



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGICAS**

**POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA
LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA:

QFB. GALVÁN ROMERO VANESSA SARAHÍ

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

AGOSTO, 2022

“El programa de **Maestría en Ciencias Farmacobiológicas** de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382 en el Nivel Maestría En desarrollo.

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Laboratorio Salud Total de la Facultad de Medicina-CIACYT de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Proyecto FOSEC SEP-Investigación Básica 2017-2018 con número A1-S-28176: Síntesis y evaluación de polímeros de impresión molecular para la determinación analítica de contaminantes emergentes en matrices ambientales.

Beca-Tesis del CONACYT. Número de registro: 784021

No. CVU: 1078903



Polímeros de impresión molecular para la liberación de antibióticos por Galván Romero Vanessa Sarahí se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

REPORTE DE SIMILITUD

Se realizó el análisis de similitud mediante la plataforma de Turnitin (<https://www.turnitin.com/es>)

POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA
LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

ÍNDICE DE SIMILITUD

INTEGRANTES DEL JURADO:

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP
Presidenta

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana
Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología
(CIACYT), UASLP
Secretaria

Dr Rogelio Flores Ramírez
CIACYT-Medicina, UASLP
Vocal

RESUMEN

Se sintetizaron polímeros impresos molecularmente (MIP) utilizando ciprofloxacino con tres enfoques de polimerización. Se probaron dos monómeros funcionales, ácido láctico y ácido metacrílico y se sintetizaron polímeros sin plantilla (NIP). Se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, infrarrojo por transformada de Fourier. La isoterma de adsorción se determinó que existe mayor capacidad de adsorción del MIP con ácido metacrílico con el método de coprecipitación. Se obtuvo que los MIPs siguieron el modelo Korsmeyer-Peppas. Los MIPs se utilizaron para determinar la concentración mínima inhibitoria la cual se encontró de 0.031 a 0.016 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* y de 0.004 a 0.031 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *Escherichia coli*. Finalmente, se evaluó la citotoxicidad en fibroblastos dérmicos, presentaron viabilidades superiores al 100%.

Palabras clave: Polímeros de impresión molecular, liberación de fármacos, concentración mínima inhibitoria, citotoxicidad.

ABSTRACT

Molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized using ciprofloxacin with three polymerization approaches. Two functional monomers, lactic acid and methacrylic acid, were tested and template-free polymers (NIP) were synthesized. They were characterized by Fourier transform infrared scanning electron microscopy. The adsorption isotherm was determined that there is a higher adsorption capacity of MIP with methacrylic acid with the coprecipitation method. It was obtained that the MIPs followed the model of Korsmeyer-Peppas. The MIPs were used to determine the minimum inhibitory concentration which was found to be from 0.031 to 0.016 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *Staphylococcus aureus* and from 0.004 to 0.031 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *Escherichia coli*. Finally, the cytotoxicity in dermal fibroblasts was evaluated, they presented viabilities greater than 100%.

Keywords: Imprinted polymers, drug release, minimum inhibitory concentration, cytotoxicity.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. ENFERMEDADES CRÓNICAS.....	5
2.1.1. DIABETES MELLITUS	5
2.1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	5
2.1.2.1. FISIOPATOLOGÍA DE DM2	6
2.1.2.2. PIE DIABÉTICO	6
2.1.2.3. FISIOPATOLOGÍA.....	7
2.1.2.4. MANEJO DE LA HERIDA DE PIE DIABÉTICO	9
2.1.2.5. TRATAMIENTO.....	10
2.2. CIPROFLOXACINO	11
2.3. DISPOSITIVOS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS	12
2.4. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR	13
2.4.1. COMPONENTES DE LOS MIPS	14
2.4.1.1. MOLÉCULA MOLDE, PLANTILLA O ANALITO DE INTERÉS	14
2.4.1.2. MONÓMERO FUNCIONAL.....	14
2.4.1.3. ENTRECruzANTE.....	14
2.4.1.4. PORÓGENO O SOLVENTE	15
2.4.1.5. INICIADOR	15
2.5. MÉTODOS DE IMPRESIÓN MOLECULAR.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1. OBJETIVO GENERAL	17
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1. REACTIVOS	18
6.2. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS D ^{iv} IMPRESIÓN MOLECULAR	18
6.3. MÉTODO ANALÍTICO.....	19

6.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MIPS Y NIPS	20
6.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	20
6.4.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	20
6.4.3. ÁREA ESPECÍFICA Y DIÁMETRO DE PORO	20
6.4.4. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN	21
6.4.5. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN	22
6.4.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	23
6.4.7. CITOTOXICIDAD	23
6.4.8. IMPRESIÓN 3D	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS IMPRESOS Y NO IMPRESOS	25
7.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	26
7.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MIPS y NIPs POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	26
7.4. ÁREA ESPECÍFICA Y DIÁMETRO DE PORO	27
7.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	28
7.6. CINÉTICA DE LIBERACIÓN	28
7.7. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN	31
7.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	31
7.9. CITOTOXICIDAD	35
7.10. IMPRESIÓN 3D	36
8. CONCLUSIÓN	37
9. REFERENCIAS	38

1. INTRODUCCIÓN

El pie diabético (PD) es definido por la Organización Mundial de la Salud como la infección, ulceración y destrucción de tejidos profundos de la extremidad inferior, asociada con alteraciones neurológicas y diversos grados de enfermedad vascular periférica (Bulton et al., 2020; Pavón Núñez et al., 2016). Este padecimiento es una complicación importante de la diabetes mellitus, el cual afecta a más del 25% de las personas que viven con diabetes (Alavi et al., 2014), puede causar infecciones de tejidos blandos y huesos, generalmente debido al sitio de herida expuesta y asociada a inmunosupresión (Rogers et al., 2011).

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de PD se encuentra el daño inmunológico asociado a la diabetes mellitus, la disfunción de los nervios periféricos como la neuropatía diabética y complicaciones vasculares (Pavón Núñez et al., 2016). Aunado a esto, la infección bacteriana se presenta como un factor agravante del PD ya que retrasa la cicatrización y favorece las complicaciones. Estas infecciones suelen ser causadas por cocos aeróbicos Gram positivos, donde predomina *Staphylococcus aureus* (Boulton & Rayman, 2020) y bacterias cocos Gram positivas mixtas, enterobacterias, bacilos Gram negativos mixtos, como *Pseudomonas*, y anaerobios obligados (Hernández et al., 2011). En un estudio realizado a 100 pacientes en un hospital de tercer nivel en México, se encontró en los resultados de los cultivos de las infecciones en el 42% de las muestras fue ocasionado por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), el 36% fueron por *Escherichia coli* y el resto por otras bacterias (Cervantes-García & Salazar-Schettino, 2017).

El protocolo de tratamiento actual para el PD incluye antibióticos sistémicos, antisépticos, desbridamiento y vendaje para heridas, todos cruciales para su cuidado y cicatrización (CENETEC, 2020). El resultado de la terapia con antibióticos sistémicos depende de su concentración en el sitio local, pero su eficacia se puede ver afectada por las características fisiopatológicas del paciente como, la disminución de la perfusión, la pérdida del reflejo defensivo del dolor y el desarrollo de resistencia antimicrobiana y/o biopelículas. Se ha reportado que resolución de la infección después de la infección del PD con medicamentos sistémicos varía ampliamente, con valores entre 5.6 y el 77.8% (Markakis et al., 2018; Price et al., 2020). La absorción sistémica limitada de antibiótico local reduce el riesgo de toxicidad, evita reacciones adversas de los medicamentos comparado

en los antibióticos sistémicos y no están sujetos a un metabolismo de primer paso. Además, disminuye el riesgo de generar resistencia bacteriana. Para combatir esta problemática, el uso de dispositivos de administración local de fármacos se ha convertido en una atractiva forma de tratamiento debido a su capacidad para ejercer un control espacio-temporal sobre la disponibilidad de fármacos a nivel local en el sitio (Brudno & Mooney, 2015). Ya que, para curar las infecciones en heridas de PD se requiere alcanzar la concentración necesaria en el área afectada, convirtiendo a la aplicación local en una alternativa con múltiples ventajas.

Una propuesta actual sobre dispositivos de liberación de fármacos son los polímeros de impresión molecular (MIPs), materiales sintéticos similares a receptores con sitios de reconocimiento específicos para moléculas molde, que pueden ser empleados para la liberación de fármacos en heridas debido a su resistencia mecánica y biocompatibilidad (Belbruno, 2019; Lusina & Cegłowski, 2022). El reconocimiento selectivo de los MIPs se determina durante la preparación del polímero utilizando los monómeros apropiados para la molécula molde o plantilla, en un solvente (Lusina & Cegłowski, 2022). Los MIPs ofrecen ventajas como, biocompatibilidad, baja toxicidad y biodegradabilidad. Además, su bajo costo, facilidad de preparación y múltiples vías de administración lo convierten en dispositivo adecuado (He et al., 2021).

Por lo anterior, surge la necesidad de desarrollar alternativas para el tratamiento de las infecciones de pie diabético que permitan combatir a los agentes causales asegurando la cantidad necesaria de fármaco en el sitio de la lesión y, además, evitar la formación de resistencia bacteriana al mantener la concentración mínima inhibitoria y así facilitar la cicatrización de la herida. Por lo que, en este estudio se tiene como objeto sintetizar, caracterizar y evaluar polímeros de impresión molecular como dispositivos de administración de fármacos que permitan la liberación localizada de antibióticos. Para este propósito fue seleccionado el ciprofloxacino como antibiótico debido a su amplio uso en infecciones de heridas y su amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, monómeros como ácido láctico y ácido metacrílico, que han demostrado ser biocompatibles en aplicaciones biomédicas.

2. ANTECEDENTES

2.1. ENFERMEDADES CRÓNICAS

Las enfermedades crónicas (EC) o no transmisibles son afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta, dan como resultado consecuencias para la salud a largo plazo, creando una necesidad de tratamiento y cuidado. Las EC son las principales causas de mortalidad en el mundo produciendo el 71% de muertes, dentro de las cuales, se ha reportado que cada año mueren en todo el mundo 15 millones de personas de entre 30 y 69 años; más del 85% de estas muertes ocurren en países de ingresos bajos y medianos. Entre ellas destacan: las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, los infartos de miocardio o accidentes cerebrovasculares); el cáncer; las enfermedades respiratorias crónicas (por ejemplo, la neumopatía obstructiva crónica o el asma); y la diabetes mellitus. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes por EC (17,9 millones cada año), seguidas del cáncer (9,0 millones), las enfermedades respiratorias (3,9 millones) y la Diabetes Mellitus (1,6 millones) a nivel mundial (OPS/OMS, 2018). En el 2020, el 14 % del total de las defunciones ocurridas en México correspondieron a defunciones por diabetes mellitus (INEGI, 2021).

2.1.1. DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es una EC generada cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no la puede utilizar eficazmente, al no ser controlada correctamente se produce hiperglucemia que, con el tiempo, conduce a daños graves en los nervios y vasos sanguíneos. En esta enfermedad se distinguen tres manifestaciones principales: la diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 y diabetes gestacional. (Organización Mundial de la Salud, 2021).

2.1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), es producida por el uso ineficaz de la insulina por parte de las células del cuerpo, denominado efecto de “resistencia a la insulina”. Donde, la hormona no es eficaz, generando un aumento en su producción, ocasionando que con el tiempo las células beta del páncreas la produzcan inadecuadamente. Aún no se han dilucidado totalmente las causas de la DM2, pero existe relación con el sobrepeso, obesidad, edad madura, origen étnico y

antecedentes familiares originándose a partir de predisposición genética y desencadenantes ambientales.

