diferencias notables en la estructura de su pared celular, en las que las bacterias grampositivas tienen peptidoglucanos más gruesos y las bacterias gramnegativas están enriquecidas en lipopolisacáridos (LPS). Las diferencias en la estructura de la superficie celular de estos tipos de bacterias también conducen a distintas susceptibilidades al quitosano. Por ejemplo, las bacterias gramnegativas presentan una carga más negativa que las bacterias grampositivas porque el LPS a menudo se une a grupos fosforilados. Las superficies de las células con carga más negativa permiten la unión del quitosano catiónico a los fosfolípidos cuando el pH ambiental es inferior a 6,5 (Kong *et al.*, 2010). La posible acción antibacteriana del quitosano sobre las bacterias gramnegativas se muestra en la siguiente imagen (Figura 5).

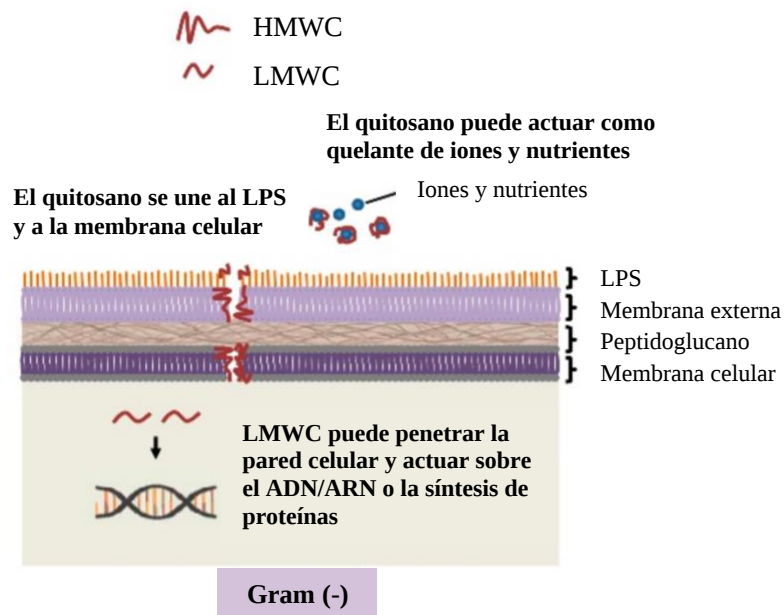


Figura 5. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias gramnegativas. Modificada de (Ke *et al.*, 2021).

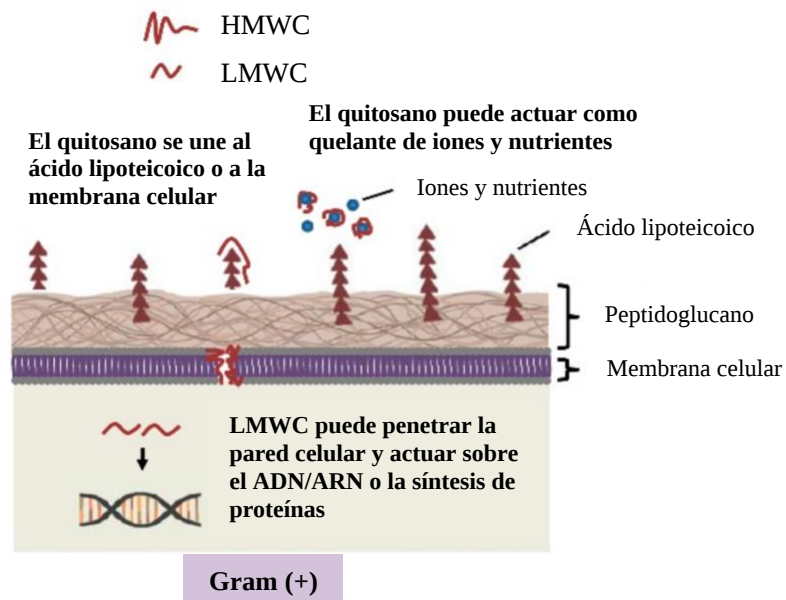


Figura 6. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias grampositivas. Modificada de (Ke *et al.*, 2021).

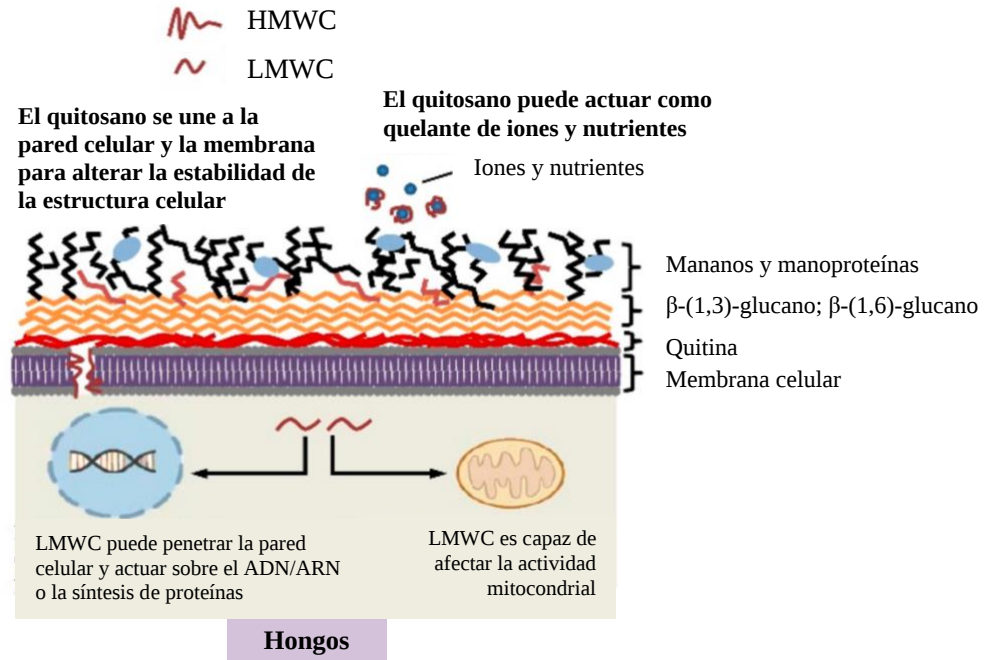


Figura 7. Posible mecanismo de acción del quitosano sobre hongos. Modificada de (Ke *et al.*, 2021).

Los ácidos teicoicos en bacterias grampositivas también están cargados negativamente debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. Sin embargo, una deleción en el gen *tagO* en *Staphylococcus aureus*, codificante para una enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de ácidos teicoicos, generó cambios en la composición de la pared celular disminuyendo las cargas negativas, presentando una mayor resistencia al quitosano, lo que confirma aún más la hipótesis de que la naturaleza policationica del quitosano es un factor importante que contribuye a su actividad antimicrobiana. Curiosamente, los informes han demostrado que el quitosano (≤ 50 kDa) puede atravesar la pared celular e inhibir la transcripción del ADN. Por tanto, aunque el tamaño y peso molecular del quitosano juega un papel importante, su estructura también determina la actividad antibacteriana extracelular e intracelular (Raafat *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2019). El

posible mecanismo de acción antibacteriana del quitosano sobre las bacterias grampositivas se muestra en Figura 6.

En los últimos años ha sido reportado por diferentes investigadores que el quitosano en distintos sistemas nanométricos muestra una mayor actividad antimicrobiana en comparación con el quitosano puro. Se demostró que cuando está en nanoescala formando complejos con CN, Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ag^+ mejoró considerablemente su actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *Salmonella enterica serotype Choleraesuis* y *E. coli* (Wang, Du and Liu, 2004; Du *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009; Al-Tayyar, Youssef and Al-hindi, 2020). Igualmente se reportó actividad antimicrobiana de nanopartículas de LMWC a pH neutro, afectando la integridad de la membrana celular de *Streptococcus mutans* (de Paz *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que el quitosano tiene efectos fungicidas relacionados principalmente a la interacción del quitosano con la pared o membrana celular. Sin embargo, las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) del quitosano contra los hongos varían y están altamente asociadas con el PM y el DA, el pH del solvente y el tipo de hongo al que se dirige. Además, el contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana celular podría estar correlacionado positivamente con la susceptibilidad al quitosano, ya que un mayor contenido de ácidos grasos insaturados exhibe una mejor fluidez de la membrana, lo que conduce a una carga más negativa. El LMWC ejerce efectos intracelulares, siendo capaz de penetrar la pared celular, lo que lleva a la inhibición del ADN/ARN y la síntesis de proteínas. Curiosamente, un informe sugirió además que el quitosano afecta la actividad mitocondrial

(Palma-Guerrero *et al.*, 2010; Lopez-Moya, Suarez-Fernandez and Lopez-Llorca, 2019; Lo *et al.*, 2020). El modo de acción del quitosano contra los hongos se muestra en la Figura 7.

Igualmente se ha reportado la actividad antibacteriana de nanoformulaciones de quitosano sobre cepas de *M. tuberculosis*. En nanoportadores de quitosano para la encapsulación de bedaquilina (con el fin de disminuir la toxicidad del fármaco) se obtuvo una CMI similar a la del fármaco libre frente a cepas de Mtb H37Rv, citotoxicidad baja o nula en células humanas epiteliales pulmonares (A549), células humanas epiteliales hepáticas (HepG2) y células humanas de monocitos de sangre periférica (THP-1), y se estudio la interacción bacteria-nanopartícula mediante microscopía electrónica de barrido, mostrando una estrecha interacción de los nanoportadores con la superficie de las bacterias (De Matteis *et al.*, 2018).

En otro estudio se sintetizaron nanopartículas de quitosano inhalables para la administración sostenida de isoniacida y rifampicina *in vivo*, mediante nebulización en ratones hembra BALB/c para dirigir los fármacos a los tejidos pulmonares. Los resultados mostraron nanopartículas efectivamente cargadas con un tamaño promedio de 230 ± 4.5 nm y detectaron ambos fármacos en varios órganos (pulmones, hígado, bazo y riñón) hasta 24 h después de la nebulización, presentando una mayor eficacia contra la micobacteria que los fármacos libres (Garg, Rath and Goyal, 2015). En un estudio reciente muy similar se sintetizaron con éxito nanopartículas de quitosano cargadas con rifampicina y se caracterizaron como un portador de suministro eficaz para la selección de macrófagos alveolares. Con ello se puede concluir que las nanopartículas de quitosano pueden explotarse

como una herramienta prospectiva para la administración de fármacos para dirigir fármacos a los tejidos pulmonares para el tratamiento de la tuberculosis (Zaki *et al.*, 2021).

Otros autores reportaron la modificación del quitosano formándolo nanopartículas con tripolifosfato de sodio para mejorar la biodistribución y aumentar la especificidad y sensibilidad del quitosano. Los efectos antimicrobianos se presentaron a altas concentraciones de nanopartículas, con un valor de CMI de 1200 µg/ml y un valor de CMB de 2400 µg/ml para Mtb H37Rv. Se concluyó que demuestran potencial por su actividad antituberculosa mediante técnicas preliminares *in vitro* y se sugirió que el tamaño de las partículas tiene un papel importante en la acción antibacteriana (Wardani, Mahmiah and Sudjarwo, 2018).

2.3 Extractos naturales con efectos antimicrobianos

El uso de productos naturales como medicamentos es bien conocido de muchos países en desarrollo como lo es en México. La utilización de dichos productos es generalmente más barata, más efectiva y con menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos sintéticos.

Los productos naturales derivados de plantas han sido fuente de referencia de muchos medicamentos, especialmente en el caso del desarrollo de agentes anticancerígenos y antimicrobianos. Aunque la medicina tradicional ha sido eclipsada por la medicina moderna

en la actualidad, en las últimas décadas se ha observado un aumento en el uso de plantas medicinales para la promoción de la salud y el tratamiento de enfermedades en muchos países, incluidos los países desarrollados, debido al fracaso de los antimicrobianos disponibles para tratar enfermedades infecciosas (Valgas *et al.*, 2007; Thomford *et al.*, 2018).

En las estrategias actuales de descubrimiento de fármacos y la medicina moderna se ha descartado el uso de extractos de plantas enteras y se ha optado por el uso basado en un solo compuesto. Sin embargo, se ha reportado en distintas ocasiones que tomar la planta entera o extractos sin aislamiento de componentes, como se practica en la medicina tradicional, produce un mejor efecto terapéutico que los compuestos individuales. Esto es importante ya que la mayoría de los metabolitos de las plantas probablemente funcionan de manera sinérgica o al mismo tiempo para dar al extracto de la planta su efecto terapéutico. Por esta razón, algunos autores se han focalizado en la investigación sobre el uso de extractos de plantas enteras, permitiéndoles determinar la base del efecto terapéutico de los extractos de plantas (Thomford *et al.*, 2018).

Las técnicas convencionales más comúnmente utilizadas para extraer los componentes activos de plantas aromáticas y medicinales son la extracción, maceración e hidrodestilación de Soxhlet. Entre otras técnicas se describen la infusión, digestión, decocción, percolación, extracción alcohólica acuosa por fermentación y extracción de fitosol o fitónico con disolventes de hidrofluorocarbonos para los diversos tipos de extractos de plantas aromáticas. En los últimos años, se han desarrollado y utilizado algunas otras técnicas de extracción innovadoras compuestos químicos bioactivos de plantas medicinales

y aromáticas. Los más prometedores son la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por enzimas, extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y extracción por líquido presurizado. Muchas de estas técnicas de extracción se consideran "técnicas verdes" que son más respetuosas con el medio ambiente ya que incluyen productos químicos menos peligrosos, están diseñadas para la eficiencia energética, reducen el tiempo requerido del procedimiento de extracción y previenen la contaminación del medio ambiente debido a al uso excesivo de productos químicos no seguros (Manousi, Sarakatsianos and Samanidou, 2019).

2.3.1 *Allium sativum* y sus componentes

Se ha informado que *Allium sativum*, comúnmente conocida como ajo, posee diversas propiedades farmacológicas, incluyendo antiinflamatorios, antihelmínticos y colesterol. El uso del ajo como remedio para diversas dolencias se ha mantenido desde hace siglos. Según los sistemas de medicina ayurvédica y griega, el ajo es uno de los remedios establecidos para la tuberculosis. Las actividades biológicas generalizadas del ajo se atribuyen principalmente a los compuestos orgánicos de azufre presentes en él. La aliína, alicina y γ -glutamilcisteínas (como γ -glutamyl-S-allylcysteine, γ -glutamyl-S-trans-1-propenylcysteine) constituyen la mayoría de los compuestos de azufre presentes en el ajo entero o triturado (Phadatare, Viswanathan and Mukne, 2014).

Se sabe que la alicina no está presente de forma natural en el ajo hasta que la enzima alinasa al triturar el material y media la transformación del aminoácido aliína, en alicina y

otros aliltiosulfatos. Cuando el ajo fresco se tritura o mezcla, la formación de alicina se completa en aproximadamente 6 segundos. La alicina no es estable a temperatura ambiente, se degrada rápidamente con el tiempo. Por estas razones se ideó un proceso para evitar la liberación de alinasa y, por lo tanto, la formación de alicina mediante la obtención de un polvo por liofilización (Phadatare, Viswanathan and Mukne, 2014).

2.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se pueden utilizar para el descubrimiento de fármacos, la epidemiología y la predicción de resultados terapéuticos, siendo este ultimo el uso principal para observar la respuesta del paciente a un determinado antibiótico, la evolución de la infección y detectar una resistencia relevante del organismo que está causando este proceso infeccioso (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016).

La selección de un método de prueba de susceptibilidad y los agentes antimicrobianos que se analizarán dependen del tipo de patógeno y otros factores como la forma farmacéutica (solubilidad y dispersión en el medio de cultivo) y la etapa de prueba (cualitativa, cuantitativa, ensayo in vitro o con modelo animal, etc.). Los principales organismos que establecen los estándares de los métodos de pruebas de susceptibilidad son el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), con sede en Estados Unidos, y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Ambas organizaciones tienen un enfoque sofisticado para el establecimiento de puntos de corte (criterios

interpretativos) que permiten la categorización de los resultados de las pruebas de susceptibilidad (Turnidge, 2015).

2.4.1 Métodos de difusión

2.4.1.1 Difusión en disco

El método de difusión por disco se encuentra entre los métodos de prueba de susceptibilidad más flexibles en términos de agentes antimicrobianos que se pueden probar. En este conocido procedimiento, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. A continuación, se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de ensayo a la concentración deseada. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición (Tenover, 2019).

Esta técnica proporciona resultados cualitativos al clasificar las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes. Sus resultados también guían a los médicos en la selección adecuada de tratamientos empíricos iniciales y antibióticos usados para pacientes individuales. Sin embargo, dado que la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos. Además, el método de difusión en disco de agar no es apropiado para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI), ya que es imposible cuantificar la cantidad de

agente antimicrobiano difundido en el medio de agar. No obstante, se puede calcular una CMI aproximada para algunos microorganismos y antibióticos comparando las zonas de inhibición con los estándares del CLSI M100, que contiene tablas para interpretar los resultados de las pruebas de difusión por disco y CMI. Sin embargo, el ensayo de difusión en disco ofrece muchas ventajas sobre otros métodos por su simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar un gran número de microorganismos y agentes antimicrobianos y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados. Las ventajas mencionadas anteriormente de este método, principalmente simplicidad y bajo costo, han contribuido a su uso común para el análisis de la capacidad antimicrobiana de extractos de plantas, aceites esenciales y otros medicamentos (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016).

