

Actividad del (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona en presencia del poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona) sobre un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* productor de β -lactamasas

Tatiana Arenas Fernández¹, Cristina Lucía Mora Arango², Constain Hugo Salamanca³, María Consuelo Jaramillo Flórez²

RESUMEN

Introducción: debido a la problemática actual de fármaco-resistencia hacia los antibióticos β -lactámicos, se ha hecho necesario, en busca de una solución, trabajar con nuevas moléculas con potencial farmacológico, así como utilizar novedosos sistemas poliméricos como matrices o excipientes farmacéuticos.

Objetivo: evaluar la actividad antibiótica de la ampicilina, combinada con un compuesto sintético de tipo chalcona, denominado (2E)-3-(2,3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona, sobre un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilinas, en presencia de una matriz polimérica hidrosoluble denominada poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona).

Materiales y métodos: el compuesto sintético y la matriz polimérica se obtuvieron por métodos descritos en la literatura. Se usó un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilinas y se hicieron ensayos de actividad antibiótica por la técnica de macrodilución en caldo, de la cual se obtuvieron las concentraciones inhibitoras mínimas de los compuestos evaluados.

Resultados: la mezcla ampicilina-chalcona muestra un efecto antibiótico menor que el de su referente ampicilina-sulbactam. No obstante, cuando se utiliza la matriz polimérica en combinación con la ampicilina-chalcona se aprecia un incremento significativo de la actividad antibiótica, evidenciado en que la concentración inhibitora mínima es la mitad de la del referente comercial.

PALABRAS CLAVE

β -Lactamasas; Chalcona; Farmacorresistencia Bacteriana; Staphylococcus aureus

¹ Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Investigación NATURA. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Icesi. Santiago de Cali, Colombia.

Correspondencia: Constain H. Salamanca; chsalamanca@icesi.edu.co

Recibido: noviembre 10 de 2010

Aceptado: octubre 03 de 2011

SUMMARY

Activity of (2E)-3-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-(4-methylphenyl) prop-2-en-1-ona in the presence of poli(maleic acid-co-2-vinyl-pyrrolidone) on a β -lactamase producing clinical isolate of *Staphylococcus aureus*

Introduction: Due to the current problem of resistance to β -lactam antibiotics, it has become necessary, in search of a solution, to work with new molecules with pharmacological potential, and to use novel polymeric systems as matrices or pharmaceutical excipients.

Objective: To evaluate the antibiotic activity of ampicillin combined with a synthetic chalcone-type compound, the (2E)-3-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-(4-methylphenyl) prop-2-en-1-one, on a clinical isolate of penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the presence of a water soluble polymer matrix known as poly(maleic acid-co-2-vinyl-pyrrolidone).

Materials and methods: The synthetic compound and the polymeric matrix were obtained by previously described methods. Tests for antibiotic activity against the strain of penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were done by the broth dilution technique which provided the minimal inhibitory concentrations of the compounds tested.

Results: The chalcone-ampicillin mix shows lesser antibiotic effect than the ampicillin-sulbactam used as referent. However, when such mix is combined with the polymer matrix, antibiotic activity significantly increases as evidenced by decrease in the minimal inhibitory concentration with respect to the ampicillin-sulbactam referent.

KEY WORDS

β -Lactamases; Bacterial Drug Resistance; Chalcone; Staphylococcus aureus.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los grandes problemas mundiales de salud es la aparición de resistencia bacteriana a diversos antibióticos. Específicamente,

para el caso de los β -lactámicos el fenómeno de la fármaco-resistencia está relacionado con la producción de enzimas hidrolíticas de tipo β -lactamasas, que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico lo que lleva a pérdida de la actividad biológica que se traduce en falla terapéutica; esta última es más relevante cuando sucede con los antibióticos β -lactámicos más convencionales, como la ampicilina y la amoxicilina, que son fármacos de amplia utilización y bajo costo (1-3). Con el ánimo de solucionar dicha problemática se han venido desarrollado nuevas estrategias terapéuticas, consistentes en el empleo simultáneo de antibióticos convencionales con algún inhibidor irreversible de las β -lactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam (4). No obstante, las combinaciones de antibióticos con inhibidores enzimáticos también han venido perdiendo eficacia terapéutica por la aparición de nuevas cepas productoras de β -lactamasas resistentes a dichos inhibidores (5-10).