En los últimos años la diabetes se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en México, con el segundo lugar de mortalidad, con un 15.4% (INEGI, 2016). En el 2018, ENSANUT reportó que la prevalencia de diabetes con diagnóstico previo fue de 10.3%, siendo mayor a la reportada en el 2012 (9.2%) (ENSANUT, 2020). La Federación Internacional de Diabetes estima que habrá 9 millones de personas con diabetes para el 2025.

2.1.2.1. FISIOPATOLOGÍA DE DM2

La progresión patológica de la DM2 se desarrolla a partir de tres defectos metabólicos: la resistencia periférica a la insulina, la alteración en la función de las células β y la hiperglicemia. En primer lugar, la resistencia periférica a la insulina se caracteriza por una disminución en la sensibilidad celular a esta hormona y a la necesidad creciente de cantidades de insulina para mediar la captación de glucosa, es decir, el aumento de la glucosa en sangre disminuye el número de receptores de insulina. La respuesta inicial de la resistencia a la insulina es un incremento de la producción de esta hormona por parte de las células β del páncreas, al persistir la hiperglicemia se seguirá estimulando de forma persistente al páncreas para que sostenga la secreción de insulina, provocando hiperinsulinemia crónica, consecuencia de la alteración de la función de las células β . A su vez, la resistencia a la insulina suprime el control de retroalimentación del glucagón, que es mediado por la glucosa, ocasionando la estimulación de glucogénesis hepática y la gluconeogénesis, perpetuando así la hiperglicemia.

Así mismo, al ser una enfermedad de progresión lenta con dificultad del diagnóstico desde sus inicios, es probable presentar complicaciones como, nefropatía diabética 20-30%, retinopatía o pie diabético (International Diabetes Federation, 2019).

2.1.2.2. PIE DIABÉTICO

El pie diabético (PD) es definido por la Organización Mundial de la Salud como la infección, ulceración y destrucción de tejidos profundos de la extremidad inferior, asociada con alteraciones neurológicas y diversos grados de enfermedad vascular periférica (Pavón Núñez et al., 2016). El PD es una de las complicaciones más

importantes de la diabetes, al tener como consecuencia la amputación de la extremidad inferior o parte de ella. A pesar de los métodos de prevención existentes la tasa actual de amputaciones relacionadas con la DM sigue siendo significativa (Wendling & Beadle, 2015), hasta el 25% de los pacientes con DM desarrollarán úlceras de PD (Alavi et al., 2014).

Según la Federación Internacional de Diabetes, México junto con Estados Unidos, Canadá y 21 países, y territorios del Caribe se estima que 357.1 millones de adultos, de entre 20 y 79 años, tienen diabetes, con una prevalencia regional de 13.3%. A nivel mundial, América del Norte tiene la mayor carga económica y sanitaria debido a los problemas del pie diabético. A pesar de esto, en México no hay datos disponibles de prevalencia o incidencia a nivel nacional sobre el PD (Zubair et al., 2021). Por otro lado, un estudio realizado a 205 pacientes en Tijuana, México, mostró que el 44% de los sujetos en estudio tenían un alto riesgo de desarrollar pie diabético (Márquez-Godínez et al., 2014).

2.1.2.3. FISIOPATOLOGÍA

Con respecto a los factores de riesgo para desarrollar PD podemos mencionar: los factores predisponentes, que sitúan el riesgo de presentar una lesión; los factores desencadenantes o precipitantes, que inician la lesión y; los factores agravantes, que retrasan la cicatrización y facilitan las complicaciones.

Dentro de los factores predisponentes, se encuentra la neuropatía diabética (NP) es considerada factor principal en casi el 90% de las úlceras de PD (Tesfaye et al., 2010). Un 50% de los casos puede ser asintomática, ocasionando que los pacientes no sean conscientes de la aparición de las úlceras (Kasznicki, 2014). La NP se trata de una disfunción en el sistema nervioso periférico que guarda relación directa con la hiperglucemia y su duración. A nivel sensitivo se producen síntomas como parestesias, entumecimiento y/o dolor, encargados de contribuir en la detección de la neuropatía. Los síntomas como hipoalgesia, hipoestesia y anestesia ocasionan la pérdida del reflejo defensivo del dolor necesario para evitar lesiones; a nivel motor se produce atrofia de los músculos pequeños y la ausencia del reflejo del tobillo, generando deformidades ortopédicas, lo que favorece la aparición de zonas susceptibles de lesiones por roce y exceso de presión durante

el apoyo (Bokan, 2010). Finalmente, a nivel autónomo hay una alteración del flujo sanguíneo en los vasos arteriovenosos cutáneos, lo cual disminuye la perfusión. También hay una pérdida de glándulas sudoríparas y sebáceas, produciendo anhidrosis favoreciendo la sequedad de la piel y, por ende, la aparición de fisuras (Low et al., 2004). De manera que, estas tres manifestaciones pueden contribuir a un aumento de la actividad osteoclástica y a un proceso inflamatorio provocando la aparición de osteoartropatía neuropática de Charcot, la cual afecta a los huesos, articulaciones y tejidos blandos del pie, lo que da lugar a destrucción ósea y deformidades, éstas últimas son propensas a la aparición de úlceras (Rogers et al., 2011). Otro factor predisponente, es la alteración en el sistema inmune, con especial atención en las células que modulan la inmunidad innata. Esta respuesta consta de citocinas vasoactivas y proinflamatorias locales, el sistema del complemento, células polimorfonucleares y monocitos; estos dos últimos, en personas con diabetes, tienen deficiencias en la quimiotaxis, la adherencia, fagocitosis y la destrucción celular (Perner et al., 2003).

Con el riesgo desarrollado por los factores predisponentes, actúan los de tipo desencadenantes para iniciar una lesión, el más frecuente de ellos es el traumatismo mecánico, que se encuentra presente de forma mantenida, provocando la rotura de la piel y la úlcera, este trauma se produce a causa del uso de calzado mal ajustado.

En adición a los factores antes mencionados, se encuentra los factores agravantes, que determinan el desarrollo de la úlcera de PD y juegan un papel relevante en su mantenimiento. Uno de ellos es la infección de PD, la cual se define clínicamente cuando afecta a tejido o hueso situado por debajo de los maléolos (Lipsky et al., 2012). Al asociarse a la isquemia, la infección establecerá el pronóstico evolutivo de la lesión. Las alteraciones metabólicas, incluida la hiperglucemia, en el sistema inmunológico junto con la pérdida de la barrera cutánea en la propia úlcera favorecerán la infección del pie, la cual puede extenderse y llegar a tejidos subyacentes, incluyendo al hueso, especialmente si algunos grados de enfermedad arterial periférica está presente.

La etiología del PD en infecciones leves suele ser causadas por cocos aeróbicos Gram positivos, donde predomina *Staphylococcus aureus* y, en menor grado,

estreptococos β -hemolíticos. Los estafilococos coagulasa negativos, con mayor frecuencia, se encuentran como colonizadores o contaminantes, pero pueden ser patógenos, especialmente cuando se encuentran en tejido o hueso. Las infecciones graves con heridas profundas suelen ser polimicrobianas con cocos Gram positivos mixtos, enterobacterias, bacilos gran negativos mixtos, como *Pseudomonas* y anaerobios obligados (Hernández et al., 2011). En un estudio realizado a 100 pacientes en un hospital de tercer nivel en México, se encontró en los resultados de los cultivos de las infecciones en el 42% de las muestras fue ocasionado por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), el 36% fueron por *Escherichia coli* y el resto por otras bacterias (Cervantes-García & Salazar-Schettino, 2017).

2.1.2.4. MANEJO DE LA HERIDA DE PIE DIABÉTICO

En cuanto a las medidas generales aplicadas en la herida del PD, la actualización de guía de práctica clínica del Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud 2020 (CENETEC), establece que el abordaje integral para el manejo de heridas en PD incluye el diagnóstico etiológico de la lesión con exploración neurológica, vascular y biomecánica, para definir la causa de la lesión y proporcionar atención desde la prevención de los factores de riesgo, con un plan de cuidado integral para pacientes y cuidadores. La presencia de neuropatía periférica, isquemia de las extremidades y/o las alteraciones inmunológicas pueden reducir la evidencia clínica de la inflamación, por lo que se ha sugerido que la presencia de secreción purulenta o no purulenta, el olor fétido, necrosis, debilitamiento de los bordes de la herida y falta de cicatrización, pueden apoyar al diagnóstico de la infección.

En el caso del plan de tratamiento local, se incluye la corrección de las causas de la lesión y el abordaje local de la herida, tomando en cuenta las características de la lesión (tamaño, profundidad, tejidos afectados, bordes, lecho, tipo y cantidad del exudado, inflamación, infección o signos de biopelículas) para así conocer el alcance del daño tisular. Por otro lado, la limpieza de la herida incluye la piel perilesional, tratada con solución fisiológica, agua destilada o potable a 37°C ejerciendo presión de lavado para el arrastre de detritus, bacterias y material de curación sin lesionar el tejido sano. En adición, pueden ser utilizados antisépticos en caso de datos clínicos o microbiológicos de colonización crítica, infección o

desbridamiento cortante parcial o total. En caso de que se sospeche que está ocurriendo una infección o cuando la cicatrización se haya interrumpido, se deberá considerar el uso de terapia antimicrobiana. El estancamiento de la evolución de la herida puede deberse a la presencia de biopelículas, para evitar su formación se requiere estrategias encaminadas al control de la carga bacteriana (CENETEC, 2020).

Para establecer el diagnóstico de infección se debe realizar un examen clínico y pruebas microbiológicas. Tras la evidencia de infección, se puede emplear apósitos antimicrobianos, si la herida no mejora, incluso empeora, se debe reevaluar y considerar deterioro por isquemia o un estado de inmunodeficiencia. Además, de elegirse otros antimicrobianos o antibióticos en función de los resultados de cultivo y de sensibilidad, en el caso de que la infección se agrave poniendo en riesgo la extremidad, se requiere la intervención quirúrgica. Por el contrario, si la herida mejora y la infección es erradicada, se debe suspender el tratamiento antimicrobiano y promover la cicatrización de la herida. (CENETEC, 2020).

2.1.2.5. TRATAMIENTO

En un inicio se realiza control del estado metabólico, lograr equilibrio hidroelectrolítico, control de hiperglucemia, hiperosmolaridad, acidosis y azoemia; además de las comorbilidades (Secretaría de Salud (SS), 2013). Además, en el tratamiento inicial de la infección del PD se utiliza una terapia empírica, previo a su elección se debe confirmar la presencia de una infección, es necesario considerar varios puntos básicos antes de la prescripción de antibióticos. Inicialmente, la infección del pie debe clasificarse clínicamente. Aquellos con infección severa, requieren antibioticoterapia parenteral de amplio espectro, hasta que los informes de cultivo sean disponibles. La terapia con antibióticos siempre debe cubrir aeróbicos cocos Gram positivos, especialmente *Staphylococcus aureus*, que es el patógeno más común y virulento en PD y, las enterobacterias son las cepas Gram negativas más comunes (Zubair et al., 2021). Las infecciones leves y sin tratamiento previo con antibióticos se debe utilizar un antibiótico con moderado espectro en contra de cocos aerobios grampositivos, como cefalexina, ceftriaxona, ampicilina-sulbactam, entre otros. Para infecciones moderadas en pacientes clínicamente estables que tienen gran riesgo para la extremidad e infecciones polimicrobianas: ceftriaxona, levofloxacin, amoxicilina- ácido Clavulánico, entre

otros. En las infecciones agudas en un estado tóxico sistémico o inestabilidad metabólica: ciprofloxacino, piperacilina-tazobactam, vancomicina con ceftazidima, entre otros (Secretaría de Salud (SS)., 2013).