2.4.1.2 Difusión en pozos de agar

El método de difusión de pozos de agar se utiliza ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos. De manera similar al procedimiento utilizado en el método de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula esparciendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. Luego se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm y se introduce en el pocillo un volumen de entre 20–100 μ L del agente antimicrobiano o la solución de extracto a la concentración deseada. Posteriormente las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada (Tenover, 2019).

2.4.2 Métodos de dilución

Los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de los valores de CMI, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano ensayado en el agar (dilución en agar) o en el medio de caldo (macrodilución o microdilución). Puede usarse un método de dilución en caldo o agar para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos. El valor de CMI registrado se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo analizado, y generalmente se expresa en $\mu\text{g/mL}$ o mg/L .

2.4.2.1 Dilución en caldo

La macro o microdilución en caldo es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos. El procedimiento implica preparar diluciones dobles del agente antimicrobiano en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución) o con volúmenes más pequeños utilizando una placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución). Luego, cada tubo o pocillo se inocula con un inóculo microbiano preparado en el mismo medio después de la dilución de la suspensión microbiana estandarizada ajustada a una escala de 0,5 McFarland. Después de mezclar bien, los tubos inoculados o la placa de microtitulación de 96 pocillos se incuban condiciones adecuadas según el microorganismo de prueba (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016).

La CMI se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo a simple vista. A diferencia del método de microdilución, las principales desventajas del método de macrodilución son la tediosa tarea manual, el riesgo de errores en la preparación de soluciones antimicrobianas para cada prueba y la cantidad comparativamente grande de reactivos y espacio requerido. Así, la reproducibilidad y la economía de reactivos y espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba son las principales ventajas del método de microdilución (Tenover, 2019).

La determinación de concentración mínima bactericida (CMB) es la estimación más común de actividad bactericida o fungicida. Se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano necesaria para matar el 99,9% del inóculo final después de la incubación durante 24 horas. Se puede determinar subcultivando una muestra de pozos o tubos, produciendo un crecimiento microbiano negativo después de la incubación en la superficie de placas de agar no selectivo para determinar el número de células supervivientes (UFC/mL) (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016).

2.4.2.2 Dilución en agar

El método de dilución en agar implica la incorporación de concentraciones variables deseadas del agente antimicrobiano en un medio de agar (medio de agar fundido), habitualmente utilizando diluciones dobles en serie. El criterio de valoración de la CMI se

registra como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento en condiciones de incubación adecuadas. Esta técnica es adecuada para pruebas de susceptibilidad tanto a los antibacterianos como a los antifúngicos. La dilución en agar se recomienda a menudo como método estandarizado para organismos exigentes tales como anaerobios y especies de *Helicobacter* (Tenover, 2019).

2.4.2.3 Método de las proporciones en agar

El método de la proporción de agar se considera el estándar oro para la determinación de la susceptibilidad en Mtb. Es una modificación del método de prueba de dilución en agar que evalúa la extensión del crecimiento del inóculo estandarizado de Mtb en medio de agar que contiene fármaco y medio libre de este. La concentración crítica de cada fármaco representa la concentración más baja del fármaco que inhibe el 95% del crecimiento bacteriano. Es un método laborioso y requiere el cálculo de la resistencia mediante la realización de recuentos de colonias en agar que contiene fármaco en comparación con agar libre de fármaco. Si hay un crecimiento $\geq 1\%$ en el medio que contiene el fármaco en comparación con el medio sin fármaco, el organismo se considera resistente a ese fármaco (Woods *et al.*, 2011).

Este procedimiento se realiza inoculando cantidades iguales de varias diluciones de un inóculo estandarizado en un medio a base de agar con y sin el fármaco de prueba. Se deben observar colonias contables separadas en un cuadrante de control sin nada del fármaco. A continuación, se determina el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen

en el medio que contiene fármaco en comparación con las que crecen en el medio sin fármaco y se expresa como porcentaje. Las cepas en las que el crecimiento en medios que contienen fármaco representa más del 1% del número de colonias que se desarrollan en medios sin fármaco se consideran resistentes a ese agente (Yu *et al.*, 2016).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Síntesis de nanopartículas por el método de gelificación ionotrópica

Para la obtención de las nanopartículas de quitosano se empleó el método de síntesis por gelificación ionotrópica con tripolifosfato de sodio descrito por (Sawtarie, Cai and Lapitsky, 2017a). Se utilizó quitosano de bajo peso molecular, ácido acético glacial al 0.01%, tripolifosfato de sodio pentabásico (TPP), cloruro de sodio (NaCl) a distintas concentraciones, hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M y agua Mili-Q.

Se realizó un barrido de formulaciones con concentraciones constantes de quitosano TPP variando las concentraciones de NaCl (100, 150, 200, 400, 600, 1200 y 1400 mM) para la obtención de distintos tamaños de partícula según lo reportado. Una vez realizado el barrido e identificado los tamaños de nanopartículas posibles a formarse se realizaron síntesis variando las concentraciones de quitosano y TPP variando las concentraciones de NaCl (100, 600, 1200 y 1400 mM) generando soluciones de nanopartículas a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3%.

Para el proceso de síntesis se prepararon soluciones de quitosano al 0.1, 0.2 y 0.3% disolviendo el quitosano (10, 20 y 30 mg respectivamente) en 10 mL de ácido acético al 0.01%. El TPP se disolvió en agua MiliQ en las mismas concentraciones que el quitosano. Las soluciones se mantuvieron en agitación magnética durante 30-40 minutos aproximadamente hasta lograr su completa disolución. A cada solución (quitosano y TPP) se

agregó 1 ml de NaCl para aumentar la fuerza iónica, a distintas concentraciones según la formulación correspondiente (100, 150, 200, 400, 600, 1200, 1400 mM) para obtener diferentes tamaños de partícula y se conservó en agitación por aproximadamente 1 minuto. Para favorecer la formación de las nanopartículas se ajustó el pH de la solución de quitosano con NaOH 0.1 M hasta llegar a pH 4.7-4.8. Se agregaron a la mezcla de quitosano 3.95 mL de la solución de TPP mediante la técnica de mezclado por goteo (aproximadamente 1 gota por segundo) en agitación magnética constante durante algunos minutos. La mezcla se torna turbia color blanco traslúcido.

Las preparaciones se colocaron en viales de cristal de 20 mL con rosca y se dejaron equilibrando por 24 horas. Pasado el periodo de tiempo se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para corroborar la formación de las nanopartículas y sus variaciones de tamaño.

Posteriormente se procesaron mediante diálisis con tubos de membrana contra agua destilada y/o buffer ajustado a pH 3 para purificarlas del material sin reaccionar por un periodo de 24 horas. Concluida la purificación se caracterizan nuevamente para registrar si se presentan cambios en el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño e índice de polidispersidad. Por último, las nanopartículas se recuperaron por liofilización para su almacenamiento y posterior análisis.

3.2 Caracterización de nanopartículas de quitosano

3.2.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

El diámetro hidrodinámico de partícula, la distribución de tamaño (PDI) y potencial Z (carga superficial) de las nanopartículas sintetizadas se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Zetasizer Nano Series de Malvern.

Para la determinación del diámetro hidrodinámico y el PDI se empleó una celda desechable de poliestireno colocando 1 mL de muestra por lectura. Las lecturas se realizaron a un ángulo de dispersión de 90° y un índice de refracción de 1.480. Las mediciones se realizaron de las soluciones de nanopartículas en crudo (antes de la purificación), después de su purificación y al ser resuspendidas después de la liofilización. Cada medición se realizó por triplicado.

El potencial Z se determinó con el mismo equipo ZetaSizer colocando 1 mL de muestra por lectura en una celda capilar plegada desechable (DTS1070). Se analizó el comportamiento de las nanopartículas en presencia de niveles de pH distintos, ajustando las soluciones con buffers hasta alcanzar los siguientes a pH 2, 4, 7 y 10.

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM)

Para corroborar la forma y tamaño de las nanopartículas se tomó una micrografía electrónica utilizando un microscopio electrónico de transmisión de emisión de campo, modelo JSM-7800 F Prime. El análisis de la muestra se realizó colocando 2 µl de solución de nanopartículas a una concentración de 2 mg/mL sobre la superficie de una rejilla de cobre y carbono de malla 400. Posteriormente se adicionaron 2 µl de acetato de uranilo y se dejó secar en horno de vacío a 22°C durante 24 h. Finalmente se analizó bajo STEM insertando la rejilla en la cámara de muestras y se observaron a 25 kV.

3.3 Extracción acuosa de productos naturales

Con el fin de explorar las propiedades antimicrobianas de algunas plantas, utilizadas en la región como remedios caseros para tratar enfermedades, se realizaron extracciones acuosas mediante el método de decocción, utilizado especialmente para componentes solubles en agua y termoestables. Se utilizaron raíces y hojas de ahuehuate (*Taxodium mucronatum*), ajenjo (*Artemisia absinthium*), anacahuite (*Cordia boissieri*), bardana o lampazo (*Arctium lappa* L.), *Castella tortuosa*, chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), corteza de nogal (*Juglans neotropica* Diels) y bulbos de ajo morado, negro y chino (*Allium sativum*, *Allium neapolitanum* y *Allium sphaerocephalon* respectivamente).

Para el proceso de extracción se siguió la técnica descrita por (Rodríguez-García and Peraza-Echeverría, 2019) para la preparación de extractos acuosos de plantas. Se pesaron de 5 a 10 g del material seco de cada planta (raíz u hoja, según el caso) y esto se hirvió en un vaso de precipitado con un volumen específico de agua (100 a 200 mL) por un periodo de 1 hora o hasta reducir su volumen original a 50 mL aproximadamente. Cada mezcla se dejó reposar por 24 horas. Transcurrido el tiempo los extractos concentrados se filtraron con gasa estéril y se almacenaron para su uso posterior.

3.4 Obtención de muestras clínicas de tuberculosis

Las muestras para el análisis provinieron en su mayoría de pacientes establecidos en el Albergue Las Memorias A.C. y del Hospital General de Tijuana (HGT). Se utilizaron contenedores estériles y se identificaron con la fecha de toma, nombre completo del paciente, tipo de muestra y la institución de procedencia. Todas las muestras que no fueron procesadas a la brevedad se mantuvieron a una temperatura de 4-10°C por no más de 3 días hasta su análisis.

3.4.1 Tipos de muestra y criterios de aceptación

Las muestras procesadas cumplieron con las indicaciones y criterios de aceptación que describe el Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis (OPS | OMS, 2008).

Las muestras de esputo fueron recolectadas en recipientes de plástico desechables de 50 mL con tapa de rosca. Se recolectaron de dos a tres muestras por paciente. Cada muestra debía contener una flema visible (no saliva) expulsada desde lo más profundo de sus pulmones. Las muestras de control de los pacientes en tratamiento son comúnmente salivas. Todas las muestras de un mismo paciente con estas características se aceptaron de esa manera.

La obtención de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se realizó por el personal médico. Se aceptaron muestras de LCR provenientes del HGT que se encontraran en recipiente estéril de 10-15 ml de capacidad con tapa de rosca de cierre hermético. Las muestras sin procesar a la brevedad cumplieron con el proceso de conservación de 2-8°C por no más de 12 horas.

La obtención de muestras de exudados ganglionares se realizó por el personal médico. Se aceptaron muestras de exudado y/o biopsias de ganglio provenientes del HGT que se presentaran en recipiente estéril hermético. En el caso de exudado ganglionar obtenido por punción la muestra se conservó en tubo estéril sin aditivos ni anticoagulantes. Para biopsia ganglionar se aceptaron muestras con un volumen mínimo de 0.3 - 0.5 gramos únicamente con uno o dos mililitros de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación.

Las muestras que cumplieron con los criterios establecidos se procesaron para detectar la presencia de micobacterias (positivo o negativo) mediante la tinción ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen) y el cultivo bacteriológico (LJ).

3.5 Bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis

Para la microbiología clínica, Mtb supone un microorganismo cuya manipulación es difícil, ya que entraña el riesgo de exponerse a un patógeno de transmisión principalmente aérea y se encuentra clasificado por la OMS como un patógeno del grupo de riesgo 3, sin embargo el manejo del material biológico ofrece diferente riesgo, de acuerdo al método de laboratorio usado, determinándose mediante una valoración de riesgo. En la valoración del riesgo deben considerarse varios aspectos importantes. En primer lugar, la dosis infecciosa en humanos, ya que es relativamente baja (de 1-10 bacilos). En segundo lugar, la carga bacilar en el material biológico y la posibilidad de generar aerosoles (dependiendo del número de maniobras, la carga de trabajo del laboratorio y las habilidades técnicas del personal), así como la viabilidad del bacilo, que pueden permanecer en el aire durante horas y ser inhalado o permanecer en las superficies y dedos, dando lugar a contaminación secundaria de la boca y la cavidad nasal. En la contaminación secundaria hay que tener en cuenta que la supervivencia estimada de Mtb es de 90 a 120 días en el polvo, 105 días en papel y 45 días en la ropa (López-Cerero, Esteban-Moreno and González-Martín, 2007).

Por ende, durante la manipulación del material biológico se siguieron los Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Tuberculosis (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019), las buenas prácticas de laboratorio y el uso correcto de protección personal, definido por cada técnica, y contando con la infraestructura correcta para cada procedimiento. Como protección personal se utilizaron batas de laboratorio desechables con abertura en la espalda, manga larga y puño elástico. En cada procedimiento siempre se utilizaron guantes, cambiándose con regularidad y sin ser reutilizados. Siempre se siguió el correcto lavado de las manos al retirar los guantes y antes de salir del laboratorio. Se emplearon respiradores N95 durante las actividades que implicaron el manejo de cultivos.

Se cumplió con las recomendaciones mínimas de bioseguridad, respecto a la infraestructura, para los diferentes procedimientos o técnicas siendo las siguientes:

1. Baciloscopias: ventilación adecuada y área técnica de laboratorio separada.
2. Inoculación de cultivo: infraestructura de material impermeable (pisos, paredes, mesas de trabajo, etc.), ventanas cerradas y área sin recirculación de aire y manejo del material biológico en Cabina de Seguridad Biológica (CSB) Clase II Tipo A2.
3. Manipulación de cultivos: todos los requisitos previos, contando con doble puerta de entrada y una autoclave en el laboratorio para la eliminación de los desechos infecciosos.

3.6 Baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen

La técnica se basa en la ácido-alcohol resistencia, que es la propiedad que tienen las micobacterias de unir en su pared fucsina fenicada o auramina y retenerlas frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen las micobacterias en la pared celular. Así, es posible reconocer a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en la muestra como un bastoncito rojo fucsia sobre una coloración de fondo que facilita su visualización. La tinción de Ziehl-Neelsen ha sido la técnica más empleada para el diagnóstico de tuberculosis en los países de América Latina durante los últimos 100 años. Comparado con la microscopía de fluorescencia, la microscopía convencional tiene como ventaja que requiere un entrenamiento más sencillo, ya que la capacidad de identificar el bacilo por esta metodología es más fácil de adquirir (OPS | OMS, 2008).

Para las baciloscopias se utilizó una laminilla por paciente y realizaron dos fijaciones de la muestra, una fijación directa y otra después realizar una limpieza de la muestra con el método de Petroff siguiendo los procedimientos descritos en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS and OMS, 2017) y la Guía Técnica para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS and OMS, 2008).

Los extendidos de la fijación directa se realizaron en laminillas esmeriladas tomando con un asa estéril desechable la porción más purulenta de la muestra (para aumentar la probabilidad de identificar la micobacteria) barriendo la muestra en la laminilla evitando

llevarla a los bordes mediante movimientos circulares y suaves. Posteriormente se dejó secar en una CSB SterilGARD Clase II Tipo A2.

Para la segunda fijación se descontaminaron las muestras de esputo empleando el método de limpieza de Petroff. Las dos o tres muestras de esputo (según el caso) se homogenizaron con 15 ml de NaOH al 4% en un tubo cónico Falcon de rosca, previa y correctamente rotulados. Se agitaron cuidadosamente dejando actuar el NaOH por 5 minutos y posteriormente se centrifugaron (centrífuga Thermo Scientific modelo CL2) por 10 minutos a 3000 rpm. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se le agregaron 15 mL de buffer de fosfatos pH 6.8 al precipitado restante. Se agitaron los tubos nuevamente y se centrifugaron bajo las mismas condiciones anteriores. Se descartó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL del buffer, resuspendiendo mediante agitación manual el sedimento y finalmente se tomó una asada de la muestra para realizar el segundo extendido sobre la misma laminilla donde se realizó la fijación directa dejándolo secar en la CSB.

Se tiñeron las laminillas mediante la técnica de Ziehl-Neelsen en frío siguiendo el procedimiento descrito:

1. Se colocaron las laminillas correctamente rotuladas en varillas de sujeción sobre una charola de tinción.
2. Se cubrió totalmente la superficie del extendido con fuscina fenicada y se dejó actuar por 3-5 minutos (dependiendo del grosor del extendido) y se enjuagó el colorante utilizando una piseta con agua corriente sin ejercer mucha presión.