Entre los microorganismos que han mostrado la capacidad de generar una resistencia a estos antibióticos β -lactámicos se encuentra *Staphylococcus aureus*, que motiva nuestro estudio, porque se ha convertido en un problema mundial de salud pública, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, cuyos pacientes son los más vulnerables a septicemias y abscesos cutáneos (11,12). En las últimas dos décadas se ha informado que en Estados Unidos la incidencia de sepsis causada por dicho microorganismo pasó de 164.000 casos (82,7 por cada 100.000 habitantes) a 660.000 casos (240,4 por cada 100.000 habitantes) (13). Por otro lado, en Europa han informado aumento en la morbimortalidad por bacteriemiias ocasionadas por dicho microorganismo, que pasó de 2% en 1990 a 40% en 2004 (14). En Colombia, el asunto no es tan preocupante porque la mayoría de los contagios con este microorganismo no se adquieren en los hospitales sino en la comunidad; de los 68 casos de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) reportados entre 2006 y 2009, solo al 37% se les comprobó contagio intrahospitalario (15).

De acuerdo con lo anterior, es obvio que se deben buscar alternativas nuevas y mejores para tratar de solucionar el problema; entre ellas se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas con mayor potencial antibiótico frente a microorganismos resistentes

o capaces de inhibir las β -lactamasas. Otras opciones son el mejoramiento de las características fisicoquímicas de los fármacos ya existentes y la bioprotección por fenómenos de asociación con matrices macromoleculares biocompatibles. Una estrategia novedosa de investigación es asociar fármacos con sistemas poliméricos hidrosolubles con capacidad de autoorganizarse en solución acuosa generando microdepósitos y nanodepósitos, en los que es posible incorporar moléculas farmacológicas, a partir de la asociación o solubilización en pseudofases poliméricas, que proporcionan un efecto de barrera física frente a los sistemas enzimáticos. En numerosos estudios se han utilizado diversos sistemas poliméricos asociados a fármacos, mejorando la solubilidad de estos en medios acuosos y, con ello, su estabilidad fisicoquímica y biológica (16-32). Por otra parte, cabe destacar los copolímeros derivados del ácido maleico con vinil olefinas (33) y vinil-2-pirrolidona (34), que han mostrado la capacidad de formar pseudofases poliméricas en solución acuosa, en las que se han incorporado moléculas farmacológicas de tipo nitroimidazoles, mejorando las características fisicoquímicas de solubilidad de dichos agentes farmacológicos en medios acuosos.

Es necesario hacer estudios enfocados en la evaluación de la potencialidad antibiótica de nuevas moléculas farmacológicas frente a microorganismos resistentes, así como en evaluar nuevas estrategias que permitan modular las características fisicoquímicas de los fármacos en medios biológicos por medio de sistemas poliméricos hidrofílicos con capacidad de generar microdepósitos y nanodepósitos en solución acuosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos químicos

Se utilizaron los siguientes compuestos: solución de yodo/ yoduro de potasio al 2% (Sigma®); solución de almidón al 1% (Carlo Erba®); ampicilina en polvo para inyectables (Gen Far®) (010108); ampicilina/sulbactam en solución inyectable (Pfizer®) (72639270-2R) y agar Mueller-Hinton (VL379337 507) (Merck®). Por otro lado, la chalcona (2*E*)-3-(2,3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona (35) y el polímero biocompatible poli(ácido maleico-co-vinil-2-pirrolidona) abreviado como P(MAcoVP) con $M_w = 25.000$ (34,36), se sintetizaron y caracterizaron de acuerdo con la metodología previamente reportada (34-36). Las estructuras de la ampicilina, el sulbactam, la chalcona y el polímero se muestran en la figura 1.