Uno de los agentes antimicrobianos más utilizados debido a su actividad antibacteriana de amplio espectro es el ciprofloxacino. Además de su amplio uso en aplicaciones de cicatrización de heridas muestra una alta actividad antimicrobiana tópica (Suhaeri et al., 2018).

2.2. CIPROFLOXACINO

El ciprofloxacino (CPX) pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, los cuales se dirigen hacia la girasa de DNA y la topoisomerasa IV bacterianas. Para muchas bacterias gran positivas (como *S. aureus*), la topoisomerasa IV es la actividad primaria inhibida por las quinolonas. En cambio, para muchas bacterias gramnegativas (como *E. coli*) la girasa de DNA es el blanco primario de la quinolona. El espectro antibacteriano del CPX es muy amplio, se caracteriza por ser un potente bactericida contra *E. coli* y diversas especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Campilobacter* y *Neisseria*, así como también tienen buena actividad contra estafilococos y estreptococos. La resistencia bacteriana contra el CPX puede surgir durante el tratamiento por medio de mutaciones de los genes cromosómicos bacterianos que codifican girasa de DNA o topoisomerasa IV, o por transporte activo del fármaco hacia afuera de la bacteria (Brunton et al., 2007; Suhaeri et al., 2018). Esto último ha puesto en discusión al uso de antibióticos sistémicos en procesos patológicos que envuelven a enfermedades como lo es el PD, ya que el resultado de la terapia con antibióticos depende de su concentración en el sitio local, pero su eficacia se puede ver afectada por la disminución de la perfusión que puede impedir la llegada del tratamiento de forma adecuada al sitio de acción provocando la aparición de cepas resistentes y el desarrollo de biopelículas convirtiendo la administración del fármaco en un desafío. En los últimos años se ha reportado que la resolución de la infección después de la infección del PD con medicamentos sistémicos varía ampliamente, con valores entre 5.6 y el 77.8% (Markakis et al., 2018; Price et al., 2020).

Por tal motivo, lograr la concentración adecuada de medicamento en el área afectada convierte a la aplicación local en una alternativa con múltiples ventajas. Tal caso es el lograr una alta concentración de antibiótico en el área afectada, y una absorción sistémica limitada del antibiótico, ya que reduce el riesgo de toxicidad, evita reacciones adversas de los medicamentos comparado con los antibióticos sistémicos y evita la formación de resistencia antibacteriana (Venkatesan et al., 2015). Llegados a este punto, una forma de resolver este problema es el desarrollo de administración de fármacos a través de dispositivos. Estos dispositivos de administración de fármacos están ganando atención debido a su capacidad para ejercer un control espacio-temporal sobre la disponibilidad de fármacos a nivel local en el sitio de la enfermedad (Brudno & Mooney, 2015) al cumplir con las ventajas de la administración local, además de que la duración prolongada de la acción en la CMI (Venkatesan et al., 2015).

2.3. DISPOSITIVOS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los dispositivos de administración de fármacos (DAF) actúan como un depósito de fármaco localizado en el sitio de tratamiento suelen adoptar la forma de un polímero o dispositivo implantado en un lugar de necesidad y liberan fármacos localmente (Brudno & Mooney, 2015). Actualmente, la mayoría de los medicamentos se administran por vía oral o parenteral, las principales desventajas de estos tipos de administración son: las tasas de absorción variables, el metabolismo inicial con la administración oral, la biodisponibilidad y con ello la actividad metabólica (Suede, 2013). En cambio, los DAF administran un agente bioactivo en el sitio de tratamiento deseado, por medio de un material portador cuyas propiedades físicas y químicas controlan la presentación del agente, lo que puede aumentar la eficacia del fármaco, reduce los efectos secundarios y confiere protección a los fármacos lábiles (Brudno & Mooney, 2015; Kearney & Mooney, 2013). Otras ventajas que se presentan en el uso de DAF es un control más preciso sobre la concentración del fármaco en los sitios específicos, disminución de efectos secundarios por la forma de administración local, liberación controlada y prolongada, lo que ofrece la disminución de una administración repetida al paciente, optimizando el tratamiento (Brudno & Mooney, 2015).

Los DAF suelen adoptar la forma de un polímero o dispositivo implantado en un lugar de necesidad y liberan fármacos localmente (Kearney & Mooney, 2013). Un

ejemplo de polímeros como dispositivos de liberación de fármacos son los polímeros de impresión molecular, materiales sintéticos similares a receptores con sitios de reconocimiento específicos para moléculas molde que permiten la liberación del fármaco en respuesta al medio (Lusina & Cegłowski, 2022).

2.4. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

Los MIPs son materiales sintéticos que presentan la propiedad de unir de manera altamente selectiva a un compuesto químico determinado. Estos polímeros imitan los sitios de unión de entidades biológicas como anticuerpos y enzimas, las cuales actúan formando un complejo de “llave-cerradura” (donde la molécula sustrato se une al centro activo de una enzima del mismo modo que lo haría una llave al encajar en una cerradura (Gallego, 2008). El reconocimiento selectivo de los MIPs se determina durante la preparación del polímero utilizando los monómeros apropiados para la molécula molde o plantilla, en un solvente adecuado. Posterior a la síntesis, las moléculas molde pueden eliminarse, dejando sitios creados a medida de la plantilla utilizada y adquieren la propiedad de reconocer selectivamente el tamaño, la forma y los grupos funcionales de la plantilla (Lusina & Cegłowski, 2022). Debido a esto, los MIP, pueden utilizarse como portadores de medicamentos con capacidad para controlar la liberación del agente terapéutico utilizado como molde durante la polimerización proceso. Esta capacidad permite superar los inconvenientes asociados a un índice terapéutico estrecho. reduciendo los efectos secundarios y mejorando el cumplimiento del paciente.

Es importante resaltar que, los MIPs tienen algunas ventajas como biocompatibilidad, baja toxicidad y biodegradabilidad. Además, su bajo costo, facilidad de preparación y su capacidad de uso en múltiples vías de administración lo convierten en un transportista alternativo. Por lo tanto, los MIP se desarrollan como un buen portador en la administración de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, arritmias, avitaminosis, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, inflamación, enfermedad adictiva. se pueden administrar por diferentes vías, como por vía oral, intravenosa, etc. (He et al., 2021).

2.4.1. COMPONENTES DE LOS MIPS

Generalmente, los MIP son sintetizados utilizando una molécula molde o plantilla, un monómero funcional, un entrecruzante, un solvente apropiado y un iniciador. En resumen, la síntesis se lleva a cabo mezclando los componentes y, finalmente, la mezcla es irradiada por luz ultravioleta o es sometida a calor para iniciar la reacción (Lusina & Cegłowski, 2022).

2.4.1.1. MOLÉCULA MOLDE, PLANTILLA O ANALITO DE INTERÉS

Es importante destacar los requisitos que hacen que la plantilla sea candidata para su uso debe mostrar estabilidad química durante la reacción de polimerización, que su estructura molecular no impida la polimerización, debe tener grupos que puedan formar complejos con monómeros funcionales y el tamaño debe ser considerado, ya que a medida que aumenta el tamaño de la molécula, menor es la probabilidad de formar una cavidad definida y selectiva para esa molécula (Lusina & Cegłowski, 2022; Meléndez et al., 2020). Los compuestos que pueden ser utilizados como plantillas pueden ser: fármacos, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, hormonas, entre otros (Meléndez et al., 2020)

2.4.1.2. MONÓMERO FUNCIONAL

La selección del monómero funcional depende de los grupos funcionales de la plantilla seleccionada, debe ser adecuado para que reaccione selectivamente con la plantilla y junto con ésta, formen un complejo de pre-polimerización estable (De et al., 2009). Para la reacción no covalente, el número de moles del monómero debe ser en exceso (Lusina & Cegłowski, 2022) La cantidad de monómeros para la impresión molecular es limitada, algunos de ellos son: ácido acrílico, ácido metacrílico y ácido láctico, éste último ha sido ampliamente utilizado para la formación de diferentes aplicaciones biomédicas, como hilos de sutura quirúrgicos, reconstrucción de tejidos y medicamentos de liberación controlada (Kearney & Mooney, 2013; Lusina & Cegłowski, 2022; Suede, 2013).

2.4.1.3. ENTRECruzante

La cantidad de entrecruzante para la síntesis también juega un papel importante en las propiedades de estos polímeros. La función principal del entrecruzante es la formación de la red polimérica, la cual influye en la morfología del polímero, estabilizar el sitio de unión impreso y dar estabilidad mecánica a la matriz polimérica. Los agentes entrecruzantes más utilizados en los MIPs son Dimetacrilato de etilenglicol (EDGMA) y el Trimetacrilato de trimetilolpropano, 4-Divinilbenceno (Lusina & Cegłowski, 2022; Suede, 2013).

2.4.1.4. PORÓGENO O SOLVENTE

Por último, el porógeno juega un papel importante como medio de dispersión y agente formador de poros, a mayor tamaño de poro la difusión del analito a través de las cavidades del polímero será más sencilla. Los disolventes comúnmente utilizados incluyen 2-metoxietanol, metanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, N,N-dimetilformamida y tolueno. El solvente debe poseer baja polaridad para evitar las interferencias durante la formación de complejos entre las moléculas y el monómero, lo cual es importante para poseer el MIP de alta selectividad (Lusina & Cegłowski, 2022; Turiel & Esteban, 2020).

2.4.1.5. INICIADOR

Para iniciar la reacción de los MIPs es necesario el uso de un iniciador, las reacciones más útiles para MIPs son la polimerización por radicales libres, la fotopolimerización y la electropolimerización (Lusina & Cegłowski, 2022). Para elegir el iniciador adecuado es importante conocer si la molécula plantilla es fotosensible o termosensible, en esos casos, lo ideal es utilizar un iniciador que se activa térmicamente o que se active por radiación ultravioleta, respectivamente (Ndunda, 2020).

Uno de los compuestos más utilizados son los de tipo azoico, en especial el 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN), el cual se fragmenta por radiación ultravioleta y por temperatura mayor a 60° C (Cheong et al., 2013).

2.5. MÉTODOS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

Entre los métodos de impresión molecular se encuentran los que se basan en las interacciones covalentes, basado en enlaces covalentes reversibles y no covalentes, que se basa en interacciones no covalentes entre la molécula molde y el monómero (Lusina & Cegłowski, 2022).

En el método de impresión covalente, se crea un complejo entre la plantilla y el monómero funcional, los cuales son unidos por enlaces covalentes (Lusina & Cegłowski, 2022). La síntesis se realiza en condiciones estequiométricas, lo que promueve la disminución de interacciones inespecíficas (Mayes & Whitcombe, 2005). Las ventajas de este método son que pueden emplearse en una variedad de condiciones experimentales como temperatura alta, pH básico o ácido, y disolventes altamente polares. Y la principal desventaja de este método es la dificultad de la remoción o liberación de la plantilla del polímero, debido a los escasos enlaces covalentes reversibles formados. (Lusina & Cegłowski, 2022).

El método no covalente, las interacciones formadas entre plantilla y monómero, como enlaces de hidrógeno, interacciones de tipo π - π , fuerzas de Van der Waals, etc. De la misma manera, el disolvente modifica la fuerza de las interacciones no covalentes; por ejemplo, los disolventes con una constante dieléctrica baja, como el tolueno y diclorometano, incrementan la fuerza de estas interacciones (Pérez-Moral & Mayes, 2004). Adicionalmente, el disolvente dirige el tamaño de poro y área superficial en el polímero, esto es de vital importancia, ya que a mayor tamaño de poro es más sencilla la difusión de las moléculas dentro de las cavidades del polímero donde se lleva a cabo el reconocimiento molecular (De et al., 2009). La principal ventaja que ofrece este tipo de polimerización es la facilidad para remover la molécula plantilla o molde del polímero y como desventaja es la formación de sitios no específicos, al agregar un exceso de monómero se disminuirá la selectividad del polímero (Lusina & Cegłowski, 2022).