3. Para la decoloración se cubrió el extendido con alcohol ácido por 30-60 segundos y se enjuagó con abundante agua.
4. Se colocó azul de metileno cubriendo todo el extendido para generar la coloración de fondo. Se dejó actuar por 1-3 minutos y se enjuagó con abundante agua.
5. Posteriormente se colocaron las laminillas en posición vertical sobre papel absorbente y se dejaron secar. Una vez secas se procedió al análisis microscópico (Microscopio Binocular Leica CME, serie 1349521X) con aceite de inmersión utilizando el objetivo de 100X y examinando sistemáticamente 100 campos útiles.

Las muestras se reportaron como negativas cuando no se encontraban BAAR en los 100 campos observados. Al identificarse de 1-9 BAAR por campo dentro de los 100 campos se reportó el número exacto de bacilos identificados. Los casos con 10-99 BAAR por campo en 100 campos se reportaron como positivos (+). De 1-10 BAAR por campo en 50 campos se reportaron positivos (++) y las muestras con 10 BAAR por campo en 20 campos observados se reportaron como positivos (+++).

3.7 Aislamiento y cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en medio sólido Löwenstein-Jensen (LJ)

3.7.1 Preparación del medio sólido LJ

Para el aislamiento y cultivo de las micobacterias se preparó el medio a base de huevo Löwenstein-Jensen (LJ) siguiendo la metodología descrita en la Guía Técnica para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS and OMS, 2008). Para la base de huevo del medio se utilizaron entre 20-25 huevos frescos (para un volumen aproximado de 1000 mL) de granja, sin haber recibido algún tratamiento antibiótico. Se descontaminaron sumergiéndolos en agua con jabón durante 30 minutos. Posteriormente se limpiaron con un cepillo, se enjuagaron con agua corriente y se limpiaron con una gasa embebida con alcohol al 70%. Se conservaron en refrigeración (2-4°C) hasta su utilización.

Se homogenizaron 2.4 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4), 0.24 g sulfato de magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.6 g de citrato de magnesio, 3.6 g de L-asparagina, 12 mL de glicerol y 20 mL de verde de malaquita al 2% en 600 mL de H_2O destilada para preparar 1600 mL de medio. La mezcla se esterilizó a 121°C x 15 min.

Se recolectó el contenido de los huevos y se colocaron en un vaso de precipitado. Se mezclaron y se traspasaron a una probeta para medir el volumen final, filtrándolos con una gasa estéril para eliminar las partículas no desintegradas del huevo. Una vez filtrado se homogenizaron ambas partes en un recipiente estéril.

Integradas las fases se vació a los tubos agregando entre 7-8 mL de medio, cuidando que el vaciado se efectuara por la pared interna del tubo para evitar la formación de burbujas, ya que interfieren en el crecimiento de la micobacteria.

Una vez preparados los tubos se colocaron en un horno de hibridación ProBlot™ 6 en posición inclinada formando un pico de flauta a 80°C durante 40-45 minutos. Se almacenaron para su posterior uso en refrigeración a 2-4°C. El tiempo máximo de almacenamiento recomendado es de 2 meses, pasando este periodo de tiempo el medio va perdiendo sensibilidad.

3.7.2 Inoculación e incubación

Para la inoculación de las muestras de esputo se realizó una descontaminación empleando el método de limpieza de Petroff como se indica en el Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis (OPS and OMS, 2008), descrito previamente en la sección 3.6. Seguido de la descontaminación de la muestra se distribuyó el sedimento con un asa estéril desechable calibrada (10 µL) en cada tubo con medio de cultivo. Posteriormente los tubos sembrados se colocaron en una gradilla para su incubación a 37°C, colocándolos inclinados y posicionando el pico de flauta hacia arriba.

Los tubos se mantuvieron en incubación por un periodo de 8 semanas, inspeccionándolos en periodos de 2-3 días para detección de contaminaciones, a los 7 días

para identificar los tubos con desarrollo del bacilo (en caso de haberlo se registró el momento en el que se observó el crecimiento) y luego una vez por semana.

Los cultivos se registraron como positivos al observar la presencia de colonias rugosas o lisas con pigmentación blanco-amarillenta, reportando el desarrollo de las colonias y su velocidad de crecimiento. Todos los cultivos positivos se almacenaron en refrigeración después de las 8 semanas de incubación.

3.8 Capacidad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano *in vitro*

3.8.1 Método de difusión en disco

Para la evaluación de la capacidad antibacteriana de las nanopartículas se utilizó el método de difusión en disco siguiendo el protocolo descrito en M02-A12 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Preparación de los discos de sensibilidad:

Para la preparación de los discos de sensibilidad se perforaron discos de 6 y 8 mm de papel filtro Whatman No.1 y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se absorbieron lentamente las soluciones de nanopartículas en los discos de papel en CSB a temperatura ambiente siguiendo el protocolo descrito por *GoldBio: Disk Diffusion Assay Protocol* (Louis, 2018). Las concentraciones y tamaños de partícula de las muestras

preparadas se describen en la siguiente tabla. Como control negativo se prepararon discos con solución de ácido acético al 0.01%.

Nanopartícula	Tamaño (nm)	Concentración por disco
NPQ100	166.4	100, 250, 1000 µg/mL
NPQ200	178.4	100, 250, 1000 µg/mL
NPQ600	185.7	100, 250, 1000 µg/mL
NPQ1200	208.6	100, 250, 1000 µg/mL
NPQ1400	302.3	100, 250, 1000 µg/mL

Preparación de los inóculos:

Para la preparación de los inóculos se aislaron colonias de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 14053 en placa de agar con un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Una vez aisladas se tomaron con un asa estéril de 2 a 3 colonias con la misma apariencia morfológica y se inocularon en tubos con 5 mL de medio de caldo Mueller-Hinton (MHB) y se incubaron nuevamente a 37°C. Se ajustó la turbidez de la suspensión para estandarizar el tamaño del inóculo de acuerdo al estándar 0.5 de McFarland midiendo la absorbancia de los inóculos a una longitud de onda de 625 nm, la absorbancia debe de ser 0.08 – 0.1 para obtener una concentración final aproximada de 1 a 2 x10⁸ CFU/mL.

Inoculación y aplicación de los discos en las placas de prueba:

Posteriormente se inocularon las placas de prueba de agar Mueller-Hinton (MHA), sumergiendo un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, girando el hisopo varias veces y presionando firmemente en la pared interior del tubo para eliminar el exceso de fluido, rayando la torunda sobre toda la superficie del agar repitiendo el proceso dos veces mas girando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. A continuación, se colocaron los discos previamente preparados con pinzas estériles, flameando las pinzas entre cada disco, colocándolos suavemente en la parte superior del agar y presionando ligeramente para asegurar el contacto completo. Se incubaron las placas invertidas a 37°C y se examinaron a las 24, 48 y 72 horas para identificar si se presentaron zonas de inhibición y medir los diámetros (incluido el diámetro del disco) hasta el milímetro completo más cercano.

3.8.2 Método de microdilución en caldo

Para la determinación de la CMI y CMB de las nanopartículas se utilizó el método de microdilución en caldo siguiendo los protocolos estandarizados en los documentos M02-A12 y M26-A del (CLSI, 2015).

Preparación de las placas de microdilución:

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos con doce columnas (etiquetadas 1–12) y ocho filas (etiquetadas A – H). Se llenaron los pocillos de la columna 1 con 200 μ L de la solución de trabajo (NPQ) mientras que los pocillos de la columna 2 a la 12 se llenaron con 100 μ L de medio MHB. Posteriormente, se tomaron 100 μ L de la solución de trabajo de la columna 1 y se mezclaron con el MHB de la segunda columna. Luego, se tomaron nuevamente 100 μ L de la mezcla de la solución de trabajo-MHB de la segunda columna y se pasaron a la tercera columna con MHB y así sucesivamente hasta llegar a la décima columna.

Preparación de los inóculos:

Para la preparación de los inóculos se aislaron colonias de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 14053 en placa de agar con un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Una vez aisladas se tomaron con un asa estéril de 2 a 3 colonias con la misma morfología y se inocularon en tubos con 5 mL con MHB y se incubaron nuevamente a 37°C. Se ajustó la turbidez de la suspensión para estandarizar el tamaño del inóculo de acuerdo al estándar 0.5 de McFarland midiendo la absorbancia de los inóculos a una longitud de onda de 625 nm, la absorbancia debe de ser 0.08 – 0.1 para obtener una concentración final aproximada de 1 a 2 x 10⁸ CFU/mL.

Inoculación y aplicación de los discos en las placas de prueba:

Una vez listas las diluciones y preparados los inóculos se agregaron 5 µL de la suspensión bacteriana en cada pocillo de la columna 2 a la 11. La columna 11 se reservó como control positivo para todas las muestras, donde solo había el medio de crecimiento y la suspensión bacteriana. La columna 12 sirvió como control negativo, conteniendo únicamente el medio de crecimiento.

La CMI se determinó a partir del pocillo en el que se inhibió totalmente el crecimiento visible de bacterias después de la incubación. Después de la observación, la solución de cada pocillo se pasó a una placa de MHA y se incubó durante otras 24 horas. El CMB se determinó a partir de la concentración más baja a la que no se produjo ningún crecimiento visible en las placas inoculadas.

3.9 Actividad antimicobacteriana nanopartículas de quitosano *in vitro*

3.9.1 Método de difusión en disco

Para las pruebas de sensibilidad antimicobacteriana en cultivo de medio sólido se siguió el método de difusión en disco modificado al descrito en la Guía Técnica para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS and OMS, 2017).

Preparación de los discos de sensibilidad:

Para la preparación de los discos de sensibilidad se perforaron discos de 8 mm de papel filtro Whatman No.1 y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se absorbieron lentamente las soluciones de nanopartículas en los discos de papel en CSB a temperatura ambiente siguiendo el protocolo descrito por *GoldBio: Disk Diffusion Assay Protocol* (Louis, 2018). Las concentraciones y tamaños de partícula de las muestras preparadas se describen en la siguiente tabla. Como control negativo se prepararon discos con solución de ácido acético al 0.01%.

Nanopartícula	Tamaño (nm)	Concentraciones por disco
NPQ100	166.4	1000 µg/mL
NPQ200	178.4	1000 µg/mL
NPQ600	185.7	1000 µg/mL
NPQ1200	208.6	1000 µg/mL
NPQ1400	302.3	1000 µg/mL

Preparación del inóculo:

Para la preparación del inóculo para medio sólido LJ se tomó la masa bacilar con asa desechable estéril procurando tomar material de todas las colonias evitando arrastrar medio de cultivo. Se colocó el material recolectado en un tubo hermético con perlas de vidrio y 1 mL de agua destilada estéril y se agitó en vortex hasta disgregar y homogenizar las colonias, verificando que no existieran grumos en el sobrenadante. Se dejaron reposar los tubos de 15 a 30 minutos para sedimentar grumos y disminuir el riesgo de dispersar aerosoles. Se

recolectó el sobrenadante suavemente con una pipeta, sin tocar los grumos que pudieran haber decantado, y se transfirió a un nuevo tubo para ajustar el inóculo de acuerdo al patrón de turbidez 0.5 de McFarland.

Inoculación y aplicación de los discos en las placas de prueba:

Posteriormente se inocularon las placas de prueba de LJ sumergiendo un hisopo de algodón estéril en la dilución girando el hisopo varias veces y presionando firmemente en la pared interior del tubo para eliminar el exceso de fluido rayando la torunda sobre toda la superficie del agar repitiendo el proceso dos veces mas girando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Consecuentemente se colocaron los discos previamente preparados con pinzas estériles, flameando las pinzas entre cada disco, colocándolos suavemente en la parte superior del agar y presionando ligeramente para asegurar el contacto completo. Se incubaron las placas invertidas a 37°C y se examinaron a los 2-7 días para identificar si se presentaron zonas de inhibición y medir los diámetros (incluido el diámetro del disco) midiendo hasta el milímetro completo más cercano.

3.9.2 Método de proporciones en medio sólido

Para las pruebas de susceptibilidad en medio sólido mediante el método de proporción de agar se trabajó de acuerdo a los procedimientos indicados por la CLSI M24-A2 *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes* (CLSI

et al., 2011) utilizando Agar Sangre (AS) al 5% en lugar de Agar Middlebrook 7H10/11 (Apéndice 1).

Preparación del agar sangre con suspensión de nanopartículas:

El AS se preparó con agar tripticaseína de soya de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se enriqueció añadiendo sangre suficiente para alcanzar el 5%. Se dividió en partes para preparar las distintas diluciones de nanopartículas de quitosano y el agar sin antibiótico (control). Para lograr la concentración final deseada se agregó el volumen apropiado de solución de trabajo (como se muestra en la tabla) a la base de agar sangre templado en un baño de agua entre 50 y 56°C. Las soluciones preparadas se vertieron en placas de Petri de plástico estériles, previamente etiquetadas, en cantidades de 5 ml por cuadrante. Se reservó un cuadrante de cada placa para el medio de agar sin ningún fármaco añadido como control de crecimiento.

Agente antimicrobiano	Tamaño (nm)	Concentración (µg/mL)	Volumen para adicionar a 15 mL de agar sangre	Concentración final del agente en el agar
NPQ1	86.02	1000	1.5, 3, 4.5	100, 200, 300 µg
NPQ2	152.1	2000	1.5, 2.25, 3	200, 300, 400 µg
NPQ3	208.6	1000	1.5, 3, 4.5	100, 200, 300 µg
NPQ4	302.3	1000	1.5, 3, 4.5	100, 200, 300 µg
NPQ5	363.1	3000	1.5, 2.5, 5	200, 300, 400 µg

Preparación del inóculo:

El inóculo se obtuvo de colonias recién desarrolladas (de no más de cuatro a cinco semanas de edad) de la superficie del medio de agar LJ. La masa bacteriana se traspasó a un tubo con tapón de rosca estéril conteniendo de 6 a 10 perlas de vidrio en 3-4 mL de solución salina estéril y se homogenizaron agitando vigorosamente en vortex. Se dejó reposar el tubo por 30 minutos para permitir que se sedimentaran los grupos más grandes de organismos y disminuir la posibilidad de dispersión de aerosoles. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó la densidad del inóculo al estándar de turbidez 0.5 de McFarland.

Diluciones de las suspensiones bacilares:

Después de la preparación del inóculo se realizaron diluciones en cuatro tubos con tapa de rosca, conteniendo 9 ml de agua destilada estéril o solución salina estéril para generar cuatro diluciones, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , y 10^{-4} .

Se transfirió 1 mL del sobrenadante de la suspensión madre a uno de los tubos con 9 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}), se agitó en vortex y se esperó unos minutos antes de transferir el inóculo a la siguiente dilución. Se repitió el procedimiento para las siguientes suspensiones hasta llegar a la concentración deseada del último tubo (dilución 10^{-4}).

Inoculación e incubación del medio:

Para obtener un desarrollo suficiente y poder contabilizar las colonias se inocularon 2 diluciones (10^{-2} y 10^{-4}) como control de crecimiento. Se ordenaron los tubos conteniendo las diluciones del inóculo en serie en una gradilla y se ordenaron las placas siguiendo la misma secuencia. Con una micropipeta se sembraron exactamente 0,1 mL de la primera dilución (10^{-2}) en cada uno de los cuadrantes conteniendo las soluciones de nanopartículas e igualmente en los cuadrantes de control crecimiento. Se repitió el mismo procedimiento con la dilución 10^{-4} . Las placas se movieron suavemente para distribuir la siembra del inóculo en la superficie del medio.

Se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que el líquido del inóculo fue absorbido completamente en el agar. Las placas inoculadas se sellaron y se colocaron en bolsas de polietileno para mantenerse en incubación a 37°C. Se monitorearon durante un periodo de 3 semanas posteriores a la incubación en busca del crecimiento de Mtb o contaminaciones.

Lectura e interpretación de resultados:

Los resultados se reportaron después de 3 semanas de incubación. Las placas se leyeron a los 7, 15 y 21 días. La primera lectura a los siete días tiene el propósito de detectar el crecimiento de bacterias u hongos contaminantes y para la detección de cualquier micobacteria de crecimiento rápido. Cuando se encuentran al menos 50 colonias (1+) en el

medio de control y las colonias están maduras, la resistencia puede notificarse antes de las tres semanas. Sin embargo, la interpretación "susceptible a fármacos" no debe hacerse hasta la tercera semana para proporcionar un tiempo adecuado para el crecimiento. La cantidad de crecimiento en cada cuadrante se registra de la siguiente manera:

Desarrollo observado	Registrar
> 500 colonias (crecimiento confluyente)	4+
200 a 500 colonias	3+
100-200 colonias	2+ (y el numero aproximado de colonias)
50-100 colonias	1+ (y el número de colonias)
0-50 colonias	Registre el número real de colonias.

Al menos uno de los cuadrantes de control del conjunto de dos diluciones debe tener un mínimo de 50 colonias; de lo contrario, los resultados no son válidos y la prueba debe repetirse. Si el cuadrante de control tiene un crecimiento de al menos 1+ y no hay crecimiento en el cuadrante que contiene el fármaco, los resultados se pueden informar como susceptibles. En la mayoría de los casos, será posible estimar la proporción de colonias resistentes en más o menos del 1% de la población de control. La mayoría de los resultados del cultivo serán obviamente susceptibles o resistentes (ver ejemplos en el Apéndice H). Cuando el cuadrante de control tiene un crecimiento confluyente (> 500 colonias) y hay menos de un crecimiento confluyente en el cuadrante que contiene el fármaco, el porcentaje de resistencia no se puede determinar con precisión y la prueba debe repetirse.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Síntesis de las nanopartículas de quitosano

Se obtuvieron las nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio (NPQ) mediante el método de gelificación ionotrópica con variaciones de tamaño dependiendo de la concentración de NaCl. Se realizó un barrido de síntesis para identificar los distintos tamaños que pudieran obtenerse y determinar las concentraciones máximas y mínimas de sal que permitieran la formación de las nanopartículas sin afectar el proceso de síntesis.