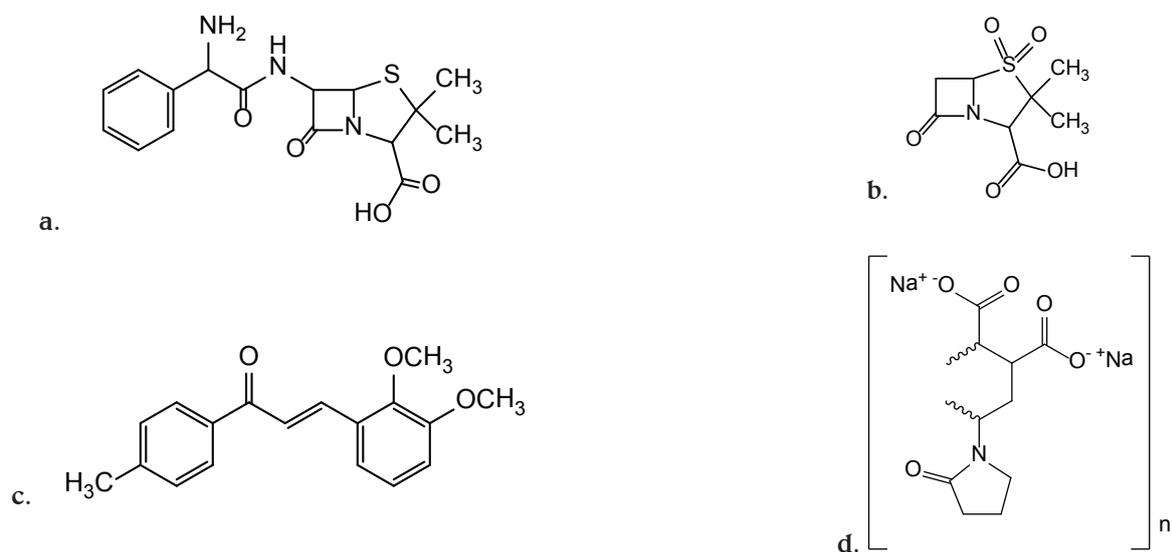


Figura 1. a. Estructura química de la ampicilina. b. Estructura química del sulbactam. c. Estructura química de la chalcona (2*E*)-3-(2,3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona d. Estructura comonomérica de la sal disódica del poli(ácido maleico-co-vinil-2-pirrolidona)

Microorganismos

El aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* productor de β -lactamasa (aislamiento 1) provino del Hospital la Merced de Ciudad Bolívar, Antioquia. Utilizamos como controles las siguientes cepas: control negativo (aislamiento 2): aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* sensible a penicilinas; control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213® productor de β -lactamasas.

Caracterización del aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente

El aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente (aislamiento 1) se tipificó microbiológicamente mediante antibiogramas. Luego se determinó su sensibilidad a las penicilinas antiestafilocócicas por la técnica de difusión con un disco que contenía 1 μ g

de oxacilina (37). Finalmente, se determinó la presencia de β -lactamasas mediante la prueba colorimétrica con yodo (38).

Determinación de la concentración inhibidora mínima

La concentración inhibidora mínima (CIM) de los compuestos en estudio se determinó por el método de macrodilución en caldo (38). Cada ensayo se evaluó en un rango de concentraciones comprendido entre 12 μ g/mL y 3.200 μ g/mL, obtenidas a partir de diluciones seriadas. El tiempo de incubación de cada ensayo fue de 18 horas a $35 \pm 0,1$ °C. Se utilizaron los controles negativo y positivo ya descritos. Cada ensayo se hizo por triplicado y los datos se analizaron estadísticamente, mediante el *software GraphPadPrisma* 5.0. Las condiciones de cada ensayo se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de los ensayos antimicrobianos con la cepa de *S. aureus* productoras de β -lactamasa (aislamiento 1)

Ensayo	Componentes	Proporción de los componentes de la mezcla	Tipo de mezcla
1	Ampicilina	-	Homogénea
2	P(MAcoVP)	-	Homogénea
3	Ampicilina + sulbactam	2:1	Homogénea
4	Ampicilina + chalcona	2:1	Heterogénea
5	Ampicilina + P(MAcoVP)	1:1	Homogénea
6	Ampicilina + sulbactam + P(MAcoVP)	2:1:2	Homogénea
7	Ampicilina + chalcona + P(MAcoVP)	2:1:2	Heterogénea

* El medio de dispersión utilizado para la evaluación de los compuestos solos y en mezclas fue una solución buffer de fosfato con pH 7,3 y concentración de 0,1M

RESULTADOS

Caracterización del aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente

Los antibiogramas hechos mediante la técnica de sensidiscos permitieron tipificar el aislamiento clínico como IV C R, lo cual indica que se trata de una cepa resistente a antibióticos β -lactámicos.