Existen diversos métodos de síntesis para la obtención de polímeros no covalentes, los cuales resultan en polímeros con diferentes características morfológicas. Los que destacan son, emulsión, en masa y coprecipitación.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la curación del pie diabético es un tratamiento largo que se ve comprometido por la contaminación de microorganismos, a que la mayoría de los tratamientos son transportados a nivel sistémico y a las características fisiopatológicas de la úlcera, la llegada de los antibióticos al sitio de acción se ve limitada y su eficacia se puede ver afectada por la baja penetración tisular favoreciendo la generación de biopelículas, de resistencia a los antibióticos e impidiendo la recuperación de la herida. La terapia local es una alternativa que permite la llegada del tratamiento directamente en el sitio de acción. En este contexto, resalta la necesidad de desarrollar materiales que permitan la liberación local y prolongada de fármacos. Por lo que se propone a los Polímeros de Impresión Molecular, materiales utilizados para aplicación local, biocompatibles con las células humanas, poseen gran estabilidad, capacidad para mantener la liberación del agente terapéutico en respuesta del medio y con resistencia a una amplia gama de condiciones (pH, disolventes orgánicos, temperatura y presión).

4. HIPÓTESIS

Los polímeros de impresión molecular permiten la liberación antibióticos de manera local y controlada en sistemas artificiales; en estudios in vitro son capaces de liberar la concentración mínima inhibitoria de antibiótico frente a diferentes microorganismos y no presentan toxicidad.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar y caracterizar polímeros de impresión molecular para la liberación local de Ciprofloxacino en condiciones controladas y, evaluar su efectividad y seguridad frente a bacterias (*S. aureus* y *E. coli*) y fibroblastos dérmicos, respectivamente.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y sintetizar MIPs y NIPs de ciprofloxacino por métodos no covalentes (emulsión, en masa y coprecipitación).
- Caracterizar la morfología de los MIPs y NIPs mediante microscopía electrónica de barrido.
- Caracterizar la interacción monómero-plantilla mediante análisis por infrarrojo (ATR-FTIR).
- Obtener la cinética de liberación del ciprofloxacino con el método de difusión de celdas de Franz.
- Caracterizar funcionalmente los MIPs mediante isotermas de adsorción (Langmuir, Freundlich y SIPS).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los MIPs mediante la técnica de microdilución.
- Evaluar la citotoxicidad de los componentes de la síntesis mediante el método de Resazurina/Resorufina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. REACTIVOS

Para la síntesis de los MIPs y NIPs se utilizaron los reactivos ácido láctico (AL), ácido metacrílico (AM), dimetacrilato de etilenglicol (EDGMA), azobisisobutironitrilo (AIBN), polivinil alcohol (PVA), lauril sulfato (SDS) y ciprofloxacino (CPX), todos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Los solventes orgánicos utilizados fueron metanol y acetonitrilo de la empresa Tedia Company Inc. (Fairfield Ohio, EE. UU). El ácido clorhídrico (HCl) y ácido orto fosfórico fue suministrado por Merck (Edo. De México).

6.2. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

La síntesis de los MIPs y NIPs se realizó con ligeras modificaciones de lo reportado por estudios previos de nuestro grupo de trabajo (de León-Martínez et al., 2018) se realizaron mediante tres métodos de polimerización de tipo no covalente:

Para el método de emulsión se disolvieron el PVA (1.55g) y SDS (0.1079g) en agua caliente (75 mL) en un matraz de 100 mL y con agitación mediante una barra magnética a 200 rpm en atmósfera de nitrógeno con sello hermético. En otro matraz de reacción, se preparó una mezcla de polimerización, en el que se disolvió la

molécula plantilla (CPX), el monómero funcional (AL y AM) en HCL 0.1 M, en proporción de plantilla monómero 1:4, se utilizó metanol como porógeno, EDGMA como entrecruzante y AIBN como iniciador. Posteriormente, la mezcla de polimerización se añadió por goteo a través de la septa por medio de una jeringa a la solución con PVA y SDS, la mezcla final se mantuvo a temperatura constante de 70°C en un baño de glicerina con agitación constante mediante una barra magnética a 100 rpm durante 24 h. Finalmente, los polímeros se lavaron con agua caliente para eliminar los residuos de PVA y SDS. Después, para el método de en masa primero, se utilizaron los mismos componentes de la mezcla de polimerización para el método de emulsión. En este caso, la reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno sin agitación, en baño de glicerina a 70°C durante 24 h. Por último, para el método de coprecipitación, se utilizó el mismo procedimiento y condiciones de reacción de la polimerización en masa, con un exceso de porógeno y en agitación magnética. Para cada uno de los polímeros sintetizados se obtuvieron homólogos llamados polímeros no impresos (NIPs), los cuales fueron preparados de la misma manera que los MIPs correspondientes con la diferencia de que no se agregó CPX.

6.3. MÉTODO ANALÍTICO

Para la determinación del CPX en las diferentes muestras obtenidas, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Agilent® 1260 Infinity Series). Se utilizó una columna Zorbax SB C18 con características de 4.6 mm de diámetro, 150 mm de longitud con 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en 65% de ácido orto fosfórico (pH 3.4) y 35% metanol a un flujo isocrático a 0.6 mL/min con un tiempo de corrida de 7 min. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µL y la longitud de onda del FLD fueron de 278 nm y 455 nm de excitación y emisión.

La validación del método se realizó con base en la guía para la validación de métodos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos a nivel de trazas (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC 2000), evaluando los siguientes parámetros: límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), linealidad (R^2), sensibilidad y precisión. La linealidad expresada por el coeficiente de correlación (R^2) y la sensibilidad determinada por la pendiente de la curva, resultaron del promedio de

siete curvas registradas durante 3 días (3 para repetibilidad y 4 para reproducibilidad).

6.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MIPS Y NIPS

6.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para obtener la morfología de cada uno de los polímeros y la influencia de los componentes sobre ella se obtuvieron micrografías de los MIPS y NIPs por medio de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) FEI® modelo Inspect F50, para la evaluación de la superficie y morfología de todos los polímeros. Primero, cada muestra necesitó la deposición previa de una capa delgada de oro para evitar la sobrecarga de electrones sobre el polímero y hacer conductora la muestra. Este paso se realizó con un equipo de deposición de películas delgadas Bal-Tec® modelo MED 020, mediante la técnica de Sputtering o pulverización catódica. Cada muestra permaneció durante 10 segundos en el equipo, para asegurar la formación de una capa de un espesor de 10 nm. Finalmente, para el análisis de las muestras se utilizó un detector Everhart-Thornley (ETD) en modo de electrones secundarios (SE), un voltaje de 15 kV. Los parámetros que se ajustaron en la lectura de cada polímero fueron: la magnificación o aumento (x), el ancho de campo horizontal (HFW) y la distancia de trabajo (WD).

6.4.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Para evaluar la impresión del CPX en el MIP, así como los grupos funcionales del MIP y NIP, se realizó a través de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) (Thermo Scientific®, modelo Nicolet iS10). Los espectros infrarrojos se colectaron en un rango espacial de 500 a 4000 cm^{-1} , con 16 acumulaciones.

6.4.3. ÁREA ESPECÍFICA Y DIÁMETRO DE PORO

Las propiedades de textura de los materiales se obtuvieron a partir de las mediciones de adsorción-desorción de N_2 a 77 K, utilizando un instrumento de adsorción automática ((Autosorb-IQ, Quantachrome Instrument Corp., Boynton Beach, FL, EE. UU.). El área superficial específica (S_{BET}) se calculó utilizando el

método Brunauer Emmett Teller (BET). Se utilizó el método de Barrett, Joyner y Halenda (BJH) para calcular las distribuciones de tamaño de poro.

6.4.4. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Para caracterizar la forma en que el ciprofloxacino se encuentra adsorbido en la superficie de los polímeros se realizaron experimentos para la obtención de las isothermas se utilizaron concentraciones en el rango de 1 a 90 mg L⁻¹ de CPX y todos los experimentos se realizaron a 24°C. La capacidad de adsorción en equilibrio, q , (mg g⁻¹) se calculó de acuerdo con la ecuación (1).

$$q = \frac{(C_o - C_e)V}{W} \quad (1)$$

Donde C_o (mg L⁻¹) y C_e (mg L⁻¹) son las concentraciones del adsorbato iniciales y al equilibrio, respectivamente. V (L) y W (g) son el volumen de las soluciones estándar y el peso del polímero, respectivamente.

Los datos al equilibrio obtenidos se ajustaron a los modelos de isothermas de adsorción de Langmuir, Freundlich y SIPS, esto para describir la interacción entre el adsorbente y el adsorbato. El modelo de la isoterma de Langmuir se muestra a continuación (Langmuir, 1916):

$$q = \frac{Kq_m C}{1 + KC} \quad (2)$$

Donde C (mg L⁻¹) es la concentración del adsorbato al equilibrio, q_m (mg L⁻¹) es la capacidad máxima de adsorción y K (L mg⁻¹) es la constante de afinidad relacionada con la energía de adsorción.

El modelo de la isoterma de Freundlich también se muestran a continuación (Freundlich, 1906):

$$q = kC^{1/n} \quad (3)$$

Donde k ($\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$) es una constante relacionada con capacidad de adsorción del adsorbente y la constante n indica la intensidad de la adsorción; un valor de $n > 1.0$ representa una condición de adsorción favorable.

Finalmente, el modelo de la isoterma de SIPS (Eq 4) se muestra a continuación (Redlich & Peterson, 1958):

$$q = \frac{N_t a C^m}{1 + a C^m} \quad (4)$$

Este modelo de tres parámetros incluye las características de la isoterma de Langmuir y Freundlich, donde a es la constante de la isoterma.

Para ajustar los datos experimentales a los modelos matemáticos analizados se usó el software Statistica® versión 7.0 y se eligió el modelo de mejor ajuste por el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1.

6.4.5. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN

Las cinéticas de liberación se obtuvieron realizando estudios de difusión *in vitro*. Todos los experimentos se realizaron a $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, en una celda de difusión de Franz y utilizando papel filtro polivinildifluoruro (PVDF), el papel previamente empapado por el medio receptor se colocó entre los compartimentos donante y receptor de la celda, luego las dos cámaras fueron fijadas juntas, el compartimento receptor fue llenado con 20 mL de tampón de fosfatos a pH 5.4. Finalmente, se tomaron muestras del compartimento receptor a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h) para su análisis HPLC-FLD y se reemplazó con tampón fosfatos nuevo. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada uno de los MIPs sintetizados.

Los perfiles de liberación se ajustaron de acuerdo con las ecuaciones de Higuchi (5) y Korsmeyer-Peppas (6):

$$M_t = kt^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Donde M_t corresponde a la cantidad de fármaco liberado al tiempo t y k es una constante.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (6)$$

Donde, $\frac{M_t}{M_\infty}$ es la fracción del fármaco liberado al tiempo t , k es la constante de difusión y n es el exponente de liberación. El exponente n , describe el mecanismo de liberación: en el caso de quasi-fickiano difusión el valor $n < 0.5$, difusión fickiana $n = 0.5$, la fracción del fármaco es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (modelo de Higuchi, eq 5) y la difusión del fármaco es controlada por difusión; cuando $n = 1$ la ecuación es correspondiente al modelo de orden cero. Valores de n entre 0.5 y 1 indican proceso anómalo con aporte de diferentes fenómenos como intercambio iónico, relajación de cadenas poliméricas, entre otros.