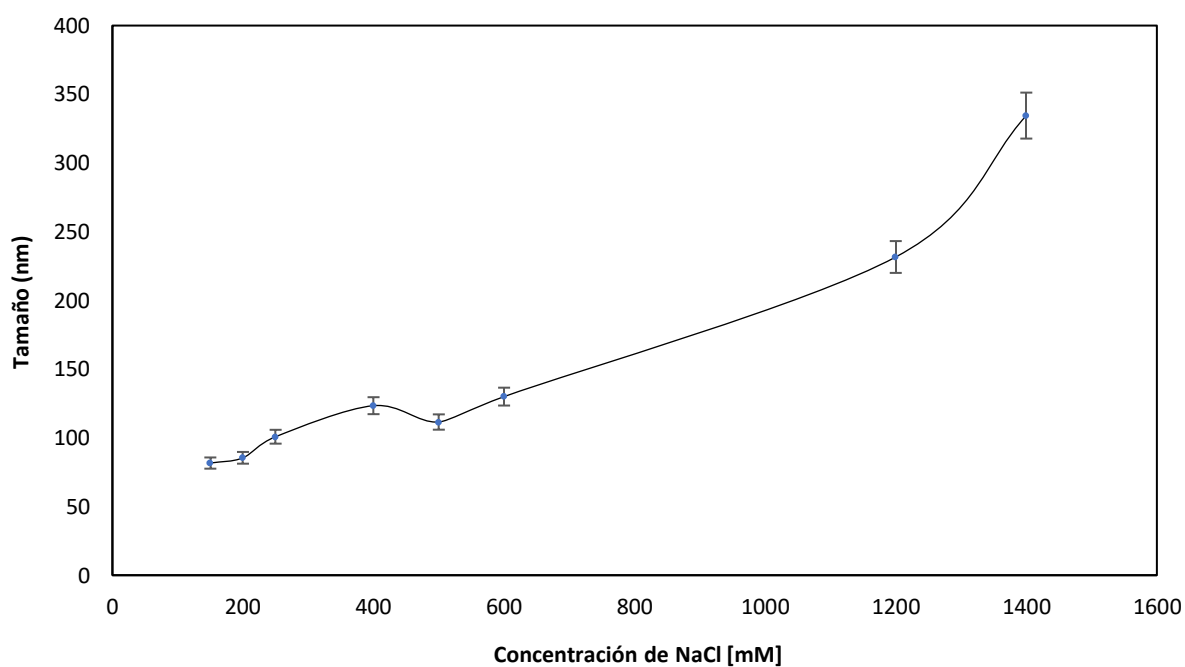
Para caracterizar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas y su distribución de tamaño (PDI) se analizaron las muestras en solución mediante dispersión de luz dinámica (DLS). En la siguiente tabla se concentran los datos de los tamaños de partícula obtenidos a diferentes concentraciones de sal (NaCl) en un rango de 150 a 1400 mM. Como se esperaba, el cambio del tamaño de partícula es dependiente de la concentración de sal agregada en el proceso de síntesis, resultando que a mayor concentración de sal mayor es el tamaño de partícula obtenido (gráfica 1), concordando con la información previamente reportada (Sawtarie, Cai and Lapitsky, 2017b). Las síntesis que se realizaron en ausencia de sal generaron lotes con alta polidispersidad y sobrepasaban los 700 nm. La máxima concentración de sal que permitió la formación de nanopartículas con una distribución de tamaño uniforme fue de 1400 mM. AL utilizar concentraciones mayores a ésta se debilita la unión quitosano-TPP debido a una unión competitiva de aniones Cl^- y TPP en las cadenas de

quitosano, por lo tanto, se ralentiza la agregación al grado de inhibir la formación de las nanopartículas (Huang and Lapitsky, 2011).

Tabla 2. Variaciones de tamaño de las NPQ en relación a las concentraciones de NaCl en el proceso de síntesis.

Muestra	Concentración de NaCl (mM)	Tamaño (nm)	PDI
NPQ-1	150	81.63	0.203
NPQ-2	200	85.45	0.206
NPQ-3	250	100.8	0.172
NPQ-4	400	123.4	0.221
NPQ-5	500	111.5	0.196
NPQ-6	600	130	0.245
NPQ-7	1200	231.6	0.201
NPQ-8	1400	334.5	0.337

Gráfica 1. Tamaño de nanopartícula vs concentración de NaCl.



Por lo tanto, la adición de NaCl al proceso de síntesis en concentraciones específicas (de 150-1400 mM) permitió la formación de distintos tamaños de nanopartículas de manera ajustable cambiando esta única condición. Además, mejoró la estabilidad coloidal de éstas logrando índices de polidispersidad estrechos. El aumento del tamaño de partícula a mayores concentraciones de sal se atribuye a la repulsión electrostática que se genera por la adición de la fuerza iónica que proporciona la sal monovalente. Así aumenta la frecuencia de colisiones en la solución, lo que conlleva a la coagulación del TPP con las cadenas de quitosano, formando agregados de partículas primarias en mayores conforme aumenta la fuerza iónica (Huang and Lapitsky, 2012).

Las concentraciones de quitosano y TPP utilizadas durante la preparación de las nanopartículas también generan un impacto sobre su tamaño, por ello se sintetizaron lotes para formar cuatro tamaños distintos de nanopartículas empleando el mismo método anterior, pero aumentando las concentraciones de quitosano y TPP proporcionalmente (1:1) para obtener soluciones más concentradas y relacionar el cambio de tamaño en estas síntesis.

Como se esperaba, el aumento de las concentraciones generó tamaños de partícula mas grandes (Tabla 3, 4 y 5) y el aumentó del tamaño de partícula con relación a las concentraciones de sal no se vio afectado al cambiar las condiciones de concentración del quitosano y el reticulante. Las síntesis se realizaron a tres distintas concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3%, siendo esta última la concentración mas alta que permitió la formación de las nanopartículas con baja polidispersidad, ya que a concentraciones mayores el proceso de síntesis no se desarrollaba efectivamente.

Tabla 3. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.1%.

Muestra	NaCl (mM)	Tamaño (nm)	PDI
NPQ100-1	100	86.02	0.273
NPQ600-1	600	152.1	0.236
NPQ1200-1	1200	216.1	0.211
NPQ1400-1	1400	288.2	0.260

Tabla 4. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.2%.

Muestra	NaCl (mM)	Tamaño (nm)	PDI
NPQ100-2	100	166.4	0.244
NPQ600-2	600	185.7	0.232
NPQ1200-2	1200	208.6	0.276
NPQ1400-2	1400	302.3	0.279

Tabla 5. Nanopartículas de quitosano/TPP con variación de tamaños al 0.3%.

Muestra	NaCl (mM)	Tamaño (nm)	PDI
NPQ100-3	100	200.5	0.296
NPQ600-3	600	220.3	0.272
NPQ1200-3	1200	363.1	0.472
NPQ1400-3	1400	725.9	0.806

4.2 Influencia del cambio de pH sobre las cargas superficiales

Para analizar el comportamiento de las nanopartículas de quitosano/TPP encontrándose en diferentes niveles de pH se realizó un análisis de las principales características que se ven afectadas por esta condición, siendo éstas el potencial Z (carga superficial) y su diámetro hidrodinámico, las cuales fueron determinadas mediante DLS cuando se encontraban en solución a distintos pH. Se ajustaron las soluciones con NaOH 0.1 M para obtener una titulación de pH de 2.5 hasta 10.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 6. Las suspensiones de nanopartículas después de su síntesis presentaron un pH final de 4 ± 0.5 , presentando bajo estas condiciones un potencial Z positivo, que puede explicarse debido a la protonación de los grupos amino e hidroxilo del quitosano al encontrarse en medio ácido, formando puentes de hidrógeno con el agua (Thakur and Taranjit, 2011), y presentando tamaños nanométricos en un rango aproximado de 100-300 nm con una polidispersidad estrecha.

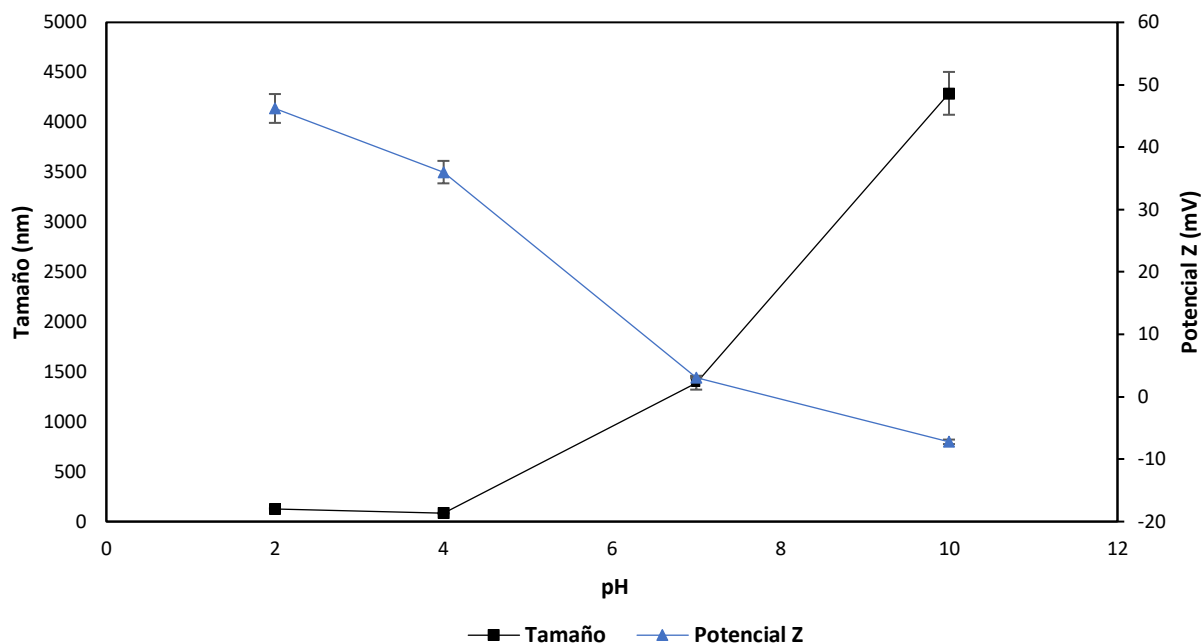
En respuesta al aumento de pH las cargas superficiales de las nanopartículas fueron disminuyendo volviéndose cada vez menos positivas, casi neutras a pH 7 y alcanzaron cargas ligeramente negativas a niveles de pH alcalinos (pH 10) en un rango de 46.2 a -7.22 mV. De manera contraria, conforme aumentó el pH, los tamaños de las nanopartículas fueron escalando a niveles micrométricos, aumentando drásticamente su tamaño original. Este fenómeno podría atribuirse a la neutralización de las cargas positivas del quitosano con la

adición del NaOH, que genera el medio ácido haciendo que éstas formen aglomeraciones entre ellas.

Tabla 6. Respuesta de las propiedades fisicoquímicas de las NPQ sometidas a cambios de pH.

Muestra	pH	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z
NPQ-100	2.5	129.2	0.335	46.2
	4.0	183.4	0.275	36
	7.0	335.4	0.713	3.11
	10.0	308.3	0.814	-7.22
NPQ-600	2.5	183.4	0.298	40.2
	4.0	143.5	0.213	40.0
	7.0	1287	0.727	1.71
	10.0	9687	0.470	-5.37
NPQ-1200	2.5	335.4	0.312	47.2
	4.0	229.7	0.209	43.6
	7.0	3756	1.000	4.22
	10.0	9625	0.78	-5.82
NPQ-1400	2.5	308.3	0.216	49.2
	4.0	260.5	0.201	42.8
	7.0	3495	0.949	5.98
	10.0	1113	0.724	-4.12

Gráfica 2. Tamaño y potencial Z vs pH de las NPQ



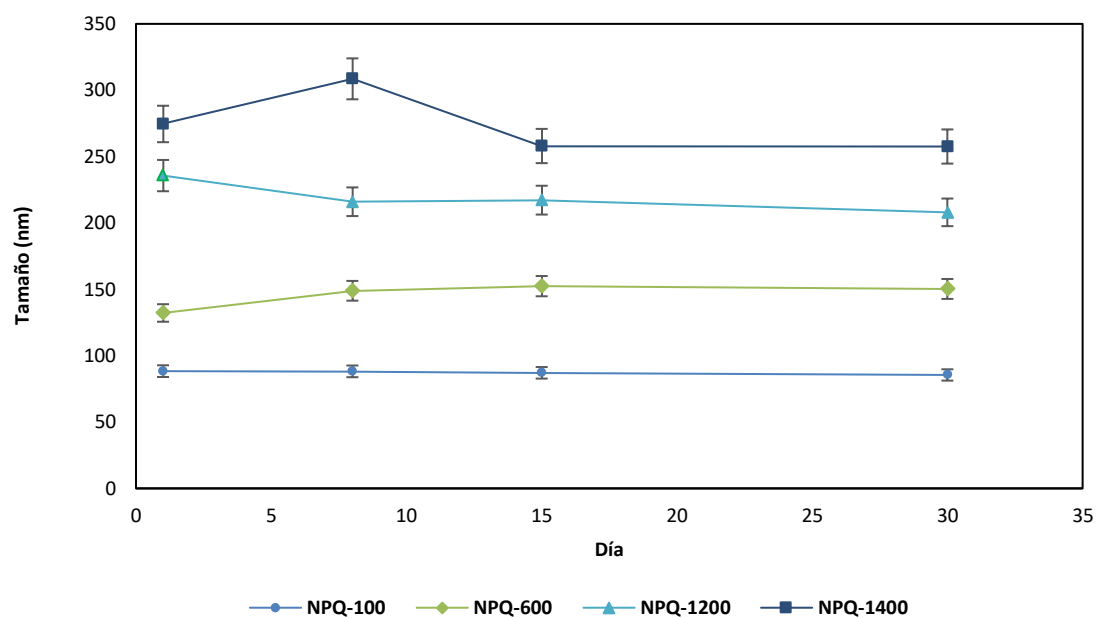
4.3 Estabilidad de las nanopartículas conservadas en solución

Se analizó la estabilidad de las soluciones de nanopartículas almacenadas en refrigeración (2-4°C) por un periodo de 30 días, muestreando su tamaño, pH y PDI a los días 1, 7, 8, 15 y 30 mediante DLS. Los datos se muestran en la siguiente tabla. Cada muestra se preservó a un pH de 4 ± 0.5 , el cual no presentó cambio alguno durante el periodo de almacenamiento. Los tamaños de partícula se mantuvieron estables (gráfica 3) y los índices de polidispersidad aumentaron ligeramente en los últimos 2 muestreos con excepción de NPQ-600.

Tabla 7. Estabilidad de las nanopartículas de quitosano/TPP conservadas en solución a pH 4.

Nanopartícula	Día 1		Día 8		Día 15		Día 30	
	Tamaño	PDI	Tamaño	PDI	Tamaño	PDI	Tamaño	PDI
NPQ-100	88.36	0.269	88.20	0.279	87.1	0.372	85.49	0.371
NPQ-600	132.2	0.225	148.9	0.222	152.4	0.241	150.3	0.244
NPQ-1200	235.7	0.273	216.0	0.195	217.2	0.201	208.0	0.189
NPQ-1400	274.6	0.283	308.6	0.310	258.0	0.195	257.6	0.204

Gráfica 3. Tamaño vs día



4.4 Liofilización y reconstitución de las nanopartículas

De los productos de síntesis se seleccionó un lote de cinco tamaños distintos de nanopartículas para analizar su porcentaje de rendimiento. Para ello las muestras se sometieron a un proceso de liofilización por un periodo de 48 horas. Después del proceso se recuperaron las nanopartículas con aspecto de polvo blanco. En la tabla siguiente se muestran los porcentajes de rendimiento obtenidos para cada síntesis al igual que el peso de la muestra después de la liofilización.

El porcentaje de rendimiento se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso analizado} \times 100}{\text{peso teórico}}$$

Tabla 8. Porcentajes de rendimiento de las nanopartículas de quitosano/TPP.

Muestra	Tamaño (nm)	Peso del producto liofilizado (mg)	Rendimiento
NPQ-1	81.6	6.5	46.6%
NPQ-2	111.5	8.6	61.7%
NPQ-3	130.0	9.2	66%
NPQ-4	231.6	11.9	85.3%
NPQ-5	334.5	12.2	87.5%

Para la reconstitución de las nanopartículas se utilizó ácido acético al 0.05% como medio de resuspensión. Las muestras se colocaron en viales de cristal de 10 mL empleando las cantidades descritas en la siguiente tabla y se conservaron en agitación magnética durante 24 horas. Posteriormente se sometieron a un baño ultrasónico por 20-25 min y se analizaron sus tamaños e índices de polidispersidad.

Tanto los tamaños de partícula como la polidispersidad de éstas se vieron aumentados en cada una de las muestras después de la resuspensión, a pesar de que el tiempo de sonicación contribuyó a la disminución de ambos parámetros.