Por otro lado, el ensayo de difusión con disco de oxacilina permitió comprobar la ausencia de la proteína de membrana PBP2a y con ello descartar que el mecanismo de resistencia del microorganismo se deba exclusivamente a la producción de β -lactamasas. Finalmente, la prueba colorimétrica con yodo permitió asegurar que el aislamiento clínico corresponde a una cepa productora de β -lactamasas.

Determinación de la concentración inhibidora mínima

Los resultados de la concentración inhibidora mínima de cada compuesto evaluado por el método de macrodilución en caldo se muestran en la tabla 2.

Se puede observar en la tabla 2 que la ampicilina sola presenta una CIM de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, mientras que combinada con el inhibidor de β -lactamasas sulbactam, se produce una disminución de la CIM a la mitad. Por otro lado, la combinación ampicilina-

chalcona presenta una CIM de 1.500 $\mu\text{g/mL}$, muy similar a la de la ampicilina sola. La adición de la matriz polimérica a la combinación ampicilina-sulbactam no produce un cambio significativo en la CIM, mientras que dicha matriz añadida a la combinación ampicilina-chalcona sí logra una disminución significativa: la CIM pasa de 1.600 $\mu\text{g/mL}$ a 400 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, se observa que la matriz polimérica también presenta un efecto sobre la cepa de *S.aureus* con un valor de CIM de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, similar al de la ampicilina sola.

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias mínimas para un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilinas

Compuesto	CIM* ($\mu\text{g/mL}$)	DE†
Ampicilina	1.600	-
P(MAcoVP)	1.600	-
Ampicilina/sulbactam	800	-
Ampicilina/chalcona	1.500	0,00431
Ampicilina/polímero	1.600	0,00327
Ampicilina/sulbactam/polímero	800	-
Ampicilina/chalcona/polímero	400	0,00351

*CIM: Concentración inhibidora mínima; †DE: Desviación estándar

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la ampicilina combinada con la chalcona presenta un efecto de inhibición sobre el aislamiento clínico resistente similar al que presenta ella sola, y que este es prácticamente la mitad del que se obtiene con su referente sulbactam.

Si se compara el efecto inhibitorio del sulbactam con el de la chalcona sobre las β -lactamasas, se podría pensar que la última carece de él y que, por ello, no se observa una acción antibiótica. No obstante, si se compara la estructura química de la chalcona con la del sulbactam (figura 1), se observa que la primera presenta mayor cantidad de grupo funcionales apolares que el segundo, por lo que la chalcona resulta ser menos soluble que el sulbactam en medios acuosos en las condiciones en que se hicieron dichas mezclas. Este hecho se evidenció en el momento de hacer las mezclas de ampicilina y chalcona en

medio acuoso, porque se observó la formación de un sistema heterogéneo y no homogéneo como sí ocurrió con la mezcla ampicilina-sulbactam. Esta incapacidad de la chalcona para formar un sistema homogéneo lleva a que no se encuentre tan disponible en la fase acuosa, razón por la cual no provocaría un efecto inhibitorio significativo sobre el aislamiento clínico evaluado, como sí lo hace el sulbactam que es mucho más polar y está más disponible en el medio acuoso. Este análisis adquiere mayor validez cuando se compara el efecto inhibitorio de las mezclas ampicilina-sulbactam y ampicilina-chalcona en presencia de la matriz polimérica hidrosoluble: se observa que dicha matriz tiene una notoria influencia sobre el efecto antibiótico de la mezcla ampicilina-chalcona y no sobre la mezcla ampicilina-sulbactam (tabla 2). Esta diferencia se puede fundamentar en la capacidad que tiene la matriz polimérica de formar pseudofases de menor polaridad que la que exhibe