6.4.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los polímeros en dos microorganismos *S. aureus* y *E. coli* (ATCC 25923 y 25922, respectivamente) Las cepas de los microorganismos se mantuvieron en medio sólido de Mueller Hinton (211443, BBL™) los cultivos se colocaron en una atmósfera humidificada suplementada con CO₂ al 5% durante 24 h. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con el método de microdilución para la estimación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI).

Las CMI se determinaron incubando a *S. aureus* y *E. coli* en microplacas de 96 pocillos en una atmósfera humidificada suplementada con CO₂ al 5% durante 24h. Los microorganismos se expusieron a diluciones en serie de MIPs y NIPs, y los puntos finales se determinaron cuando no se observó turbidez en el pozo. Las actividades antimicrobianas de los polímeros se compararon con ciprofloxacino. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

6.4.7. CITOTOXICIDAD

Se evaluó la citotoxicidad de los polímeros en fibroblastos dérmicos (HDFn) (PCS-201-010). Las células fueron mantenidas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 30-2002 ATCC), suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (1600.036, Gibco) y penicilina-estreptomocina al 1% (v/v) (13377820, ROCHE), se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, durante 24 h. Las células (1x10⁴ células/pozo) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos. La evaluación de la citotoxicidad se realizó mediante ensayos de viabilidad celular (alamarBlue, Invitrogen) que, debido a la reducción metabólica de la resazurina a la resorufina altamente fluorescente, permiten estimar el número de células viables.

Las células fueron tratadas con extractos de polímero, obtenidos en PBS (24, 48 y 72 h), durante 24, 48 y 72 h. Después de la incubación, se adicionaron 100 µL de alamarBlue en cada pozo. Después de 4 h, la absorbancia fue medida a 570 nm usando un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo scientific). Se usaron células tratadas y no tratadas con medio DMEM como controles positivos y negativos, respectivamente. Los experimentos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes. Finalmente, el porcentaje de viabilidad fue obtenido utilizando el control positivo como el 100%.

6.4.8. IMPRESIÓN 3D

Como perspectiva del proyecto se realizaron diseños de dispositivos 3D para la liberación del CPX. Por lo que, se utilizó la impresión 3D con una impresora Weistek (W5501) y una resina fotopolimérica Elegoo, que polimeriza a una longitud de onda de 405 nm, los programas utilizados para el diseño del dispositivo fueron: Lycheeslicer 3.5.1 y Autodesk, ambos de uso gratuito. Se utilizó como diámetro de la base 25 mm, se evaluaron diferentes alturas de la base (AB) (5 y 1 mm), diferentes diámetros de las proyecciones (DP) (3, 2 y 1 mm), alturas de las proyecciones (AP) (2, 1 y 0.5 mm) y formas en las proyecciones (esférica, circular, rectangular y cónica). Además, para evaluar la impresión 3D de los MIPs, se realizaron dos mezclas, una de ellas de resina con polímero sintetizado (M-AL-M) y la segunda resina con mezcla de polimerización (M-AL-M), la impresión se realizó con el diseño de 1 mm de AB, 1 mm DP, 1 mm de AP y forma cónica. Finalmente, a ambas impresiones 3D con resina y MIP, se sumergieron en metanol y agua por separado, durante 1 h y en agitación constante. Transcurrido ese tiempo se

tomaron muestras de metanol y agua para ser analizadas en HPLC-FLD y comprobar la liberación del CPX.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS IMPRESOS Y NO IMPRESOS

Para permitir la liberación del agente terapéutico en respuesta al medio se sintetizaron polímeros de características no covalente, ya que permite mayor facilidad de remoción de la plantilla por los enlaces formados. Se utilizaron dos monómeros diferentes el ácido láctico (AL) y ácido metacrílico (AM), los cuales obtuvieron diferentes propiedades físicas según el método de polimerización utilizado (emulsión, coprecipitación y en masa). En total se sintetizaron 12 polímeros, dos polímeros impresos y dos no impresos por cada método de síntesis. La proporción utilizada de ciprofloxacino y monómero fue de 1:4, con un rendimiento de entre 2 a 3 gramos. Los polímeros obtenidos en masa y coprecipitación, para ambos monómeros, presentaron un color blanco y textura suave. A diferencia de los polímeros realizados por emulsión, que presentaron una textura más rígida y un color blanco-amarillento.

El AM es un monómero ácido ionizado en medios acuosos, particularmente en condiciones neutras y básicas. El grupo carboxilo del AM (-COOH) puede interactuar de forma efectiva con aceptores y donantes a través de enlaces de hidrógeno (H) o electrostáticos de la estructura de CPX, al perder un átomo de H se carga negativamente, por lo tanto, puede establecer enlaces iónicos a través de su grupo carboxilo. Además, tiene un átomo de oxígeno que es un aceptor de H y puede formar enlaces con donadores de H. El grupo hidroxilo no ionizado presente en AM (-OH) es un donante de H y, por lo tanto, puede interactuar con un aceptor de H. Debido a la presencia de tres grupos amino, un carbonilo y un ácido carboxílico en la estructura del CPX, puede actuar fácilmente como donante y aceptor de enlaces de hidrógeno o formar enlaces iónicos con AM como monómero en el proceso de impresión (Kioomars et al., 2017).

En la **Tabla 1** se presentan los códigos utilizados para identificar los polímeros obtenidos que serán utilizados a lo largo del escrito.

Table 1. Code of the synthesized MIPs and NIPs.

Code	MIP	NIP	Polymerization method	Monomer
M-AL-C	X		Co-precipitation	Lactic acid
M-AL-M	X		Mass	Lactic acid
M-AL-E	X		Emulsion	Lactic acid
M-AM-C	X		Co-precipitation	Methacrylic acid
M-AM-M	X		Mass	Methacrylic acid
M-AM-E	X		Emulsión	Methacrylic acid
N-AL-C		X	Co-precipitation	Lactic acid
N-AL-M		X	Mass	Lactic acid
N-AL-E		X	Emulsión	Lactic acid
N-AM-C		X	Co-precipitation	Methacrylic acid
N-AM-M		X	Mass	Methacrylic acid
N-AM-E		X	Emulsion	Methacrylic acid

7.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método analítico para la cuantificación de ciprofloxacino fue validado, obtuvo un rango lineal de 0.8 - 3.50 mg L⁻¹, se contó con una linealidad de 0.9978 y una sensibilidad del método obtenida mediante la pendiente de la curva de 254.1 (IC 95 %: 237.6 – 270.7), el LOD y LOQ se obtuvieron por el método de pendientes con valores de 0.39 y 0.82 mg L⁻¹, respectivamente.

7.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MIPs y NIPs POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICO DE BARRIDO

La morfología de los polímeros fue examinada por SEM, las características morfológicas fueron diferentes para cada polímero, para los polímeros realizados por el método de emulsión, el MIP con AM presenta morfología irregular, que al compararla con su homólogo sin fármaco podemos ver partículas de forma esférica con diferentes tamaños, aproximados a los 5 µm, para el MIP con AL como

monómero se observan partículas esféricas con una gran variedad de tamaños, las partículas más grandes se encuentran alrededor de 1 μm de diámetro, su NIP correspondiente se observan partículas esféricas de mayor tamaño, de alrededor de 10 μm .

En el caso de los polímeros realizados por el método de coprecipitación, con AM, para los MIP y NIP se observan aglomerados con morfología irregular. En el caso de los realizados con AL, para el polímero en el cual se encuentra adsorbido el CPX, a pesar de encontrarse aglomerados, se puede observar una morfología de forma esférica y su homólogo sin CPX se observan partículas aglomeradas e irregulares.

Para los polímeros realizados mediante el método en masa, para el MIP con AM se observan partículas esféricas aglomeradas con un tamaño aproximado a 1 μm , en el NIP, se observan partículas aglomeradas de menor tamaño. En el caso de los polímeros realizados con AL, las partículas se encuentran aglomeradas con partículas esféricas, con un tamaño menor a 1 μm , para el caso del MIP y las partículas del NIP se observan aglomeradas y sin morfología definida.

Dado que los MIPs presentan una morfología y variación en el tamaño de partícula cuando son sintetizados por el mismo método, pero sin la presencia de la plantilla (NIP), esto puede ser indicativo que la presencia del CPX en la matriz polimérica interfiere en la morfología de los polímeros, esto ha sido propuesto por varios autores (Bhawani et al., 2018) y se debe a las interacciones químicas entre la platilla con el monómero.

7.4. ÁREA ESPECÍFICA Y DIÁMETRO DE PORO

El área específica y el diámetro de poro promedio de MIP y NIP se calcularon utilizando los métodos BET y BJH. El área específica se encuentra en el rango de 127 a 318 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, indicando que tanto los MIPs como los NIPs son materiales con alta porosidad. Además, los diámetros de poro obtenidos evidenciaron que todos los materiales son mesoporosos (Meléndez-Marmolejo et al., 2022). El área específica de los MIP es menor que la de los NIP. Además, se encontró que el uso de AM como monómero funcional mejora la formación de poros ya que los valores del diámetro de poro son superiores a los valores obtenidos con el uso de AL. El

NIP evaluado fue realizado por el método de coprecipitación, AM como monómero funcional y tolueno como porógeno, a diferencia de los MIPs que fueron realizados con metanol. El uso de este último se debió a la toxicidad reportada del Tolueno y a que los componentes utilizados en la síntesis presentaron mayor solubilidad con metanol, para que la polimerización se realice de forma efectiva es necesario que todos los componentes se encuentren disueltos (Lusina & Ceglowski, 2022). Los valores obtenidos en el análisis del NIP, concuerda con lo que se ha reportado, ya que se menciona que el tolueno es un buen formador de poros en presencia de AM y EDGMA (Meléndez-Marmolejo et al., 2022).

7.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los MIPs y NIPs se caracterizaron mediante ATR-FTIR. El espectro ATR-FTIR del CPX es caracterizado por una amplia banda de absorción en el rango de 3600-3000 cm^{-1} causado por la estrecha vibración de los grupos $\nu(\text{-OH})$. La estrecha vibración de las bandas de $\nu(\text{C=O})$ aparecen cerca de 1720 cm^{-1} , mientras las vibraciones de estiramiento de C=C en el anillo de quinolona (en este rango, la densidad óptica de las vibraciones de deformación de los enlaces -NH es muy pequeña) aparecen cerca 1600 cm^{-1} . En el rango de los números de onda 1500-1400 cm^{-1} aparece la estrecha vibración de los grupos C-O al igual que las vibraciones -COOC (grupo carboxilo ionizado). Las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-F se manifiestan en el rango del número de onda 1050-1000 cm^{-1} . Por lo tanto, las bandas que se encuentran asociadas con la molécula de CPX, confirman que la molécula plantilla se encuentra impresa en el MIP.

7.6. CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Para determinar las cinéticas de liberación del CPX a partir de los MIPs obtenidos se realizaron estudios de liberación *in vitro* empleando una celda de difusión de Franz. Para esto, se empleó como medio receptor buffer de fosfatos (PBS) de pH 5.4, simulando el pH de la superficie de la piel en condiciones homeostáticas. Para el M-AL-M se muestra un perfil de liberación con una fase de liberación de ráfaga inicial y para las siguientes 6 horas esta liberación siguió aumentando, pero con menor cantidad de CPX. En el caso de los polímeros M-AM-M y M-AM-E se observa

un comportamiento similar, iniciando con una mayor liberación en la primera hora y una disminución en la velocidad conforme pasa el tiempo. En el caso del polímero del método de coprecipitación y ácido láctico como monómero (M-AL-C) para las 8 horas, aproximadamente una décima parte de CPX contenido en el MIP fue liberado. La menor liberación presentada, durante las 8 horas evaluadas, fue por los polímeros M-AL-E y M-AL-C.