Tabla 9. Resuspensión de las nanopartículas liofilizadas en ácido acético al 0.05%.

Nanopartícula	Material liofilizado (mg)	Ác. Acético [0.05%]	Sonicación (min)	Análisis en DLS	
				tamaño (nm)	PDI
NPQ-100	5	2 mL	20	233.6	0.293
NPQ-200	7	3 mL	20	178.4	0.336
NPQ-600	5	2 mL	25	250.9	0.612
NPQ-1200	6	3 mL	25	311.1	0.366
NPQ-1400	5.2	2 mL	25	108.6	0.453

4.5 Microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM)

Se obtuvo la micrografía electrónica de las nanopartículas utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Como se observa en la figura 5 las nanopartículas tienen una baja densidad debido al entrecruzamiento iónico, por lo cual se observan aglomeradas entre sí.

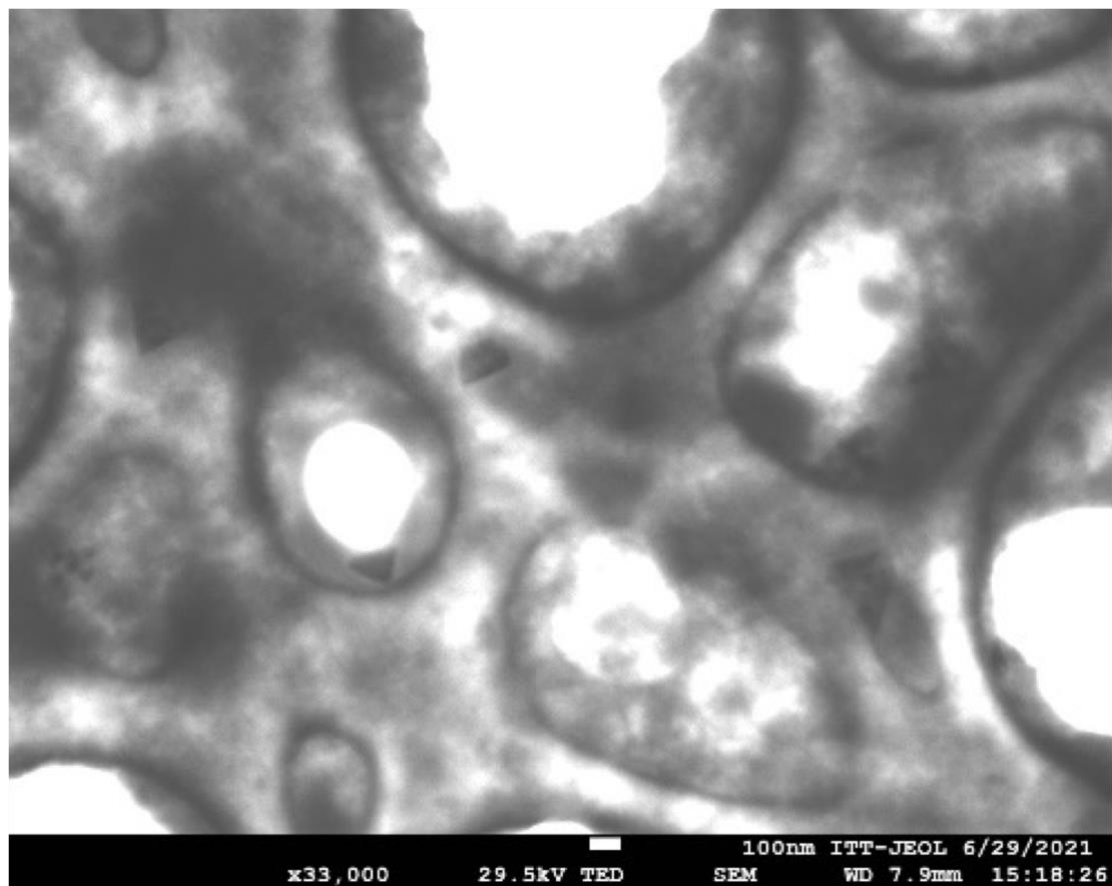


Figura 8. Micrografía electrónica de las nanopartículas de quitosano/TPP.

4.5 Pruebas de inhibición antibacteriana *in vitro*

4.5.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco

Se analizaron las propiedades antimicrobianas de las NPQ *in vitro* implementando la técnica de difusión en disco en placa de agar en una bacteria gramnegativa (*E. coli* ATCC 25922), dos bacterias grampositivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212) y un hongo (*Candida albicans* ATCC 14053). Los discos de papel se cargaron con las soluciones de nanopartículas de cuatro tamaños distintos, permitiendo que éstas se absorbieran lenta y completamente en CSB. Se utilizaron discos de 6 y 8 mm de diámetro. La concentración final de los discos de 6 mm fue de 100 µg en cada uno de los casos. Para los discos de 8 mm se utilizaron concentraciones más altas, alcanzando los 250 y 500 µg.

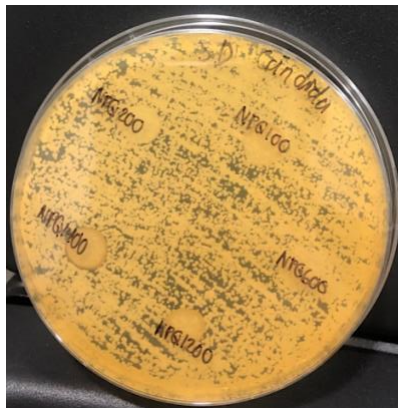
Como se observa en la Figura 9, no se inhibió el desarrollo microbiano en ninguna de las concentraciones. Esto debido a que el método de difusión en disco no es el apropiado para el análisis de las propiedades antimicrobianas de sistemas nanoparticulados, debido a la baja difusividad de éstos, que prácticamente evita que penetren a través del medio de cultivo y las nanopartículas no logran difundirse a través del papel hacia la placa de agar (Kourmouli *et al.*, 2018).



a)



b)



c)



d)

Figura 9. Pruebas de susceptibilidad de las nanopartículas por difusión en disco en placa de MHA en cultivos de *E. coli* (a), *S. aureus* (b) *C. albicans* (c) y *E. faecalis* (d).

4.5.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de microdilución en caldo

Se evaluó la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano por método de microdilución, iniciando a una concentración del 0.2 µg/mL, realizando una doble dilución seriada. Se probaron 4 tamaños de nanopartícula (134.6, 164.6, 216.2 y 280.0 nm) en tres bacterias y una levadura (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 14053). Cada prueba se realizó por triplicado.

La CMI se reportó como la concentración mínima a la cuál se inhibió el crecimiento visible de microorganismos en los pocillos. La CMB se determinó como la concentración más baja a la que no se produjo ningún crecimiento visible al sembrarlas en placas de agar. Los valores obtenidos se encuentran registrados en las tablas siguientes (Tablas 10 y 11).

Las nanopartículas exhibieron un mayor efecto antimicrobiano contra *E. faecalis* con una CMI de 0.125 µg/mL en los tamaños más grandes (216.2 y 280.0 nm), considerándose como susceptible según los valores estandarizados por la CLSI en el documento M100 (CLSI, 2020), donde se indica que una $CMI \leq 8$ µg/mL (en ampicilina y penicilina) se considera susceptible al antibiótico. La CMB para *E. faecalis* fue de 0.25 µg/mL en las nanopartículas con un tamaño de 216.2 nm. Las enterobacterias se consideran susceptibles a la ampicilina una $CMI \leq 8$ µg/mL, por lo tanto en el ensayo *E. coli* se considera susceptible a las nanopartículas de quitosano en todos los tamaños probados, todas las CMI se encontraron por debajo de los 2 µg/mL. Los estafilococos se consideran susceptibles a la

penicilina con una CMI de $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ y resistente a una CMI $\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$, en base a esta estandarización se considera que *S. aureus* presenta resistencia a las nanopartículas siendo todas las CMI mayores a $\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$. En el caso de *C. albicans*, considerándose susceptible al fluconazol a una CMI $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ (NCCLS, 2002), se encontró como susceptible ante 3 tamaños de nanopartículas presentando CMI de 2 y $0.25 \mu\text{g/mL}$, y resistente frente a NPQ1400 (con un tamaño de 280.0 nm) observándose crecimiento microbiano en todas las diluciones de esta nanopartícula.

Tabla 10. Valores de CMI de las nanopartículas de quitosano/TPP en $\mu\text{g/mL}$.

Nanopartícula	Tamaño (nm)	CMI			
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
NPQ100	134.6	0.25	2	0.5	0.25
NPQ600	164.6	2	2	2	2
NPQ1200	216.2	1	0.25	0.125	2
NPQ1400	280.0	0.125	-	0.125	2

Tabla 11. Valores de CMB de las nanopartículas de quitosano/TPP en $\mu\text{g/mL}$.

Nanopartícula	Tamaño (nm)	CMB			
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
NPQ100	134.6	0.5	-	1	0.5
NPQ600	164.6	2	-	2	2
NPQ1200	216.2	1	0.5	0.25	2
NPQ1400	280.0	0.25	-	0.5	2

La nanopartícula con menor capacidad antimicrobiana fue NPQ600, con un tamaño de 164.6 nm, presentando una CMI de 2 µg/mL, siendo ésta la concentración mas alta empleada en el ensayo, en cada una de las bacterias y el hongo.

Las propuestas del mecanismo de acción del quitosano sobre diferentes grupos de bacterias y hongos se enfocan principalmente en sus propiedades policationicas y sus interacciones con la membrana celular. En bacterias gramnegativas (como lo es *E. coli*) que presentan una carga negativa en su membrana, la superficie de la célula permite la unión del quitosano catiónico a los fosfolípidos cuando el pH ambiental es inferior a 6,5 (Kong *et al.*, 2010), lo que finalmente da como resultado un deterioro de las actividades bacterianas vitales. De igual manera, la estructura de la membrana en bacterias grampositivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) se encuentra cargada negativamente debido a la presencia de grupos fosfato en los ácidos teicoicos, sugiriéndose el mismo mecanismo de acción, sin embargo, tienen una pared celular gruesa, lo que podría evitar que el quitosano se una directamente a la membrana celular (Raafat *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2019). En el caso de su actividad antifúngica, el contenido de ácidos grasos insaturados influye positivamente en la fluidez de la membrana, lo que conduce a una mayor negatividad. En estudios previos se demostró que *C. tropicalis* contiene más ácidos grasos poliinsaturados que *C. albicans*, lo que sugiere que la membrana celular de *C. tropicalis* tiene una mayor carga negativa, facilitando así la unión del quitosano catiónico a la membrana celular (Lo *et al.*, 2020).

4.5.3 Pruebas de inhibición de extractos naturales

Se realizó un screening de extractos acuosos simples por decocción de plantas regionales (algunas previamente reportadas por sus capacidades antimicrobianas en aceites esenciales o extractos hidroalcohólicos) como ahuehuete (*Taxodium mucronatum*), ajenojo (*Artemisia absinthium*), anacahuite (*Cordia boissieri*), bardana o lampazo (*Arctium lappa* L.), *Castella tortuosa*, chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), corteza de nogal (*Juglans neotropica* Diels) y bulbos de ajo morado, negro y chino (*Allium sativum*, *Allium neapolitanum* y *Allium sphaerocephalon* respectivamente).

Se encontró inhibición solamente en los extractos de ajo mediante el método de difusión en disco, empleando discos cargados con 300 µg. Se generaron halos de inhibición de 5-12 mm en dos de los tipos probados, *Allium neapolitanum* (ajo negro) y *Allium sativum* (ajo morado) como se aprecia en la Figura 10. Los datos se encuentran representados en la siguiente tabla.

Tabla 12. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de extractos acuosos simples de distintos tipos de ajo mediante difusión en disco (la concentración final de cada disco fue de 300 µg).

Extracto	Zona de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Allium sativum</i>	8	12	10	8
<i>Allium neapolitanum</i>	5	9	7	5



a)



b)



c)



d)

Figura 10. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de extractos de *Allium sativum*, *Allium neapolitanum* y *Allium sphaerocephalon* por difusión en disco en placa de MHA sobre *E. coli* (a), *S. aureus* (b) *C. albicans* (c) y *E. faecalis* (d).

Las zonas de inhibición desarrolladas se pueden interpretar como susceptibles, intermedias o resistentes en base a las estandarizaciones presentadas por el CLSI en el documento M100 (CLSI, 2015). Los valores críticos de sensibilidad estandarizados para enterobacterias (*E. coli*) frente a las sulfonamidas es de 250 o 300 µg (por disco), generando

halos ≥ 16 mm en las bacterias susceptibles y ≤ 10 mm en casos de resistencia. Los extractos de ajo generaron halos de inhibición de 8 y 5 mm (*A.sativum* y *A. neapolitanum* respectivamente) sobre *E. coli* a concentraciones de 300 μ g por disco, por lo tanto, se considera una concentración alta de antimicrobiano en comparación con las sulfonamidas. En el caso de los estafilococos (*S. aureus*) las sulfonamidas a concentraciones de 250 o 300 μ g por disco generan una inhibición ≥ 17 mm en cepas susceptibles y ≤ 12 mm en resistentes, considerándose resistentes a la inhibición antimicrobiana del producto natural en comparación con las sulfonamidas. De igual manera se considera como concentraciones altas de antimicrobianno y con poca respuesta de inhibición del crecimiento contra *E. faecalis* y *C. albicans* comparado con las estandarizaciones del CLSI.

La actividad antimicrobiana de *Allium sativum* ha sido reportada previamente por varios autores, sin embargo, se ha discutido que los compuestos sulfurados (principales encargados de la actividad antimicrobiana) presentes en los extractos de ajo tienen muy poca estabilidad y el efecto disminuye con el tiempo (Phadatare, Viswanathan and Mukne, 2014).

Para mejorar la estabilidad de los compuestos activos en la planta se sometieron bulbos de ajo fresco picados en cubos de 5 mm y se sometieron a liofilización. Posteriormente se maceró para generar un polvo de ajo fresco. La estabilidad de la alicina y los compuestos sulfurados mejoró, sin embargo, la liberación de la alicina ocurre al momento del contacto del polvo de ajo con el agua. Una vez obtenido el polvo de ajo se realizaron nuevas pruebas de inhibición para comprobar que la actividad antimicrobiana persistiera activa incluso

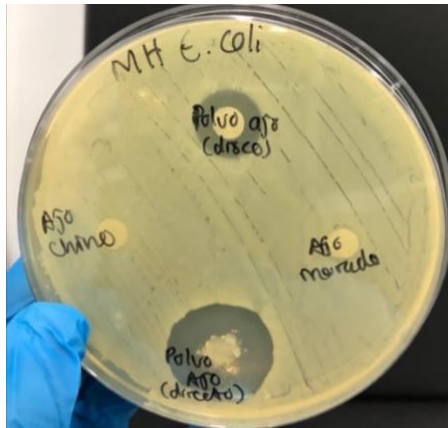
después del proceso de congelación y liofilización. Como se aprecia en las siguientes imágenes (Figura 11) si se conservó si la actividad antimicrobiana.

Las zonas de inhibición se observaron mas desarrolladas y a menor concentración (100 µg por disco). *E. coli* se consideró de resistencia intermedia y *S. aureus* como susceptible en comparación con las estandarizaciones para las sulfonamidas descritas por el CLSI. En el caso de *C. albicans* se considera susceptible al generar halos ≥ 19 mm frente a 25 µg de fluconazol. El ajo generó un halo de 25 mm, considerándose susceptible, sin embargo, la concentración del antimicrobiano fue mas alta que la estandarización.

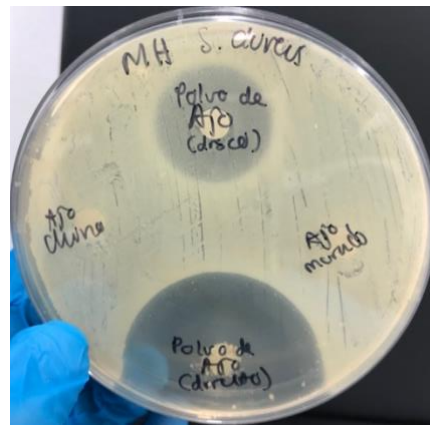
En el caso de *E. faecalis* se puede observar el llamado efecto Eagle, que se describe como una paradójica reducción de la muerte de microorganismos por antibióticos en concentraciones superiores a su concentración bactericida óptima. Este efecto podría generar desventajas en la terapia farmacológica del compuesto (Prasetyoputri *et al.*, 2018).

Tabla 13. Zonas de inhibición de polvo de *Allium sativum* por el método de difusión en disco (la concentración final de cada disco fue de 100 µg).