el medio acuoso. Al respecto, se ha encontrado que los copolímeros de vinilpirrolidona con ácido maleico generan en la región interfásial polímero-solvente unas zonas específicas de baja polaridad o pseudofases hidrófobas, en las que es posible anclar o unir moléculas de baja polaridad y así mejorar la solubilidad de dichas moléculas apolares en medios acuosos (34). En relación con estos efectos de asociación polimérica se ha descrito previamente para macromoléculas, correspondientes a homopolímeros de vinil-2-pirrolidona, una alta capacidad de retener diversos sustratos orgánicos mediante un proceso de adsorción similar al de Langmuir, en el que en cada sitio de adsorción participan alrededor de diez unidades monoméricas de vinilpirrolidona (39). Por lo tanto, si se analizan los resultados de la CIM de la mezcla ampicilina-chalcona en ausencia y presencia de la matriz polimérica, se puede observar un aumento significativo de la actividad antibiótica, pasando de una CIM de 1.500 $\mu\text{g/mL}$ a una de 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esta notable disminución en la CIM se puede explicar en términos de la interacción de la chalcona con la pseudofase polimérica, la cual le confiere una mayor solubilidad en el medio acuoso y, con esto, que se encuentre más disponible para producir un efecto farmacológico. Por otro lado, se observa que la matriz polimérica no ejerce un efecto sobre la mezcla ampicilina-sulbactam. Este resultado se puede explicar si se tiene en cuenta que dicha mezcla corresponde a un sistema homogéneo en las condiciones del ensayo. En este sentido, ambas moléculas ya se encuentran completamente distribuidas en la fase acuosa y no necesitan la pseudofase polimérica para incrementar su solubilidad, como sí lo hace la chalcona que es menos soluble en el medio acuoso. Finalmente, cabe mencionar que la matriz polimérica también mostró un efecto inhibitorio sobre el aislamiento clínico, lo cual ha sido reportado para polímeros iónicos de esta naturaleza.

CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran la potencialidad farmacológica de la chalcona frente a cepas de microorganismos resistentes. No obstante, se hace necesario buscar un mejoramiento de sus características fisicoquímicas que le permita aumentar

su solubilidad en medios acuosos, porque existe una dependencia directa entre dicha solubilidad y su capacidad para provocar un efecto antibiótico. Por otro lado, la matriz polimérica, como sistema reservorio de la chalcona, también se mostró promisorio como posible excipiente para el futuro desarrollo de medicamentos con potencial de aplicación en el tratamiento de infecciones por cepas resistentes. Sin embargo, cabe resaltar que son necesarios más estudios para tener una mejor descripción del proceso de asociación de las moléculas evaluadas en dichas matrices poliméricas en solución acuosa. Por ejemplo, es necesario evaluar los coeficientes de asociación en medio acuoso y las variaciones en las solubilidades intrínsecas a las condiciones de estudio. Además, se hace necesario determinar la biocompatibilidad de esta matriz polimérica mediante estudios de citotoxicidad. Finalmente, es preciso evaluar el efecto de la mezcla ampicilina-chalcona en presencia y ausencia de la matriz polimérica sobre las β -lactamasas para poder plantear su potencialidad como un inhibidor específico de las mismas como lo son el sulbactam y el ácido clavulánico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto CIQF-097; a Colciencias, al Hospital la Merced de Ciudad Bolívar por proporcionar el aislamiento clínico β -lactamasa-resistente; a los grupos de investigación de la universidad de Antioquia GRIPE y GDCON, y al doctor Andrés Olea, de la Universidad Andrés Bello de Santiago de Chile, por el apoyo en la síntesis y caracterización de la matriz polimérica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jul 29;57(10):1451-70.
2. Miller EL. The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health.* 2002;47(6):426-34.
3. Livermore DM, Warner M, Hall LM, Enne VI, Projan SJ, Dunman PM, et al. Antibiotic resistance in bacte-