El CPX es una fluoroquinolona bactericida, es decir, presenta una destrucción bacteriana más extensa y rápida a medida que aumenta la concentración (Salguero et al., 2020). Con los resultados obtenidos en cada uno de los perfiles, la liberación inicial puede permitir que el CPX se encuentre una concentración adecuada para la eliminación de los microorganismos y en las siguientes horas mantenga la liberación que impida la proliferación bacteriana, la formación de resistencia e incluso la producción de biopelículas.

Con el fin de determinar las cinéticas y el mecanismo de liberación del CPX, se aplicaron los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas, se obtuvo la ecuación en forma logarítmica para cada uno de los perfiles obtenidos y con el valor del exponente n se obtuvo la información sobre la cinética de liberación del fármaco en cada uno de los MIPs, todos los valores de n se encuentran entre 0.5 y 1, lo que nos indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no Fickiana o anómalo, que corresponde al modelo de Korsmeyer-Peppas, durante las 8 horas de liberación estudiadas, caracterizándose por una liberación inicial rápida que va disminuyendo con el tiempo. Es decir, el tipo de liberación es dependiente del tiempo y, finalmente, la velocidad de liberación del fármaco estuvo controlado por la disolución del fármaco.

Estudios previos han demostrado que el uso de polímeros con componentes similares a los utilizados en este trabajo y/o utilizando la técnica de impresión molecular, pueden mantener la liberación de antibacterianos; además, llevan a cabo un mecanismo similar de liberación. En el caso del estudio realizado por Emel y col., obtuvieron un MIP injerto en nanofibras, utilizando una proporción de 1 a 5 de sulfato de gentamicina y AM como monómero, evaluaron la liberación del fármaco utilizando los MIPs y NIPs, a los cuales se les adicionó una concentración 10 mg mL^{-1} del fármaco y se evaluó la liberación durante 6 h, obteniendo un 68%, de liberación, por otra parte, se determinó que el 98% de la liberación acumulada de fármaco en el NIP se produjo en las primeras 8 h, esto demostró la diferencia

en las interacciones no específicas entre las moléculas del fármaco y los grupos funcionales presentes en el NIP, mientras que las interacciones específicas con alta afinidad que existen en el MIP confieren un mayor control en la liberación del fármaco. El estudio señaló que la liberación se ajustó al modelo cinético de Korsmeyer-peppas, el cual define la liberación de las moléculas de fármaco a través de un mecanismo controlado por hinchazón, la liberación de gentamicina de ajustaron a un modelo no fickiano indicando la difusión de las moléculas de fármaco a través del hidrogel hinchado (Tamahkar et al., 2019).

En el caso de Zhang y col., realizaron MIPs líquidos cristalinos con levofloxacin (0.4 mg) (LVF) y AM con proporción de 1:4. El experimento de liberación se realizó por 72 horas, se demostró que ocurre una liberación del 90 % de LVF durante las primeras 21 horas y su mecanismo de liberación es por difusión fickiana (Zhang et al., 2018).

En otro estudio de Salguero y col., realizaron películas basadas en biopolímeros cargadas con CPX, para la aplicación tópica, utilizando doble capa de hidróxido (LDH) y hialuronano (HS) como sistemas de administración del fármaco. El estudio de liberación del CPX de la película (LDH-CPX)/HS con 0.37 mg de CPX, fue realizado durante 8 h, se evaluó en PBS en un rango de pH 5.8 y 7.4, con el objetivo de simular las condiciones fisiológicas de la piel intacta y los exudados plasmáticos de la piel dañada, respectivamente. La liberación de CPX en la película a pH de 7.4 obtuvo un ajuste con Korsmeyer-Peppas ($n= 1.01$), sus resultados indicaron que la velocidad de liberación estuvo controlada principalmente por la disolución del fármaco y su modelo de mejor ajuste en pH de 5.8 fue el de Higuchi. La explicación de estos resultados es en función a las formas iónicas del CPX (positivas o negativas) o zwitteriónicas debido a su reactividad ácido/base, determinada por sus grupos piperazina ($pK_a=8.8$) y ácido carboxílico ($pK_a=6.1$), su menor solubilidad acuosa se produce a un pH cercano a 7 y su punto isoeléctrico a pH 7.4, mientras que a pH de 5.8 la solubilidad global de CPX aumenta (Salguero et al., 2020).

Zaidi y col., realizaron nanopartículas de MIP mesoporosas mediante polimerización por precipitación utilizando nanopartículas de poli(AM-co-EGDMA) para un sistema de liberación sostenida de Azitromicina (AZM) un macrolido semisintético. Los datos de liberación del fármaco se ajustaron al modelo de

Korsmeyer-Peppas (R^2 0.9669), con un valor de exponente de difusión “ n ” de 0.59, que indica un mecanismo de difusión no fickiano y que la difusión y la liberación del fármaco se controla por el hinchamiento del polímero. Los gráficos de liberación del fármaco mostraron una liberación inicial en ráfaga, seguida de una liberación de casi el 24 % del AZM cargado en el primer día. Durante los siguientes dos días, se liberó aproximadamente el 14% del AZM de las nanopartículas MIP y después de una semana, se liberó el 78% del fármaco (Zaidi, 2016).

7.7. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Para evaluar la forma en la que el CPX se adsorbió a los MIPs, se realizaron ensayos de adsorción y se identificó el método de mejor ajuste para dos de los polímeros realizados con los dos diferentes monómeros utilizados (M-AL-C y M-AM-C). Los datos al equilibrio se ajustaron a los modelos de Freundlich, Langmuir y SIPS. El mejor ajuste de los modelos de isotermas se eligió por el valor del coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1. Las constantes de las isotermas de adsorción para los MIPs (M-AL-C y M-AM-C) en estudio se muestran en la **Tabla 5**. El polímero M-AL-C se ajustó mejor al modelo de Freundlich ($R^2=0.9466$), lo que indica que la adsorción se da en multicapa. Este modelo describe que la mayoría de las superficies son heterogéneas y existen múltiples sitios disponibles para la adsorción. Para el polímero M-AM-C el modelo de mejor ajuste fue el de Langmuir ($R^2=0.9169$), lo que indica que la adsorción ocurre en monocapa y supone una superficie homogénea con un número específico de sitios de unión donde se puede adsorber una molécula.

7.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizó un ensayo de microdilución para evaluar la actividad antimicrobiana de la liberación de CPX en cada uno de los MIPs y NIPs contra dos microorganismos el *S. aureus* y *E. coli*. Además se señala los rangos establecidos por el Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Todos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango establecido por el CLSI. Los MIPs mostraron actividad antimicrobiana contra la forma planctónica de *S. aureus* y *E. coli*.

La evaluación antimicrobiana de cada uno los polímeros contra la forma planctónica de *S. aureus* mostró una CMI de 0.031 mg L⁻¹ con M-AL-M y M-AM-M, 0.0156 mg

L⁻¹ con M-AL-C, 0.125 mg L⁻¹ con M-AL-E, 0.062 mg L⁻¹ con M-AM-C y M-AM-E, y para la forma planctónica de *E. coli* 0.0039 mg L⁻¹ con los MIPs, 0.031 mg L⁻¹ con M-AL-E y 0.0156 mg L⁻¹ con M-AM-E. Para ambos microorganismos se utilizó como control de CPX grado analítico el cual presentó un CMI de 0.031 y 0.0078 mg L⁻¹ en *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. De igual manera, se evaluaron dos NIPs (AL y AM) los cuales no presentaron inhibición.

Las formas farmacéuticas tópicas convencionales utilizadas para el tratamiento de las heridas, presentan desventajas por la falta de precisión en la dosificación, tiempo de permanencia insuficiente, rendimiento terapéutico variable, o eliminación de la superficie de la piel (Lam et al., 2018), esto representa en una fallo terapéutico en el paciente y se agrava aún más cuando se tratan infecciones bacterianas en pacientes comprometidos, como es el caso de heridas en PD, ya que aumenta la morbilidad y conduce a la amputación de las extremidades (Vardakas et al., 2008). Las bacterias comúnmente aisladas en estas heridas son *S. aureus* (Gram positiva) y *E. coli* (Gram negativa) (Pitocco et al., 2019), por lo que requieren de antibióticos de amplio espectro para su tratamiento (Ramirez-Acuña et al., 2019), uno de ellos es el ciprofloxacino, antibiótico eficaz contra las bacterias grampositivas y gramnegativas, ya que inhibe de forma selectiva las helicasas de ADN bacteriano, afectando su función y evitando así que el ADN forme un superenrollamiento negativo, causando trastornos reproductivos bacterianos y la muerte (Brunton et al., 2007).

Las formas locales de liberación de antibióticos representan una atractiva manera de tratamiento para úlceras de PD, una clara ventaja es que alcanza concentraciones altas de antibiótico en la zona afectada, lo cual no ocurre con el uso de antibióticos sistémicos, esto puede ser importante donde los casos de penetración de antibióticos en el área infectada podría ser sub-óptima debido al compromiso de perfusión vascular o presencia de biopelículas de bacterias (Tanner et al., 2015). Adicionalmente, la limitada absorción local de los antibióticos reduce considerablemente el riesgo de toxicidad y las reacciones adversas a los fármacos, además puede ser utilizada en pacientes con intolerancia a la administración sistémica debido a la función renal o hepática alterada (Smith et al., 2020).

A este respecto, se han diseñado materiales para producir una mayor funcionalidad, como el mantenimiento de la liberación, la inhibición del crecimiento bacteriano y la curación de heridas (Markakis et al., 2018; Smith et al., 2020). En un estudio doble ciego y controlado, compararon el uso tópico del péptido antimicrobiano pexiganan contra la eficacia sistémica de ofloxacino una fluoroquinolona utilizada en úlceras de pie diabético, los resultados del estudio clínico señalan que las tasas de mejora clínica fueron del 85 y 90 % y la erradicación microbiológica global fue del 42 y 47 %, respectivamente. Los autores señalan que este tratamiento tópico puede ser una alternativa eficaz a la terapia antibiótica oral en el tratamiento de los pacientes con úlceras ligeramente infectadas y podría reducir el riesgo de generar bacterias resistentes a antimicrobianos (Lipsky et al., 2008).

En el caso del uso de implantes conlleva un riesgo de infección posoperatoria, la presencia de antibióticos en la superficie del implante puede mitigar el riesgo. Por ejemplo, Yang y col., utilizó la tecnología electroquímica para preparar un material compuesto de vancomicina (VA) y para depositarlo en implantes de titanio, sin embargo, el 80% de fármaco fue liberado en pocas horas. En el estudio de Mao y col., propusieron nanopartículas con la técnica de impresión molecular (NP-MIP) sensibles al pH para mejorar la actividad antibacteriana de VA, los materiales alcanzaron una concentración de estado estacionario después de 220 h a pH 5.2 y después de 432 h a pH 7.4. Los NIP-NP (previamente cargados con VA), por el contrario, liberaron toda la VA dentro de las 24 h en todos los valores de pH, lo que indica una falta de respuesta al pH y la incapacidad de lograr una liberación sostenida del fármaco. Además, las NP-MIP lograron una proporción antibacteriana (la proporción de recuentos de bacterias viables antes y después de la administración) de más del 90% contra *S. aureus*, mientras que las NP-NIP exhibieron proporciones antibacterianas negativas (es decir, *S. aureus* proliferó en presencia del implante) (Lipsky et al., 2008).

Estudios previos han demostrado que el uso de polímeros con componentes similares a los utilizados en este trabajo, son eficaces para la eliminación de diferentes microorganismos presentes en infecciones de PD. El estudio realizado por Kioomars y col., formularon hidrogeles con CPX, para la administración de este antibiótico en sistemas oculares, utilizando como monómero AM y EDGMA como

entrecruzante, el cual demostró actividad antimicrobiana contra *Pseudomona aeruginosa* y *S. aureus* aislados de pacientes (Kioomars et al., 2017).