Extracto	Zona de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Allium sativum</i> (disco)	9	12	15	12
<i>Allium sativum</i> (polvo directo)	13	21	25	14



a)



b)



c)



d)

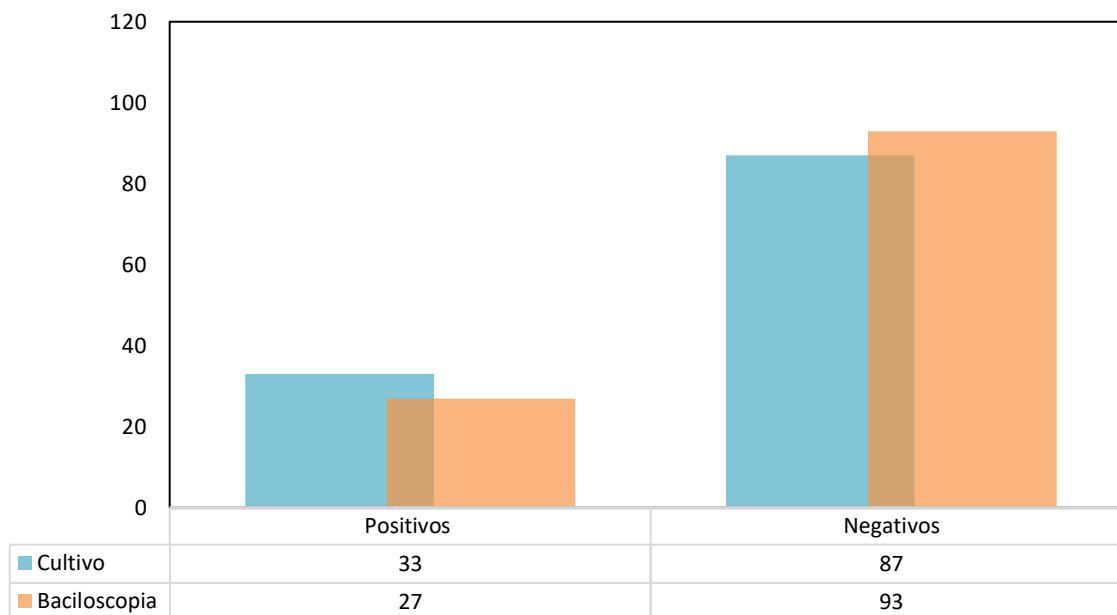
Figura 11. Pruebas de susceptibilidad de polvo de *Allium sativum* por difusión en disco en placa de agar MH sobre *E. coli* (a), *S. aureus* (b) *C. albicans* (c) y *E. faecalis* (d).

4.6 Baciloscopia y cultivo de muestras clínicas para detección y aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*

Se recolectaron 120 muestras en total de pacientes provenientes del Albergue Las Memorias A.C. y del Hospital General en Tijuana B.C que presentaban la sintomatología típica de un caso de tuberculosis, para realizar el diagnóstico por baciloscopia y cultivo de la micobacteria.

En las siguiente gráfica se presentan los resultados de detección de la micobacteria por ambos métodos comparando el número de muestras que se reportaron positivas empleando solamente el método diagnóstico de la baciloscopia y las muestras que se determinaron positivas mediante el cultivo. Un 5% de las muestras se observó como BAAR negativo, resultando posteriormente positivo para la presencia del bacilo tuberculosos mediante el cultivo.

Gráfica 4. Resultados del diagnóstico de TB por baciloscopia y cultivo.



Aunque el cultivo es una prueba de mayor sensibilidad que la baciloscopia su desventaja es el tiempo que requiere para presentar un diagnostico, ya que éste es un bacilo de lento crecimiento y hay que esperar entre 21-45 días para reportar un resultado final. Las muestras positivas tanto en baciloscopia como en cultivo fueron almacenadas para su análisis posterior.

Dentro de los cultivos que resultaron positivos para el bacilo tuberculosos se encontraron diferencias morfológicas significativas, presentándose colonias con crecimiento típico (colonias rugosas color blanco-amarillento) y colonias lisas con crecimiento en monocapa como puede apreciarse en las imágenes presentadas a continuación (Figura 12).

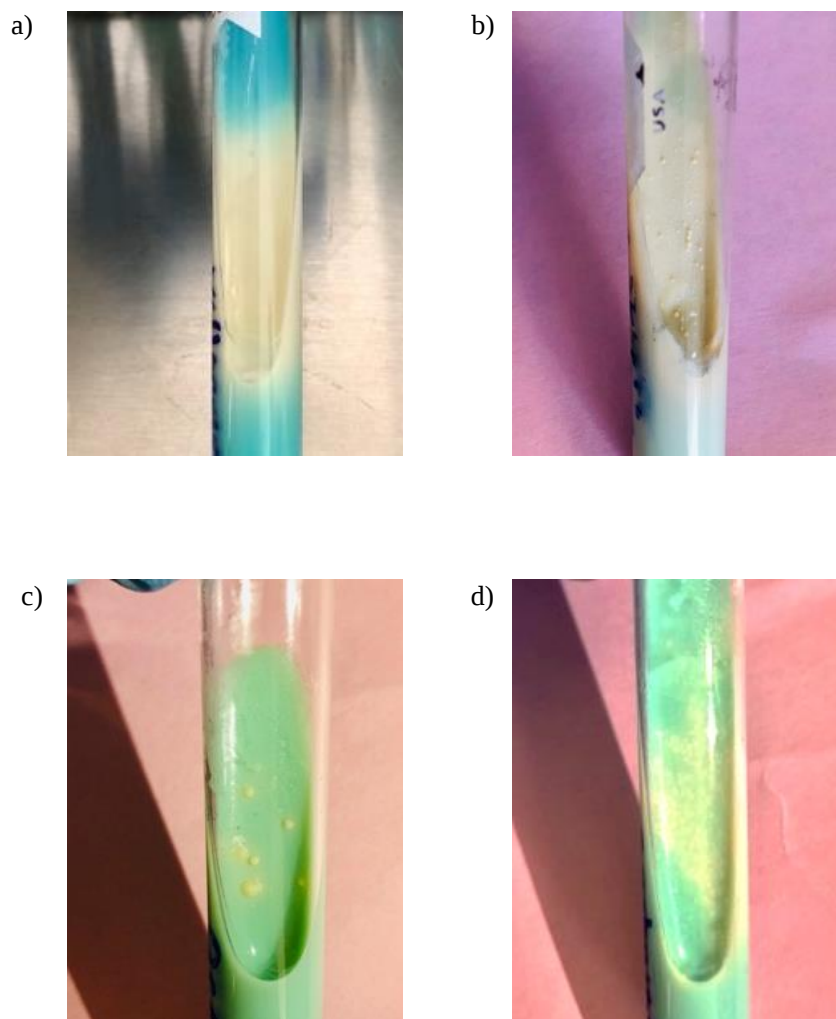


Figura 12. Cultivos de muestras clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* con crecimiento en monocapa (a y b) y crecimiento típico (c y d).

Este fenómeno ya se había reportado previamente explicándose como una falta del glicolípido trehalosa 6,6– dimicolato (TDM) en la pared celular del bacilo, que es el encargado de dar la apariencia rugosa de las colonias, además de asociarse a un estado menos virulento de la micobacteria, utilizado por la población de bacilos intracelulares

(probablemente heterogénea) para alcanzar una coexistencia duradera en el huésped humano (Giovannini *et al.*, 2012; Klein and Yang, 2014).

4.7 Pruebas antimicobacterianas en medios sólidos

4.7.1 Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco en agar LJ

Para el análisis de la capacidad antimicobacteriana de las nanopartículas se estandarizó el crecimiento de la micobacteria en monocapa para sembrarse en placas de agar de Löwenstein-Jensen (LJ) y agar sangre al 5%. El crecimiento se obtuvo en un periodo aproximado de 8 días. Los discos de papel se cargaron con las soluciones de nanopartículas de cinco tamaños distintos, permitiendo que éstas se absorbieran lenta y completamente en campana de flujo laminar. Se utilizaron discos de 8 mm de diámetro conteniendo una concentración final de 500 µg/mL.

No se generaron halos de inhibición en ninguno de los discos cargados de nanopartículas. Como se discutió previamente, esto fue debido a la baja difusividad que poseen las nanopartículas, evitando que penetren a través del medio de cultivo y no logren difundirse a través del papel hacia la placa de agar.

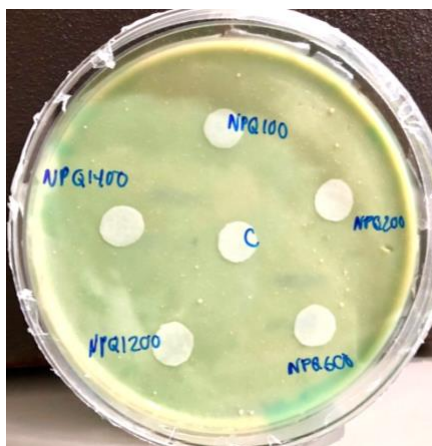


Figura 13. Prueba de susceptibilidad de las nanopartículas por difusión en disco en placa de agar LJ una cepa clínica de *Mycobacterium tuberculosis*.

4.7.2 Pruebas de susceptibilidad por el método de las proporciones

Se realizaron pruebas de sensibilidad a las nanopartículas de quitosano de a distintos tamaños en concentraciones de 100-400 µg/mL, diluidas en agar sangre humana al 5%. Como se muestra en la tabla siguiente se sembraron dos diluciones de la suspensión bacteriana en los cuadrantes de control y los que contenían las soluciones de nanopartículas para realizar un conteo aproximado de las colonias y determinar con ello el porcentaje de colonias resistentes (% resistencia). Para calcular dicho porcentaje se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \textbf{Resistencia} = \frac{\text{número de colonias en el cuadrante con NPQ}}{\text{número de colonias en el cuadrante control}} \times 100$$

Primeramente, se determinó el número de colonias aproximado como se describe en la tabla siguiente presentada en la metodología. Se corroboró que el crecimiento bacteriano correspondiera a BAAR en cada uno cultivos mediante baciloscopia (Apéndice 2). Se sustituyeron los valores como lo indica la fórmula, donde NPQ corresponde a nanopartículas de quitosano.

Tabla 14. Cálculo e interpretación de resultados del crecimiento bacteriano en las placas de agar conteniendo NPQ con un tamaño de 116.6 nm.

Nanopartícula	Concentración	Crecimiento en		
		10^{-2}	10^{-4}	% Resistente
Control	-	3+	25 colonias	-
NPQ1	100 µg/mL	3+	20 colonias	80%
	200 µg/mL	3+	4	16%
	300 µg/mL	0	0	0

Tabla 15. Cálculo e interpretación de resultados del crecimiento bacteriano en las placas de agar conteniendo NPQ con un tamaño de 144.3 nm.

Nanopartícula	Concentración	Crecimiento en		
		10^{-2}	10^{-4}	% Resistente
Control	-	3+	2+ (200 colonias)	-
NPQ2	200 µg/mL	2+ (300 colonias)	2+ (190 colonias)	95%
	300 µg/mL	2+ (300 colonias)	2+ (180 colonias)	90%
	400 µg/mL	2+ (300 colonias)	2+ (180 colonias)	90%

Tabla 16. Cálculo e interpretación de resultados del crecimiento bacteriano en las placas de agar conteniendo NPQ con un tamaño de 279.1 nm.

Nanopartícula	Concentración	Crecimiento en		
		10^{-2}	10^{-4}	% Resistente
Control	-	3+ (500 colonias)	Contaminado	-
NPQ3	100 µg/mL	2+ (250 colonias)	Contaminado	50%
	200 µg/mL	2+ (250 colonias)	Contaminado	50%
	300 µg/mL	2+ (300 colonias)	Contaminado	60%

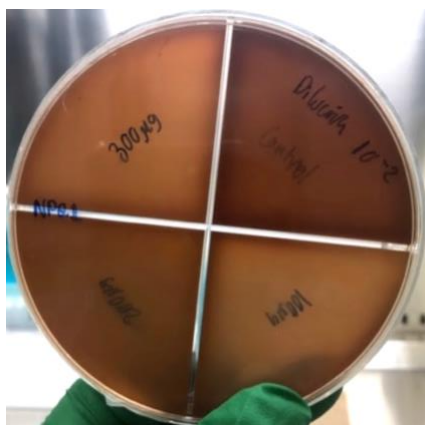
Tabla 17. Cálculo e interpretación de resultados del crecimiento bacteriano en las placas de agar conteniendo NPQ con un tamaño de 364.4 nm.

Nanopartícula	Concentración	Crecimiento en		
		10^{-2}	10^{-4}	% Resistente
Control	-	200	50	-
NPQ4	200 µg/mL	3+	10	20%
	300 µg/mL	2+ (150 colonias)	0 *contaminación	0
	400 µg/mL	0	0 *contaminación	0

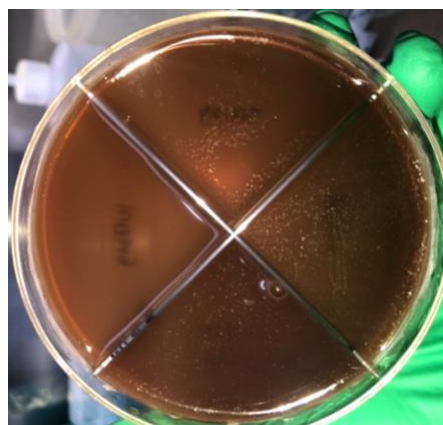
En base a los datos y cálculos obtenidos se determinó susceptible a NPQ1 con un tamaño de partícula de 116.6 nm a la concentración más alta probada para ésta que fue de 300 µg/mL, y susceptible a NPQ5 con un tamaño de 364.4 nm a una concentración de 400 µg/mL.

Las nanopartículas restantes no lograron inhibir completamente el crecimiento, sin embargo, obtuvieron porcentajes de resistencia de entre 16-95%, presentando el porcentaje mayor de resistencia para NPQ2 (con el 95% en la concentración menor y 90% en la mayor) y el menor para NPQ1 en su concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ con un 16%.

A) Primera semana de incubación

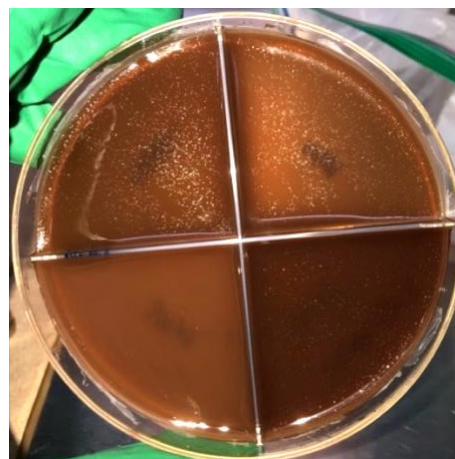
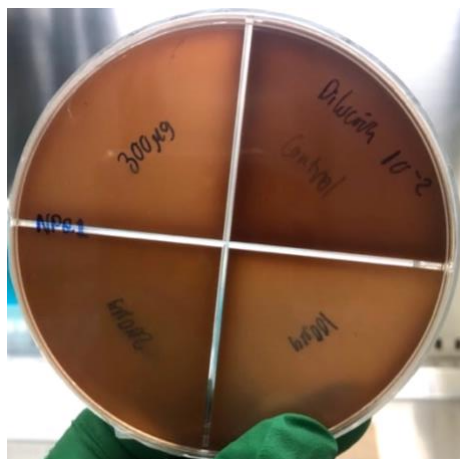


1)



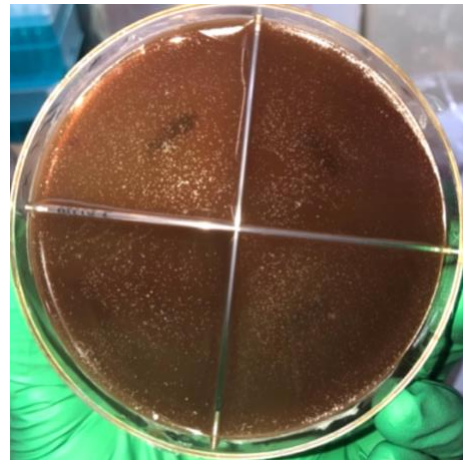
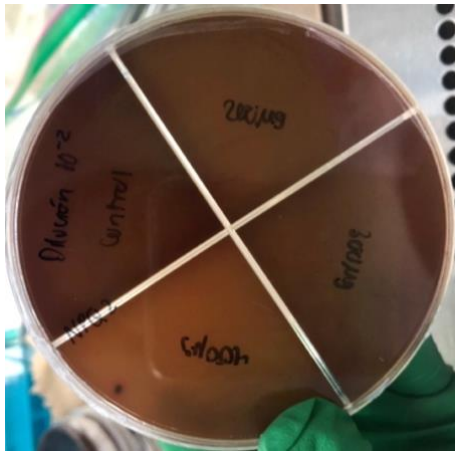
2)

B) Segunda semana de incubación



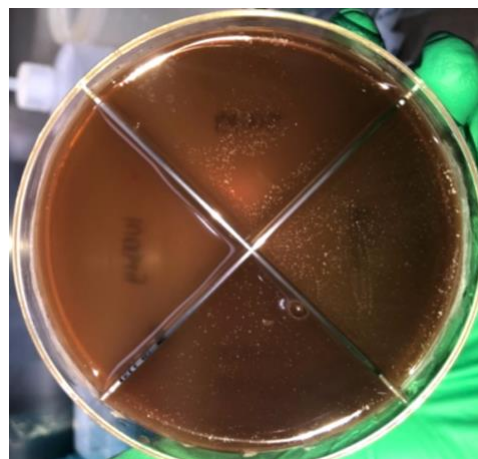
1)

2)