- ria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ Microbiol*. 2001 Oct;3(10):658-61.
4. Page MGP. β -Lactamase inhibitors. *Drug Resist Updat*. 2000 Apr;3(2):109-125.
 5. Finlay J, Miller L, Poupard JA. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):18-23.
 6. Vilar M, Galleni M, Solmajer T, Turk B, Frère JM, Magtane A. Kinetic study of two novel enantiomeric tricyclic beta-lactams which efficiently inactivate class C beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Aug;45(8):2215-23.
 7. Yang Z, Niu Y, Le Y, Ma X, Qiao C. Beta-lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei*. *Phytomedicine*. 2010 Feb;17(2):139-41.
 8. Powers RA, Morandi F, Shoichet BK. Structure-based discovery of a novel, noncovalent inhibitor of AmpC beta-lactamase. *Structure*. 2002 Jul;10(7):1013-23.
 9. Perumal SK, Adediran SA, Pratt RF. Beta-ketophosphonates as beta-lactamase inhibitors: Intramolecular cooperativity between the hydrophobic subsites of a class D beta-lactamase. *Bioorg Med Chem*. 2008 Jul 15;16(14):6987-94.
 10. Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Colom K, Cisterna R. Non-radioactive PCR-SSCP with a single PCR step for detection of inhibitor resistant beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*. 2002 Jun;50(1):85-90.
 11. Guss J, Kazahaya K. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired pediatric neck abscesses. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Jun;71(6):943-8.
 12. Vandenberg MF, Verbrugh HA. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med*. 1999 Jun;133(6):525-34.
 13. Das I, O'Connell N, Lambert P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. *J Hosp Infect*. 2007 Feb;65(2):117-23.
 14. Bearman GML, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res*. 2005;36(6):646-59.
 15. Yomayusa N, Álvarez CA, Vanegas N, Ibáñez M, Suárez IC, Sossa MP, et al. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina son un problema de salud pública. *Rev.Medica.Sanitas*. 2009;12(3):8-16.
 16. Allen C, Yu Y, Maysinger D, Eisenberg A. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818. *Bioconjug Chem*. 1998;9(5):564-72.
 17. Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 1999;16(1-4):3-27.
 18. Bacu E, Chitanu G, Couture A, Grandclaudeon P, Singurel G, Carpov A. Potential drug delivery systems from maleic anhydride copolymers and phenothiazine derivatives. *European Polymer Journal*. 2002;38(8):1509-1513.
 19. Bronich T, Nehls A, Eisenberg A, Kabanov V, Av K. Novel drug delivery systems based on the complexes of block ionomers and surfactants of opposite charge. *Colloids Surf B*. 1999;(16):243-251.
 20. Discher DE, Eisenberg A. Polymer vesicles. *Science*. 2002 Aug 9;297(5583):967-73.
 21. Duchêne D, Wouessidjewe D, Ponchel G. Cyclodextrins and carrier systems. *J Control Release*. 1999 Nov 1;62(1-2):263-8.
 22. Kabanov AV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2002 Jan;19(1):1-72.
 23. Arora M, Carlesso G, Davidson JM, Domb AJ, Heinrich G, Klüppel M, et al. Filled elastomers: drug delivery system. Springer; 2002.
 24. Kwona GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 1996;21(2):107-116.
 25. Kwon GS. Diblock copolymer nanoparticles for drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1998 Jan;15(5):481-512.
 26. Reviews ADD. Block copolymer micelles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;52(2):167.
 27. Lasic DD. Mixed micelles in drug delivery. *Nature*. 1992 Jan 16;355(6357):279-80.
 28. Lavasanifar A, Samuel J, Sattari S, Kwon GS. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharm Res*. 2002 Apr;19(4):418-22.

29. Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Feb 21;54(2):169-90.
30. Miller DW, Kabanov AV. Potential applications of polymers in the delivery of drugs to the central nervous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 1999;16(1-4):321-330.
31. Salvage JP, Hanlon GW, Phillips GJ, West SL, Lloyd AW, Lobb EJ, et al. Novel biocompatible block copolymers for drug delivery. *J Controlled Release.* 2003;87(1-3):230-233.
32. Kabanov AV, Batrakova EV, Miller DW. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Jan 21;55(1):151-64.
33. Salamanca CH, Barraza RG, Acevedo B, Olea AF. Hydrophobically modified polyelectrolytes as potential drugs reservoirs of n-alkyl-nitroimidazoles. *J. Chil. Chem. Soc.* 2007 Mar;52(1).
34. Salamanca Mejía CH. Estudio de propiedades fisicoquímicas de polieletrólitos aniónicos en solución como potenciales reservorios de sustratos farmacológicos. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2007.
35. Jaramillo MC, Mora C, Vélez LE, Quijano J. Kinetic and theoretical study of the chalcones as inhibitors of beta-lactamase enzyme. *Med Chem.* 2009 Sep;5(5):434-9.
36. Salamanca C, Contreras M, Gamboa C. Partial molar volume of anionic polyelectrolytes in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci.* 2007 May 15;309(2):435-9.
37. Yoshida R, Kuwahara-Arai K, Baba T, Cui L, Richardson JF, Hiramatsu K. Physiological and molecular analysis of a mecA-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Feb;51(2):247-55.
38. Lorian V. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. *Antibiotics in laboratory medicine.* 4th ed. New York: Williams and Wilkins a waverly company; 1996.
39. Lissi E, Abuin E. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and organic phases and pseudophases. *Bol Soc Chil Quim.* 1981;26(1):19-34.