En otro estudio se realizó un MIP injerto en nanofibras, utilizando AM, como monómero y sulfato de gentamicina como plantilla utilizando diferentes proporciones (MIP1 1:5, MIP2 1:10 y MIP3 1:20, gentamicina:AM), evaluaron la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco con *E. coli* y *S. aureus*. Todas las nanofibras compuestas con MIP presentaron diferencias significativas en el halo de inhibición bacteriana contra el grupo control, obteniendo 8 mm para *E. coli* y 13.5 mm para *S. aureus* para el grupo control, mientras que para los MIPs presentaron un halo en MIP1, MIP2, y MIP3 de 11 mm, 9.5 mm, 7.5 mm para *E. coli* y 14,5 mm, 13,5 mm y 12,5 mm para *S. aureus*, respectivamente (Tamahkar et al., 2019).

Salguero y col., realizaron películas basadas en biopolímeros cargadas con CPX (0.35 mg), para la aplicación tópica, utilizando doble capa de hidróxido (LDH) y hialuronano (HS) como sistemas de administración del fármaco. La actividad antimicrobiana fue investigada mediante el ensayo de difusión en disco, para evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Utilizando una película de 6 mm, (LDH-CPX)/HS exhibió un halo de inhibición significativo de 33 ± 1 mm (Salguero et al., 2020).

Las limitaciones de las formas de dosificación de antibióticos convencionales se reconocen como los principales factores que atribuyen a la resistencia a los antibióticos, esto debido a las concentraciones inadecuadas en los sitios de infección que requieren dosis de antibióticos y mayor frecuencia en su administración, lo que se asocia con más efectos adversos e incumplimiento del tratamiento por parte del paciente (Osman et al., 2022). Aunado a esto, las condiciones fisiopatológicas del PD impiden la llegada de fármacos a nivel sistémico favoreciendo la rápida aparición de resistencia bacteriana e incluso la formación de biopelículas (Boulton & Rayman, 2020). La principal preocupación al tratar una infección es disminuir la tasa de infección o erradicarla; sin embargo, debido a la creciente tasa de resistencia a los antibióticos es difícil tratar al PD con antibióticos (Ahmed et al., 2021). Por lo tanto, todos estos desafíos enfatizan la necesidad del desarrollo de portadores para la administración de fármacos que

ayuden a mejorar la actividad de los antibióticos convencionales y prevenir el aumento de la resistencia antimicrobiana (Osman et al., 2022). Con esto, el uso de los MIPs como materiales de liberación local de antibióticos se vuelve una alternativa con múltiples ventajas al tener un control preciso y prolongado sobre la concentración del fármaco en el sitio de la infección.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los MIPs realizados con AL y AM como monómeros y CPX como plantilla, alcanzan la CMI necesaria para eliminar a *S. aureus* y *E. coli*, esto demuestra la utilidad que puede presentar en el tratamiento de pacientes con infecciones en PD.

7.9. CITOTOXICIDAD

La viabilidad celular, en términos de actividad metabólica, se evaluó fibroblastos dérmicos (HDFn) mediante el ensayo de alamarBlue, basado en el uso del poder reductor de las células vivas para convertir la resazurina en resorufina fluorescente (Ortiz et al., 2021). En este trabajo, las células no tratadas y las células tratadas con peróxido de hidrógeno se usaron como controles positivos (100% viables) y controles negativos, respectivamente.

La viabilidad de las células HDFn se evaluó a las 24, 48 y 72 h, se expuso a los extractos de los MIPs de 24, 48 y 72 h. El primer resultado indica que los extractos no presentan citotoxicidad en el tiempo establecido, de hecho, existe un incremento en la viabilidad celular para todos los MIPs evaluados. Con diferencias significativas para los tratamientos de 24 y 48 h de exposición, observando una mayor proliferación a las 72 h.

De acuerdo con la directriz ISO (ISO 10993-5) la viabilidad celular *in vitro* de los dispositivos y materiales médicos después de la exposición debe ser $\geq 70\%$ para que se consideren no citotóxicos (Ahmed et al., 2018). La Organización Internacional de Normalización (ISO) recomienda la evaluación de la biocompatibilidad como un requisito fundamental para el uso seguro de dispositivos y materiales médicos, la prueba de citotoxicidad es una parte integral de la evaluación biológica, que determina la prevalencia del efecto tóxico y también

determina la presencia de una influencia positiva en términos de biofuncionalidad que promueve la cicatrización de heridas (Ahmed et al., 2018). El polímero realizado a partir del ácido láctico (ácido poliláctico), se encuentra aprobado por la Food and Drug Administration de Estados Unidos, demostrando que es un material muy versátil, con propiedades como biocompatibilidad y bidegradabilidad. Debido a esto, el AL se ha explorado en diferentes aplicaciones terapéuticas como vehículo de administración de fármacos (da Silva et al., 2019). Para el caso del AM tiene una alta biocompatibilidad y baja toxicidad aguda, lo que permite su uso en aplicaciones médica (Lebeau et al., 2020).

Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, todos los polímeros evaluados exhibieron viabilidades celulares aceptables de HDFn, al encontrarse por encima del valor establecido por la ISO. Finalmente, pudimos comprobar en el presente trabajo que los MIPs realizados con AL y AM cargados con CPX no son tóxicos para células de HDFn.

7.10. IMPRESIÓN 3D

Como perspectiva de este trabajo, se propuso utilizar la impresión 3D para la elaboración del dispositivo de liberación, por lo que se realizaron diferentes diseños con las medidas. En los primeros diseños se evaluaron mayores tamaños en el 5 mm AB, 2.5 mm DP y proyecciones rectangulares, esféricas y circulares, en este caso las impresiones 3D, correspondían a los diseños realizados en los programas. Posteriormente se disminuyeron los tamaños de 1 mm de AB, 1 mm de DP, 1 y 2 mm de AP y se cambiaron las formas de las proyecciones, además de colocarlas sin espacio entre las proyecciones, lo que se observó fue aglomeración de éstas, la forma no se definió al momento de la impresión. Finalmente, se realizó un último diseño utilizando 1 mm de AB, AP y DP, se utilizó una separación de 2 mm entre proyecciones y con forma cónica, se observó una forma bien definida, sin aglomeraciones ni defectos en la impresión.

Para evaluar la impresión utilizando los MIPs y la mezcla de polimerización, ambos se mezclaron con la resina, se utilizó el diseño de 1 mm de AB, AP y DP, separación de 2 mm entre proyecciones y forma cónica. Para la mezcla de resina con MIP, la impresión se realizó con defectos en la forma de las proyecciones y para el caso de la resina con la mezcla de polimerización, no se observaron defectos en la forma. Para comprobar la presencia y liberación del CPX en ellos, se mantuvo

durante 1 h en agitación constante sumergidos en metanol y agua, al analizar las muestras solo se encontró CPX liberado en el cromatograma de resina con mezcla de polimerización en metanol con una concentración de 0.99 mg L^{-1} .

8. CONCLUSIÓN

Recientemente, los polímeros impresos molecularmente han ganado espacio en su uso para la liberación de fármacos, gracias a su capacidad de carga y afinidad con el fármaco utilizado como molde. Además, el tiempo de liberación del fármaco puede controlarse al ajustarse el tipo o la fuerza de las interacciones entre las moléculas del fármaco y los monómeros. En este estudio, se lograron sintetizar y caracterizar polímeros de impresión molecular capaces de liberar de forma controlada un antibiótico (ciprofloxacino) en concentraciones eficaces para alcanzar la CMI frente *S. aureus* y *E. coli*. Además, se comprobó su seguridad al evaluarlos frente a fibroblastos dérmicos e incluso permitieron la proliferación celular de forma significativa en la mayoría de los ensayos.

A pesar de que, los usos clínicos de los polímeros de impresión molecular utilizando antimicrobianos siguen siendo escasos. Se espera que el uso de estos materiales en el área médica continúe generando innovaciones adaptadas al tratamiento antimicrobiano local que sea eficaz, compatible con el paciente y rentable. Las limitaciones que se presentan en este trabajo, es el tiempo de liberación evaluado del CPX en los MIPs, la evaluación en pH en condiciones homeostáticas y no el pH característico de heridas y el uso de cepas ATCC. Por lo que, dentro de las perspectivas de este trabajo, se encuentra la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* con microorganismos aislados de pacientes con infecciones de PD. La evaluación de la permeación utilizando piel, así como, en heridas de modelos animales para comprobar su actividad antimicrobiana y biocompatibilidad. Finalmente, hacer uso de la impresión 3D para la elaboración de dispositivos de liberación.

9. REFERENCIAS

- Ahmed, A., Alvi, S. A., Aftab, I. B., & Akhtar, F. (2021). Bacterial diversity with emerging antimicrobial resistance of diabetic foot ulceration and current detection techniques: A review. In *Electronic Journal of General Medicine* (Vol. 18, Issue 6). Modestum LTD. <https://doi.org/10.29333/ejgm/11303>
- Ahmed, A., Getti, G., & Boateng, J. (2018). Ciprofloxacin-loaded calcium alginate wafers prepared by freeze-drying technique for potential healing of chronic diabetic foot ulcers. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(6), 1751–1768. <https://doi.org/10.1007/S13346-017-0445-9/FIGURES/9>
- Alavi, A., Sibbald, R. G., Mayer, D., Goodman, L., Botros, M., Armstrong, D. G., Woo, K., Boeni, T., Ayello, E. A., & Kirsner, R. S. (2014). CONTINUING Diabetic foot ulcers Part I. Pathophysiology and prevention. *Journal of American Dermatology*, 70(1), 1.e1-1.e18. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.06.055>
- Belbruno, J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews*, 119(1), 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- Bhawani, S. A., Sen, T. S., & Mohammad Ibrahim, M. N. (2018). Synthesis of molecular imprinting polymers for extraction of gallic acid from urine. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13065-018-0392-7/TABLES/2>
- Bokan, V. (2010). RISK FACTORS FOR DIABETIC FOOT ULCERATION-FOOT DEFORMITY AND NEUROPATHY. *Acta Medica Medianae*, 49, 19–22.
- Boulton, A. J. M., & Rayman, G. (2020). *The Foot in Diabetes*.
- Brudno, Y., & Mooney, D. J. (2015). On-demand drug delivery from local depots. *Journal of Controlled Release*, 219, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.011>
- Brunton, L. L., Lazo, L. S., & Parker, K. L. (2007). *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la TERPÉUTICA*.
- Bulton, A. J. M., Rayman, G., & Wukich, D. K. (2020). *The Foot in Diabetes* (5th ed.). [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=mEXYDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA15&dq=Boulton,+A.+J.+M.,+%26+Rayman,+G.+\(2020\).+The+Foot+in+Diabetes+.&ots=jO45BITYao&sig=DCWiajz-beTXD2Skspvfc-In-EE#v=onepage&q=Boulton%2C%20A.%20J.%20M.%2C%20%26%20Rayman%2C%20G.%20\(2020\).%20The%20Foot%20in%20Diabetes%20.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=mEXYDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA15&dq=Boulton,+A.+J.+M.,+%26+Rayman,+G.+(2020).+The+Foot+in+Diabetes+.&ots=jO45BITYao&sig=DCWiajz-beTXD2Skspvfc-In-EE#v=onepage&q=Boulton%2C%20A.%20J.%20M.%2C%20%26%20Rayman%2C%20G.%20(2020).%20The%20Foot%20in%20Diabetes%20.&f=false)
- CENETEC. (2020). Prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación del pie diabético. *Guías de Práctica Clínica*, 301.
- Cervantes-García, E., & Salazar-Schettino, P. M. (2017). Clinical and surgical characteristics of infected diabetic foot ulcers in a tertiary hospital of Mexico. *Diabetic Foot and Ankle*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/2000625X.2017.1367210>
- Cheong, W. J., Yang, S. H., & Ali, F. (2013). Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. *Journal of Separation Science*, 36(3), 609–628. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201200784>
- da Silva, J., Jesus, S., Bernardi, N., Colaço, M., & Borges, O. (2019). Poly(D, L-lactic Acid) nanoparticle size reduction increases its immunotoxicity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00137>
- De, F., Quimicas, C., Pérez-Conde, C., & Trujillo, E. T. (2009). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID POLIMEROS DE IMPRESION MOLECULAR PARA LA DETERMINACION DE INSECTICIDAS MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR Carmen del Cacho Vicente Bajo la dirección de los doctores.
- de León-Martínez, L. D., Rodríguez-Aguilar, M., Ocampo-Pérez, R., Gutiérrez-Hernández, J. M., Díaz-Barriga, F., Batres-Esquivel, L., & Flores-Ramírez, R. (2018). Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Metronidazole in Water Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(3), 395–401. <https://doi.org/10.1007/S00128-017-2249-5/TABLES/1>
- ENSANUT. (2020). ENSANUT, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Resultados 2018 San Luis Potosí. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- He, S., Zhang, L., Bai, S., Yang, H., Cui, Z., Zhang, X., & Li, Y. (2021). Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery. *European Polymer Journal*, 143(December 2020), 110179. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110179>
- Hernández, A. E. M., Álvarez, J. A., de Vaca, F. C., Cuevas, A., Ramírez, A. J., Ramírez, W. A., & Sifuentes-Osornio, J. (2011). Microbiología del pie diabético: ¿es útil el cultivo tomado con hisopo? *Gaceta Medica de Mexico*, 147(2), 117–124.
- INEGI. (2021). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES (14 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>

- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
- Kasznicki, J. (2014). *State of the art paper Advances in the diagnosis and management of diabetic distal symmetric polyneuropathy*. <https://doi.org/10.5114/aoms.2014.42588>
- Kearney, C. J., & Mooney, D. J. (2013). Macroscale delivery systems for molecular and cellular payloads. *Nature Materials*, 12(11), 1004–1017. <https://doi.org/10.1038/nmat3758>
- Kioomars, S., Heidari, S., Malaekheh-Nikouei, B., Shayani Rad, M., Khameneh, B., & Mohajeri, S. A. (2017). Ciprofloxacin-imprinted hydrogels for drug sustained release in aqueous media. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(1), 122–129. <https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1230131>
- Lebeau, J., Efromson, J. P., & Lynch, M. D. (2020). A Review of the Biotechnological Production of Methacrylic Acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
- Lipsky, B. A., Holroyd, K. J., & Zasloff, M. (2008). Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: A randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clinical Infectious Diseases*, 47(12), 1537–1545. <https://doi.org/10.1086/593185>
- Lipsky, B. A., Peters, E. J. G., Senneville, E., Berendt, A. R., Embil, J. M., Lavery, L. A., Urbančič-Rovan, V., & Jeffcoate, W. J. (2012). Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(1), 163–178. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Low, P. A., Benrud-Larson, L. M., Sletter, D. M., Opfer-Gehrking, T. L., Weigand, S. D., O'Brien, P. C., Suarez, G. A., & Dyck, P. J. (2004). *Autonomic Symptoms and Diabetic*. 27(12), 2942–2947.
- Lusina, A., & Cegłowski, M. (2022). Molecularly Imprinted Polymers as State-of-the-Art Drug Carriers in Hydrogel Transdermal Drug Delivery Applications. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 640, 14(3), 640. <https://doi.org/10.3390/POLYM14030640>
- Markakis, K., Faris, A. R., Sharaf, H., Faris, B., Rees, S., & Bowling, F. L. (2018). Local Antibiotic Delivery Systems: Current and Future Applications for Diabetic Foot Infections. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 17(1), 14–21. <https://doi.org/10.1177/1534734618757532>
- Márquez-Godínez, S. A., Zonana-Nacach, A., Anzaldo-Campos, M. C., & Muñoz-Martínez, J. A. (2014). Riesgo de pie diabético en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en una unidad de medicina de familia. *Semergen*, 40(4), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.semern.2013.10.004>
- Mayer, A. G., & Whitcombe, M. J. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1742–1778. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.07.011>
- Meléndes-Marmolejo, J., León-Martínez, L., Galván Romero, V., Villarreal-Lucio, S., Ocampo-Pérez, R., Medellín-Castillo, N. A., Padilla-Ortega, E., Rodríguez-Torres, I., & Flores-Ramírez, R. (2022). Design and application of molecularly imprinted polymers for adsorption and environmental assessment of anti-inflammatory drugs in wastewater samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 45885–45902.
- Meléndez, J., García, Y., Galván, V., Díaz de León, L., Vargas, K., Mejía, J., & Flores, R. (2020, June 15). *Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. Nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en América Latina | Revista de Salud Ambiental*. <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/1033>
- Ndunda, E. N. (2020). Molecularly imprinted polymers—A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect: A mini review. *Journal of Molecular Recognition*, 33(11), e2855. <https://doi.org/10.1002/JMR.2855>
- OPS/OMS. (2018). *Enfermedades no transmisibles - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. OPS. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles>
- Organización Mundial de la Salud. (2021, April 13). *Diabetes*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Ortiz, S. L., Lugo, V. R., Salado-Leza, D., Reyes-Valderrama, M. I., Alcántara-Quintana, L. E., González-Martínez, P., & Anaya, D. M. (2021). Dy2O3-unpurified hydroxyapatite: a promising thermoluminescent sensor and biomimetic nanotherapeutic. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 127(12). <https://doi.org/10.1007/s00339-021-05010-w>
- Osman, N., Devnarain, N., Omolo, C. A., Fasiku, V., Jaglal, Y., & Govender, T. (2022). Surface modification of nano-drug delivery systems for enhancing antibiotic delivery and activity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(1), e1758. <https://doi.org/10.1002/WNAN.1758>

- Pavón Núñez, D., Cárcamo Mejía, S., Flores Moreno, R., Nuñez Palma, J., Chacón, J. J., Mendoza Talavera, A., Erazo Coello, A., Ortiz Avilés, G., Mejía Rodríguez, C., Álvarez, G., & Bermudez Lacayo, J. (2016). Caracterización de los pacientes con pie diabético atendidos en el instituto nacional del diabético. *Revista Hispanoamericana de Ciencias de La Salud (RHCS)*, ISSN-e 2215-4256, Vol. 2, Nº. 3, 2016 (Ejemplar Dedicado a: Julio-Setiembre 2016), Págs. 215-222, 2(3), 215–222.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5742052>
- Pérez-Moral, N., & Mayes, A. G. (2004). Noncovalent imprinting in the shell of core-shell nanoparticles. *Langmuir*, 20(9), 3775–3779.
<https://doi.org/10.1021/LA0356755/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA0356755N00001.GIF>
- Perner, A., Nielsen, S. E., & Rask-Madsen, J. (2003). High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Medicine*, 29(4), 642–645.
<https://doi.org/10.1007/s00134-002-1628-4>
- Price, B. L., Morley, R., Bowling, F. L., Lovering, A. M., & Dobson, C. B. (2020). Susceptibility of monomicrobial or polymicrobial biofilms derived from infected diabetic foot ulcers to topical or systemic antibiotics in vitro. *PLOS ONE*, 15(2), e0228704.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228704>
- Ramírez-Acuña, J. M., Cardenas-Cadena, S. A., Marquez-Salas, P. A., Garza-Veloz, I., Perez-Favila, A., Cid-Baez, M. A., Flores-Morales, V., & Martínez-Fierro, M. L. (2019). Diabetic Foot Ulcers: Current Advances in Antimicrobial Therapies and Emerging Treatments. *Antibiotics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8040193>
- Redlich, & Peterson. (1958). hydrochloric acid was then filtered through the fritted glass. Following this a 9.3. *Notes*, 63(1955), 1958.
- Rogers, L. C., Frykberg, R. G., Armstrong, D. G., Boulton, A. J. M., Edmonds, M., Van, G. H., Hartemann, A., Game, F., Jeffcoate, W., Jirkovska, A., Jude, E., Morbach, S., Morrison, W. B., Pinzur, M., Pitocco, D., Sanders, L., Wukich, D. K., & Uccioli, L. (2011). *The Charcot Foot in Diabetes*. 101(5), 437–446.
- Salguero, Y., Valenti, L., Rojas, R., & García, M. C. (2020). Ciprofloxacin-intercalated layered double hydroxide-in-hybrid films as composite dressings for controlled antimicrobial topical delivery. *Materials Science and Engineering C*, 111.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110859>
- Secretaría de Salud (SS). (2013). GPC-RR, Manejo Integral del Pie Diabético. ISSSTE-679-13. In *Guía de practica clinica* (p. 16).
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/ISSSTE_679_13_Piediabetico/GRR679.pdf
- Smith, R., Russo, J., Fiegel, J., & Brogden, N. (2020). Antibiotic Delivery Strategies to Treat Skin Infections When Innate Antimicrobial Defense Fails. *Antibiotics 2020*, Vol. 9, Page 56, 9(2), 56. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9020056>
- Suede, R. (2013). The Use of Molecularly Imprinted Polymers for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 04(08). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000264>
- Suhaeri, M., Noh, M. H., Moon, J. H., Kim, I. G., Oh, S. J., Ha, S. S., Lee, J. H., & Park, K. (2018). Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics*, 8(18), 5025. <https://doi.org/10.7150/THNO.26837>
- Tamahkar, E., Bakhshpour, M., & Denizli, A. (2019). Molecularly imprinted composite bacterial cellulose nanofibers for antibiotic release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(6), 450–461. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1580665>
- Tanner, J., Padley, W., Assadian, O., Leaper, D., Kiernan, M., & Edmiston, C. (2015). Do surgical care bundles reduce the risk of surgical site infections in patients undergoing colorectal surgery? A systematic review and cohort meta-analysis of 8,515 patients. *Surgery*, 158(1), 66–77. <https://doi.org/10.1016/J.SURG.2015.03.009>
- Tesfaye, S., Boulton, A. J. M., Dyck, P. J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P., Lauria, G., Malik, R. A., Spallone, V., Vinik, A., Bernardi, L., Valensi, P., Albers, J. W., Amarengo, G., Anderson, H., Arezzo, J., Backonja, M. M., Biessels, G. J., Bril, V., ... Jones, T. (2010). Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*, 33(10), 2285–2293. <https://doi.org/10.2337/dc10-1303>
- Turiel, E., & Esteban, A. M. (2020). Molecularly imprinted polymers. *Solid-Phase Extraction*, 215–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00008-X>
- Vardakas, K. Z., Horianopoulou, M., & Falagas, M. E. (2008). Factors associated with treatment failure in patients with diabetic foot infections: An analysis of data from randomized controlled trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 80(3), 344–351.
<https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2008.01.009>

- Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.15.69*, 10(11), 1743–1750.
<https://doi.org/10.2217/FMB.15.69>
- Wending, S., & Beadle, V. (2015). The relationship between self-efficacy and diabetic foot self-care. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 2(1), 37–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jcte.2015.01.001>
- Zaidi, S. A. (2016). Latest trends in molecular imprinted polymer based drug delivery systems _ Enhanced Reader. *RSC Advances*, 6, 88807–88819.
- Zhang, L. P., Tan, X. X., Huang, Y. P., & Liu, Z. S. (2018). Floating liquid crystalline molecularly imprinted polymer coated carbon nanotubes for levofloxacin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 150–158.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.012>
- Zubair, M., Ahmad, J., Malik, A., & Talluri, M. R. (2021). *Diabetic Foot Ulcer*.