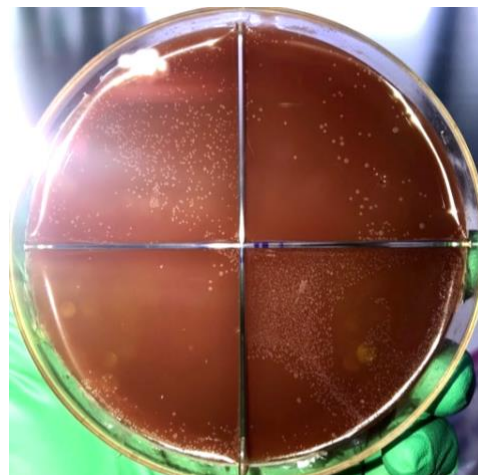
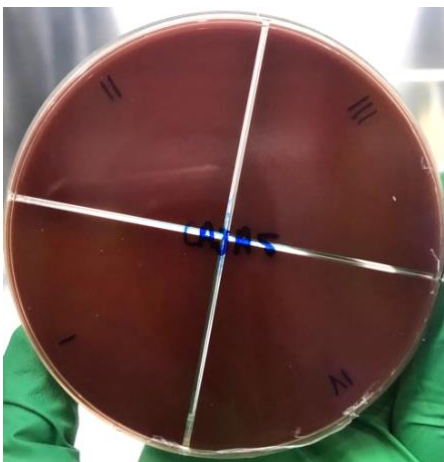
3)

4)



5)

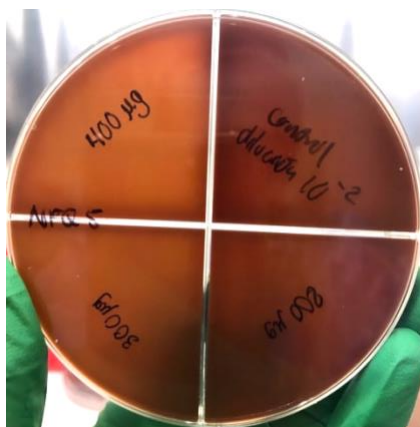
6)



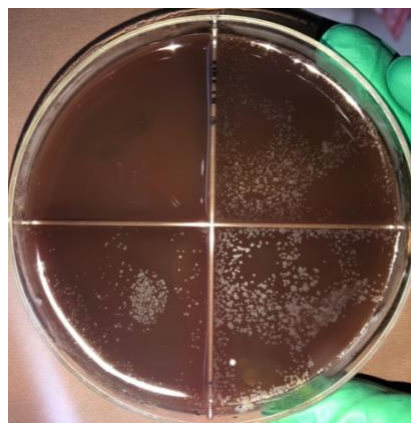
7)

8)

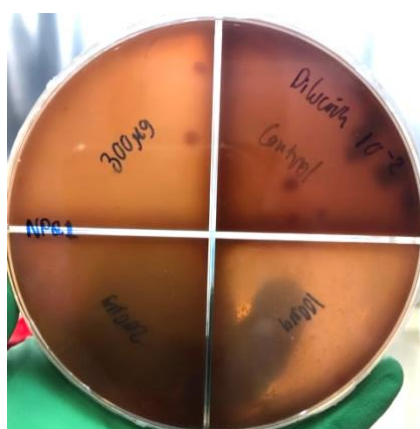
C) Tercera semana de incubación



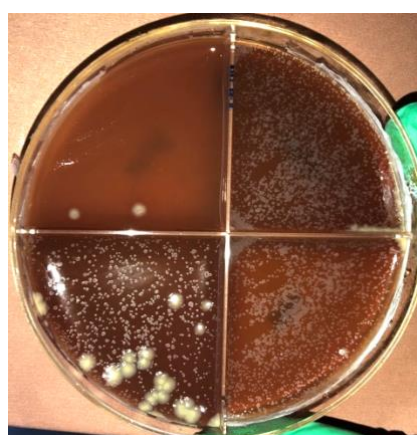
1)



2)



3)



4)

Figura 14. Prueba de susceptibilidad de las nanopartículas por el método de las proporciones en agar sangre 5% frente a cepa clínica de *Mycobacterium tuberculosis*.

En la figura 11 A-2 se muestra el crecimiento de Mtb en un periodo de 8 días, presentando crecimiento sobre el cuadrante control y los cuadrantes de las concentraciones menores de NPQ1, observándose una clara inhibición del crecimiento bacteriano a la concentración mayor (300 µg/mL). En la segunda semana de incubación la placa

correspondiente a NPQ1 (figura 11 B-2) aumentó el crecimiento de la micobacteria en los cuadrantes señalados y la inhibición en el cuadrante de mayor concentración persistió. El resultado de inhibición del crecimiento fue consistente hasta la tercera semana, sin embargo, comenzaron a crecer contaminaciones, de bacterias identificadas como gram negativas, sobre las colonias de Mtb (figura 11 C-4).

En la segunda semana para la placa NPQ2 se detectó un crecimiento casi confluyente sobre el cuadrante de control de crecimiento (figura 11 B-4) y sobre los cuadrantes contenientes de nanopartículas, aunque el crecimiento sobre estos fue ligeramente menor. El resultado fue consistente hasta la tercera semana.

En el caso de NPQ5, a la segunda semana se observó el desarrollo de colonias sobre el cuadrante control y las concentraciones mas bajas (200 y 300 $\mu\text{g/mL}$) mientras que en el cuadrante con la concentración mas alta (de 400 $\mu\text{g/mL}$) permaneció libre de crecimiento (figura 11 B-6). El resultado fue consistente hasta la tercera semana (figura 11 C-2).

Se sembraron las cuatro diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , y 10^{-4}) en una placa de control de crecimiento como se observa en la figura 11 B-8 en caso de que las diluciones utilizadas en ensayo no desarrollaran colonias contables. El crecimiento de la micobacteria se dio con éxito sobre el agar sangre al 5% y se lograron contabilizar e identificar las colonias de Mtb de las contaminaciones.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Se generó con éxito la síntesis de las nanopartículas de quitosano por el método de gelificación ionotrópica con variaciones de tamaño y estabilidad coloidal. Se logró aumentar las concentraciones de las soluciones de nanopartículas de 0.1% hasta 0.3% empleando el mismo método de síntesis. La recuperación de las nanopartículas se logró mediante liofilización. La resuspensión de las mismas se logró utilizando ácido acético al 0.01% como disolvente manteniéndolas en agitación magnética constante por 48 horas y sometiénolas a sonicación, sin embargo, después de la resuspensión no se conservó el tamaño de partícula y el PDI aumentó. No obstante, la conservación de las nanopartículas en suspensión a pH ácido (de 4-5) en refrigeración (2-4°C) mantiene los tamaños de partícula y su polidispersidad.

Las pruebas antibacterianas de las nanopartículas de quitosano mediante difusión en disco no generaron inhibición debido a la baja capacidad de difusión de las mismas en el medio de agar desde el disco de papel, por lo tanto, la técnica de difusión en disco no es la adecuada para analizar la capacidad antimicrobiana de sistemas nanoestructurados. Por otro lado, mediante el método de microdilución se logró determinar la CMI y CMB de las nanopartículas de distintos tamaños frente a *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans*, presentando mayor actividad las nanopartículas de mayor tamaño (entre 200-280 nm). La capacidad antimicrobiana frente a *M. tuberculosis* se logró determinar con el método de las proporciones adecuado en Agar Sangre, encontrándose como susceptible ante las nanopartículas de quitosano con un tamaño de partícula de 116.6 nm a concentraciones de 300 µg/mL y en el tamaño de 364.4 nm a 400 µg/mL.

También se encontró que el extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) genera halos de inhibición mediante el método de difusión en disco contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y especialmente sobre *C. albicans*. Sin embargo, el extracto acuoso se presentó inestable por sí solo, por lo que podrían mejorarse sus propiedades cargando el material en las nanopartículas de quitosano para ejercer funciones como un sistema de liberación del extracto y conservación de sus propiedades antimicrobianas. También, el método de liofilización del producto natural fresco resultó efectivo para mejorar su conservación y estabilidad sin perder actividad antimicrobiana con el paso del tiempo, de esta manera se facilita el manejo del producto y su conservación para usos posteriores.

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS

1. Adhikari, H. S. and Yadav, P. N. (2018) ‘Anticancer Activity of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Their Mechanism of Action’, *International Journal of Biomaterials*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2018/2952085.
2. Al-Tayyar, N. A., Youssef, A. M. and Al-hindi, R. (2020) ‘Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, p. 125915. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125915.
3. Alcaide, F. *et al.* (2017) ‘Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma, pp. 529–535. doi: 10.1016/j.eimc.2016.04.008.
4. Ali, A. and Ahmed, S. (2018) ‘A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery’, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., pp. 273–286. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078.
5. Álvarez, N. *et al.* (2009) *Mecanismos de evasión y persistencia de Mycobacterium tuberculosis durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente*, *Vaccimonitor [Internet]*. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2009000300004 (Accessed: 10 April 2020).
6. Antonia Isabel Castillo Rodal (2018) *Tuberculosis, enfermedad infecciosa más letal en el mundo*, *Boletín UNAM*. Available at: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_187bis.html (Accessed: 23 May 2020).
7. Bahuguna, A. and Rawat, D. S. (2020) ‘An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets’, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc., pp. 263–292. doi: 10.1002/med.21602.
8. Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S. K. (2016) ‘Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review’, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an

- Jiaotong University, pp. 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
9. Belanger, A. E. *et al.* (1996) ‘The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(21), pp. 11919–11924. doi: 10.1073/pnas.93.21.11919.
 10. Berat, P. *et al.* (2013) *Determination of viscosity-average molecular weight of chitosan using intrinsic viscosity measuremen.*
 11. Boletín Epidemiológico (2018) *Vigilancia Epidemiológica Semana 52*. Available at: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-> (Accessed: 6 August 2021).
 12. Caro-León, F. J. *et al.* (2019) ‘Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión’, *Biotecnia*. Universidad de Sonora, 21(3), pp. 13–25. doi: 10.18633/biotecnia.v21i3.1007.
 13. Carvalho, P. M. *et al.* (2018) ‘Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development’, *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A., p. 237. doi: 10.3389/fchem.2018.00237.
 14. Cheung, R. C. F. *et al.* (2015) ‘Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications’, *Marine Drugs*. MDPI AG, pp. 5156–5186. doi: 10.3390/md13085156.
 15. CLSI *et al.* (2011) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*. 2nd ed. Available at: https://europepmc.org/article/NBK/nbk544374#_sec_4_ (Accessed: 1 July 2021).
 16. CLSI (2015) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition, Clsi.*
 17. CLSI (2020) *M100 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition*. Available at: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (Accessed: 18 August 2021).
 18. Coll, P. (2009) ‘Active drugs against *Mycobacterium tuberculosis*’, *Enfermedades*

- Infeciosas y Microbiología Clínica*. Ediciones Doyma, S.L., 27(8), pp. 474–480. doi: 10.1016/j.eimc.2009.06.010.
19. Comisión de salud (2019) *Comisión de salud*. Available at: www.ccnaprecc.salld.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdr/ (Accessed: 25 November 2019).
 20. Diario Oficial de la Federación (2013) *NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis*. Available at: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5321934 (Accessed: 17 March 2021).
 21. Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U. (2012) ‘A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery’, *Metabolites*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2(2), p. 303. doi: 10.3390/METABO2020303.
 22. Dilia Fontalvo Rivera and Doris Gómez Camargo (2015) *Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar*. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192015000100004 (Accessed: 19 June 2021).
 23. Dounighi, M. N. *et al.* (2012) ‘Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases’, *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, 18(1), pp. 44–52.
 24. Du, W. L. *et al.* (2009) ‘Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 75(3), pp. 385–389. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.07.039.
 25. Ekor, M. (2013) ‘The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety’, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA, 4. doi: 10.3389/FPHAR.2013.00177.
 26. Escárcega-Galaz, A. A. *et al.* (2018) ‘Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings’, *International Journal of Biological*

- Macromolecules*. Elsevier B.V., 116, pp. 472–481. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149.
27. Garg, T., Rath, G. and Goyal, A. K. (2015) ‘Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis’, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd., 44(3), pp. 1–5. doi: 10.3109/21691401.2015.1008508.
 28. Garg, U. *et al.* (2019) ‘Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting’, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences, 9(2), p. 195. doi: 10.15171/APB.2019.023.
 29. Giovannini, D. *et al.* (2012) ‘A new Mycobacterium tuberculosis smooth colony reduces growth inside human macrophages and represses PDIM Operon gene expression. Does an heterogeneous population exist in intracellular mycobacteria?’, *Microbial Pathogenesis*. Academic Press, 53(3–4), pp. 135–146. doi: 10.1016/j.micpath.2012.06.002.
 30. Gómez-Tangarife, V. J. *et al.* (2018) ‘Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: contribution of constituent and acquired mechanisms Revisión / Review’, *Rev. Salud Pública*, 20(4), pp. 491–497. doi: 10.15446/rsap.V20n4.50575.
 31. Huang, Y. and Lapitsky, Y. (2011) ‘Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels’, *Langmuir*, 27(17), pp. 10392–10399. doi: 10.1021/la201194a.
 32. Huang, Y. and Lapitsky, Y. (2012) ‘Salt-assisted mechanistic analysis of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogel formation’, *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 13(11), pp. 3868–3876. doi: 10.1021/bm3014236.
 33. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (2019) *Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Tuberculosis*, InDRE-Secretaría de Salud. Available at: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/558697/Lineamientos_Tuberculosis_190219.pdf (Accessed: 12 August 2021).

34. Islam, N., Dmour, I. and Taha, M. O. (2019) 'Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery', *Heliyon*. Elsevier Ltd, p. e01684. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01684.
35. Johnson, P. D. R. (2017) 'Streptomycin', in *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*. CRC Press, pp. 2471–2487. doi: 10.1201/9781315152110.
36. Ke, C.-L. *et al.* (2021) 'Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan', *Polymers 2021, Vol. 13, Page 904*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 13(6), p. 904. doi: 10.3390/POLYM13060904.
37. Khare, S., Williams, K. and Gokulan, K. (2014) 'Nanotechnology', in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 893–900. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00406-7.
38. Klein, K. and Yang, Z. (2014) 'Comparison of ambient air survival of Mycobacterium tuberculosis clinical strains associated with different epidemiological phenotypes', *International Journal of Mycobacteriology*. Elsevier Ltd, 3(3), pp. 211–213. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.04.002.
39. Kong, M. *et al.* (2010) 'Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 144(1), pp. 51–63. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.09.012.
40. Kourmouli, A. *et al.* (2018) 'Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles?', *Journal of Nanoparticle Research*. Springer Netherlands, 20(3). doi: 10.1007/s11051-018-4152-3.
41. Kumirska, J. *et al.* (2011) 'Biomedical activity of chitin/chitosan based materials-influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-Acetylation', *Polymers*. Molecular Diversity Preservation International, pp. 1875–1901. doi: 10.3390/polym3041875.
42. Lo, W.-H. *et al.* (2020) 'Synergistic Antifungal Activity of Chitosan with Fluconazole against Candida albicans, Candida tropicalis, and Fluconazole-Resistant Strains', *Molecules 2020, Vol. 25, Page 5114*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 25(21), p. 5114. doi: 10.3390/MOLECULES25215114.

43. López-Cerero, L., Esteban-Moreno, J. and González-Martín, J. (2007) *Recomendaciones sobre bioseguridad en el laboratorio de micobacterias y revisión de la normativa, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Available at: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-recomendaciones-sobre-bioseguridad-el-laboratorio-13111838> (Accessed: 11 August 2021).
44. Lopez-Moya, F., Suarez-Fernandez, M. and Lopez-Llorca, L. V. (2019) ‘Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants’, *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 332. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(2), p. 332. doi: 10.3390/IJMS20020332.
45. Louis, S. (2018) ‘Gold Biotechnology Protocol GoldBio Disk Diffusion Assay Protocol’. doi: 10.3109/00365516009065406.
46. Mainbourg, E. M. T., Belchior, A. D. S. and Goncalves, M. J. F. (2017) ‘Loss to follow-up in tuberculosis treatment and its relationship with patients’ knowledge of the disease and other associated factors’, *Revista de Salud Pública*. Universidad Nacional de Colombia, 18(5), p. 714. doi: 10.15446/rsap.v18n5.54842.
47. Malvern Panalytical (2021) *An Introduction to Dynamic Light Scattering (DLS) | Malvern Panalytical*. Available at: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction> (Accessed: 27 June 2021).
48. Manousi, N., Sarakatsianos, I. and Samanidou, V. (2019) ‘Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants’, *Engineering Tools in the Beverage Industry*. Elsevier, pp. 283–314. doi: 10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X.
49. Mathys, V. *et al.* (2009) ‘Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 53(5), pp. 2100–2109. doi: 10.1128/AAC.01197-08.
50. Matica, A., Menghiu, G. and Ostafe, V. (2017) ‘BIODEGRADABILITY OF CHITOSAN BASED PRODUCTS’, *Former: Ann. West Univ. Timisoara-Series*

Chem, 26(1), pp. 75–86.

51. De Matteis, L. *et al.* (2018) ‘New active formulations against M. tuberculosis: Bedaquiline encapsulation in lipid nanoparticles and chitosan nanocapsules’, *Chemical Engineering Journal*. Elsevier, 340, pp. 181–191. doi: 10.1016/J.CEJ.2017.12.110.
52. Mayoral, J. B., Moreno, A. C. and San Martín-Martínez, E. (2014) ‘Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas I. INTRODUCCIÓN’, *Am. J. Phys. Educ*, 8(4). Available at: <http://www.lajpe.org> (Accessed: 27 June 2021).
53. Minh, N. C., Van Hoa, N. and Trung, T. S. (2020) ‘Preparation, properties, and application of low-molecular-weight chitosan’, in *Handbook of Chitin and Chitosan*. Elsevier, pp. 453–471. doi: 10.1016/b978-0-12-817970-3.00015-8.
54. Miotto, P. *et al.* (2018) ‘Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis’, *Respirology*. Blackwell Publishing, pp. 1098–1113. doi: 10.1111/resp.13393.
55. Mohammed, M. A. *et al.* (2017) ‘An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery’, *Pharmaceutics*. MDPI AG. doi: 10.3390/pharmaceutics9040053.
56. Mota, I. E., Carlos, J. and Ledezma, R. (2019) ‘Tuberculosis pulmonar, un riesgo latente para los trabajadores de la salud como problema de Salud Pública’, *JONNPR*, 4(2), pp. 197–209. doi: 10.19230/jonnpr.2833.
57. Mujica Álvarez, J., Matiacevich, S. and Bustos, R. (2019) ‘Estudios de las condiciones óptimas para maximizar estabilidad física y oxidativa de un ingrediente vitamínico nanoencapsulado’, *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. Universidad Nacional Autónoma de México, 12(23), p. 1. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2019.23.67653.
58. Muñoz-Bonilla, A. *et al.* (2019) ‘Bio-based polymers with antimicrobial properties towards sustainable development’, *Materials*. MDPI AG. doi: 10.3390/ma12040641.
59. Nair, S. S. *et al.* (2017) ‘Allium sativum constituents exhibit anti-tubercular activity In vitro and in RAW 264.7 mouse macrophage cells infected with Mycobacterium tuberculosis H37Rv’, *Pharmacognosy Magazine*. Medknow Publications, 13(50), pp.

S209–S215. doi: 10.4103/pm.pm_435_16.

60. NCCLS (2002) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Second Edition*. NCCLS document M27-A2. second. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
61. Nellist, P. D. (2019) ‘Scanning transmission electron microscopy’, in *Springer Handbooks*. Springer, pp. 49–99. doi: 10.1007/978-3-030-00069-1_2.
62. Ohya, Y. *et al.* (1994) ‘Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity’, *Journal of Macromolecular Science, Part A*. Taylor & Francis Group , 31(5), pp. 629–642. doi: 10.1080/10601329409349743.
63. OMS (2020) *Tuberculosis*. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (Accessed: 7 August 2021).
64. OPS | OMS (2008) *Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 1 - Baciloscopia*.
65. OPS | OMS (2018) *Tuberculosis en las Américas 2018*.
66. OPS and OMS (2008) *Guía Técnica para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 - Cultivo*.
67. OPS and OMS (2017) *Guía Técnica para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 3 - Pruebas de Sensibilidad*. Available at: <http://www.orasconhu.org> (Accessed: 23 March 2021).
68. Otto, D. P. and de Villiers, M. M. (2009) ‘Physicochemical Principles of Nanosized Drug Delivery Systems’, in *Nanotechnology in Drug Delivery*. Springer New York, pp. 3–33. doi: 10.1007/978-0-387-77668-2_1.
69. Palma-Guerrero, J. *et al.* (2010) ‘Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan’, *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 75(4), pp. 1021–1032. doi: 10.1111/J.1365-2958.2009.07039.X.
70. de Paz, L. E. C. *et al.* (2011) ‘Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms’, *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 77(11), pp. 3892–3895. doi:

10.1128/AEM.02941-10.

71. Perinelli, D. R. *et al.* (2018) 'Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V., pp. 8–20. doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.046.
72. Phadatare, A. G., Viswanathan, V. and Mukne, A. (2014) 'Novel strategies for optimized delivery of select components of *Allium sativum*', *Pharmacognosy Research*. Medknow Publications, 6(4), pp. 334–340. doi: 10.4103/0974-8490.138288.
73. Prasetyoputri, A. *et al.* (2018) 'The Eagle Effect and Antibiotic-Induced Persistence: Two Sides of the Same Coin?', *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2018.10.007.
74. Raafat, D. *et al.* (2008) 'Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), pp. 3764–3773. doi: 10.1128/AEM.00453-08.
75. Ricra Méndez, W. I. (2018) *Nanopartículas metálicas*.
76. Rinaudo, M. (2006) 'Chitin and chitosan: Properties and applications', *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Pergamon, pp. 603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
77. Rodríguez-García, C. M. and Peraza-Echeverría, L. (2019) 'Preparation of aqueous extracts of plants', *PLOS ONE*. doi: 10.17504/PROTOCOLS.IO.SZWEF7E.
78. Rodríguez-Pedroso, A. *et al.* (2009) *Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos*, *Revista Chapingo Serie Horticultura*.
79. Russell, D. G., Barry, C. E. and Flynn, J. L. (2010) 'Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us', *Science*. NIH Public Access, pp. 852–856. doi: 10.1126/science.1184784.
80. Sánchez-Machado, D. I. *et al.* (2018) 'Chitosan', in *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier, pp. 485–493. doi: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00064-3.
81. Sandoval, R. *et al.* (2020) 'Cross-resistance between isoniazid and ethionamide and

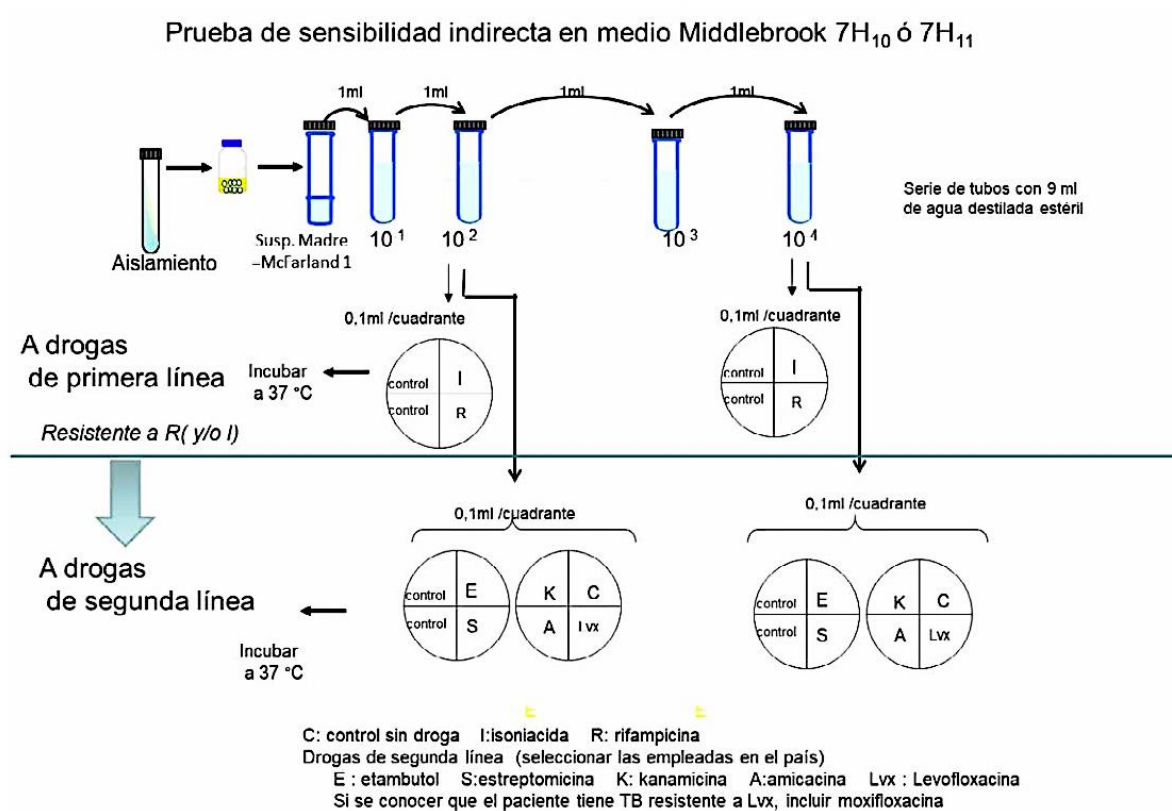
- its strong association with mutation C-15T in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru', *Revista Argentina de Microbiologia*. Asociacion Argentina de Microbiologia, 52(1), pp. 36–42. doi: 10.1016/j.ram.2019.03.005.
82. Sawtarie, N., Cai, Y. and Lapitsky, Y. (2017a) 'Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 157, pp. 110–117. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2017.05.055.
 83. Sawtarie, N., Cai, Y. and Lapitsky, Y. (2017b) 'Preparation of Chitosan / Tripolyphosphate Nanoparticles with Highly-Tunable Size and Low Polydispersity', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.055.
 84. Scolari, I. R. *et al.* (2019) 'Promising Chitosan-Coated Alginate-Tween 80 Nanoparticles as Rifampicin Coadministered Ascorbic Acid Delivery Carrier Against *Mycobacterium tuberculosis*', *AAPS PharmSciTech*. Springer New York LLC, 20(2). doi: 10.1208/s12249-018-1278-7.
 85. Secretaría de Salud - Dirección General de Epidemiología (2019) *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Micobacteriosis (Tuberculosis y Lepra)*. México.
 86. Shukla, S. K. *et al.* (2013) 'Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review', *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 46–58. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043.
 87. Silva Carlos *et al.* (2007) *Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis*. Available at: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642007000100004 (Accessed: 20 June 2021).
 88. Sudarshan, N. R., Hoover, D. G. and Knorr, D. (1992) 'Antibacterial Action of Chitosan', *Food Biotechnology*. Taylor & Francis Group, 6(3), pp. 257–272. doi: 10.1080/08905439209549838.
 89. Tenover, F. C. (2019) 'Antimicrobial susceptibility testing', in *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, pp. 166–175. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02486-7.

90. Thakur, A. and Taranjit (2011) 'Preparation of chitosan nanoparticles: A study of influencing factors', in *AIP Conference Proceedings*, pp. 299–300. doi: 10.1063/1.3653728.
91. Thomford, N. E. *et al.* (2018) 'Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, p. 1578. doi: 10.3390/ijms19061578.
92. Turnidge, J. D. (2015) 'Susceptibility Test Methods: General Considerations', in *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, pp. 1246–1252. doi: 10.1128/9781555817381.ch70.
93. Urrejola, M. C. *et al.* (2018) *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) Polymeric Nanoparticle Systems: Structure, Elaboration Methods, Characteristics, Properties, Biofunctionalization and Self-assembly Layer by Layer Technologies, Int. J. Morphol.*
94. Valgas, C. *et al.* (2007) 'Screening methods to determine antibacterial activity of natural products', *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 38(2), pp. 369–380. doi: 10.1590/S1517-83822007000200034.
95. Vilchèze, C. and Jacobs JR., W. R. (2014) 'Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities', *Microbiology Spectrum*. American Society for Microbiology, 2(4), p. MGM2. doi: 10.1128/microbiolspec.mgm2-0014-2013.
96. Wang, X., Du, Y. and Liu, H. (2004) 'Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 56(1), pp. 21–26. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.11.007.
97. Wardani, G., Mahmiah and Sudjarwo, S. A. (2018) 'In vitro antibacterial activity of chitosan nanoparticles against mycobacterium tuberculosis', *Pharmacognosy Journal*. EManuscript Technologies, 10(1), pp. 162–166. doi: 10.5530/pj.2018.1.27.
98. Wei, D. *et al.* (2009) 'The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity', *Carbohydrate Research*. Elsevier, 344(17), pp. 2375–2382.

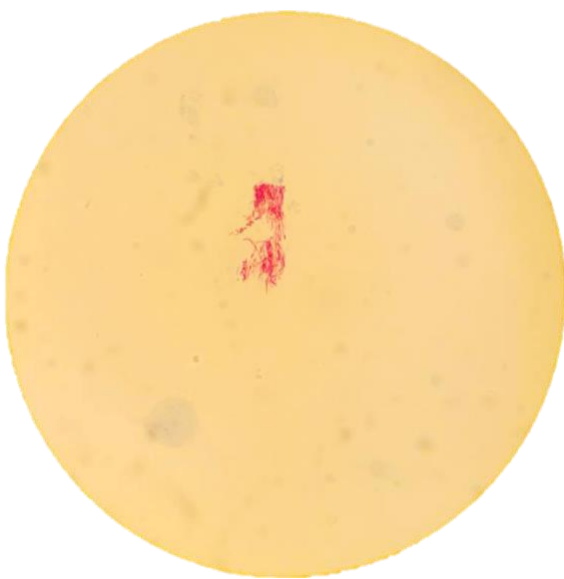
- doi: 10.1016/j.carres.2009.09.001.
99. WHO (2018) *Global tuberculosis Report 2019, Greening Chinese Business: Barriers, Trends and Opportunities for Environmental Management*. doi: 10.9774/gleaf.978-1-909493-35-3_2.
100. Woodman, M., Haeusler, I. L. and Grandjean, L. (2019) 'Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective', *Genes*. MDPI AG. doi: 10.3390/genes10010053.
101. Woods, G. L. *et al.* (2011) *2nd edition. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011 Mar. Report No.: M24-A2*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/> (Accessed: 27 June 2021).
102. Yanat, M. and Schroën, K. (2021) 'Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging', *Reactive and Functional Polymers*. Elsevier B.V., 161, p. 104849. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104849.
103. Yew, W. W., Lange, C. and Leung, C. C. (2011) 'Treatment of tuberculosis: Update 2010', *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society, pp. 441–462. doi: 10.1183/09031936.00033010.
104. Yu, F. L. *et al.* (2016) 'Evaluation of a modified direct agar proportion method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis from MGIT samples', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Elsevier Ltd, 49(1), pp. 60–65. doi: 10.1016/j.jmii.2014.01.003.
105. Yuan, T. and Sampson, N. S. (2018) 'Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, pp. 1887–1916. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00602.
106. Zaki, E. R. *et al.* (2021) 'Chitosan nanoparticles biosynthesis and characterization for Inhalation as an operative treatment of tuberculosis', *IP International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases*. IP Innovative Publication Pvt. Ltd., 6(4), pp. 198–202. doi: 10.18231/J.IJMMTD.2020.045.
107. Zargar, V., Asghari, M. and Dashti, A. (2015) 'A Review on Chitin and

- Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications’, *ChemBioEng Reviews*. Wiley, 2(3), pp. 204–226. doi: 10.1002/cben.201400025.
108. Zhang, J. *et al.* (2010) ‘Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications’, *Marine Drugs*. MDPI AG, pp. 1962–1987. doi: 10.3390/md8071962.
109. Zheng, J. *et al.* (2013) ‘Para-aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in mycobacterium tuberculosis’, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(32), pp. 23447–23456. doi: 10.1074/jbc.M113.475798.
110. Zimhony, O. *et al.* (2007) ‘Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2), pp. 752–754. doi: 10.1128/AAC.01369-06.

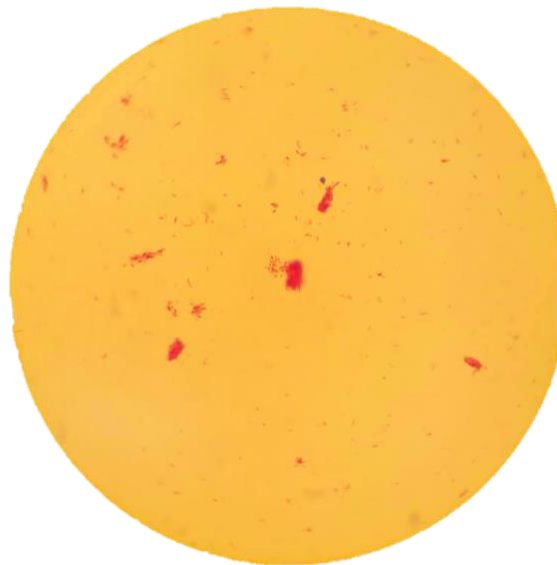
CAPÍTULO VII: APÉNDICES



Apéndice 1. Resumen gráfico de las pruebas de sensibilidad mediante el método de las proporciones para Mtb descrito en (OPS and OMS, 2017).



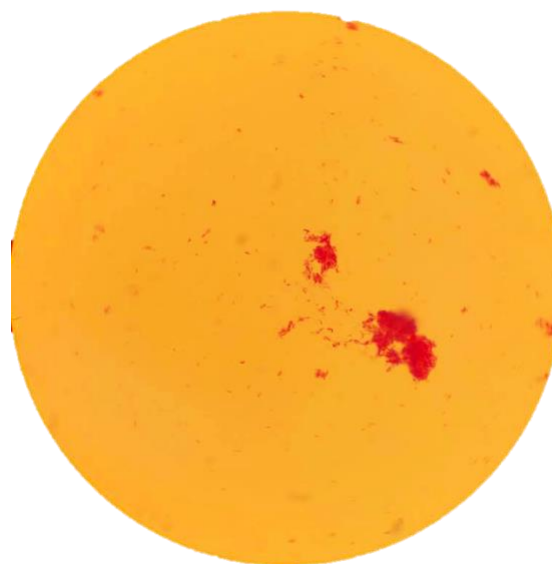
a)



b)



c)



d)

Apéndice 2. Identificación de BAAR mediante la tinción de Zihel-Neelsen en los controles de crecimiento de las pruebas de susceptibilidad, correspondiendo al control de crecimiento de las pruebas en NPQ1 (a), NPQ2 (b), NPQ3 (c) y NPQ4 (d).