

Efecto antimicrobiano de vancomicina encapsulada en nanopartículas cationicas de PLGA-mPEG/PEI frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Antimicrobial effect of vancomycin encapsulated in PLGA-mPEG/PEI cationic nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Ortiz O. Keyla¹, Paredes G. Daissy²

Recibido: 04 de agosto de 2023
Aceptado: 21 de noviembre de 2023

Resumen

En las últimas décadas se ha evidenciado que los antibióticos no están produciendo el mismo efecto determinante que cuando fueron originalmente sintetizados, dada la aparición de microorganismos resistentes. Ante esta necesidad, la nanotecnología con aplicaciones médicas surge como una alternativa de sistemas de entrega que permitan mantener o mejorar el efecto antimicrobiano. En este escenario, los polímeros biodegradables, biocompatibles, y no inmunogénicos, como el caso del ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) cobran gran relevancia como sistemas de nanoencapsulamiento. El presente trabajo muestra la síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas con vancomicina mediante doble emulsión solvente-evaporación, su caracterización fisicoquímica, el efecto del agente estabilizante en la síntesis y el efecto antimicrobiano de las mismas frente a SARM. Se obtuvieron nanopartículas poliméricas PLGA-mPEG cargadas de vancomicina de menos de 300nm, de carga positiva

1. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.
Correo electrónico: keylamaydee@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-0678-6879>

2. Docente Investigador, Dirección de Investigación e Innovación, Universidad Santo Tomás.
Correo electrónico: dajul44@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8186-7156>

y estables, con una actividad antimicrobiana frente a SARM comparable con el antibiótico libre.

Palabras clave: nanopartículas poliméricas, nanotecnología, nanopartículas encapsuladas, PLGA, vancomicina, SARM.

Abstract

In recent decades it has become clear that antibiotics are not producing the same determining effect as when they were originally synthesized, considering the emergence of resistant microorganisms. In the face of this necessity, nanotechnology with medical applications emerges as an alternative delivery system that allows maintaining or improving the antimicrobial effect. In this scenario, biodegradable, biocompatible, and non-immunogenic polymers, such as poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), become highly relevant as nanoencapsulation systems. The present work shows the synthesis of polymeric nanoparticles loaded with vancomycin through double solvent-evaporation emulsion, their physicochemical characterization, the effect of the stabilizing agent on the synthesis and their antimicrobial effect against MRSA. Vancomycin-loaded PLGA-mPEG polymeric nanoparticles of less than 300nm, positively charged and stable, with antimicrobial activity against MRSA comparable to the free antibiotic, were obtained.

Keywords: polymeric nanoparticles, nanotechnology, encapsulated nanoparticles, PLGA, vancomycin, MRSA.

Introducción

El uso indiscriminado de antibióticos ha propiciado el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia en microorganismos patógenos, comprometiendo la eficacia de estos agentes (1). A su vez, la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales ha aumentado signi-

ficativamente la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas atribuidas a estos patógenos (2). La prevalencia de infecciones causados por *Staphylococcus aureus*, representan un grave problema de salud pública (3), especialmente en Colombia, donde se ha evidenciado un incremento de las patologías asociadas a esta bacteria (4–6). *S. aureus* ha mostrado disminución en la sensibilidad a

diferentes clases de antibióticos, tales como: fluoroquinolonas, clindamicina, tetraciclina, meticilina, entre otros (7–9). Según las estadísticas, los pacientes colonizados con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) presentan un mayor riesgo de mortalidad que los pacientes colonizados por *S. aureus* sensible a la meticilina (10,11).

La resistencia que han desarrollado los microorganismos a los tratamientos terapéuticos ha despertado un gran interés por la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlos. Se destaca la necesidad de explorar conceptos novedosos y no convencionales en el desarrollo y formulación de medicamentos para superar la crisis global de antibióticos. La nanotecnología biomédica se presenta como una estrategia prometedora para reformular antibióticos establecidos de manera que recuperen su actividad contra patógenos resistentes (12). En este contexto, la nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos nanosistemas de liberación de fármacos, los cuales mejoran la biodisponibilidad, biodistribución y evitan la degradación enzimática del fármaco (13,14). Debido a su tamaño, los nanosistemas de liberación de fármacos pueden superar las barreras fisiológicas, pueden ser modificados y funcionalizados de modo que realicen una entrega más eficiente sobre la diana

biológica y mejorar la interacción con la misma (15,16). Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas poliméricas presentan grandes ventajas debido a sus características fisicoquímicas de tamaño, morfología y carga superficial. Estas características pueden ser controladas de acuerdo con la elección de la matriz polimérica, adición de agentes catiónicos o aniónicos que modifiquen la carga superficial, y por los métodos de síntesis empleados (17,18).

Los polímeros más utilizados para la síntesis de nanopartículas poliméricas son el ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA) y su co-polímero ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA); en general, estos polímeros se caracterizan por ser polímeros biodegradables, biocompatibles, y no inmunogénicos, aprobados por la agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos, FDA (18,19). Sin embargo, se ha demostrado que estos polímeros por ser hidrofóbicos son fácilmente eliminados por el sistema macrófago (20,21). Una de las estrategias para aumentar la permanencia de estos materiales en el sistema biológico es la modificación de las propiedades superficiales de estos polímeros realizando una funcionalización estructural con polímeros de carácter hidrofílico. Entre las modificaciones más comunes está la funcionalización con polietilenglicol (PEG), el

cual es un polímero biocompatible y no inmunogénico; características que le permiten ser usado para aplicaciones biológicas (20,21).

Actualmente, uno de los tratamientos empleados contra infecciones causadas por SARM incluye el uso del antibiótico vancomicina, el cual presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (22). Es por tanto, que la encapsulación de antibióticos se perfila como un nanosistema viable para el mejoramiento de las propiedades del antibiótico y combatir más eficientemente las enfermedades causadas por estos dos patógenos. En este trabajo de investigación, se empleó vancomicina, antibiótico empleado para tratamiento de infecciones causadas por SARM, el cual fue encapsulado en nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico-co-glicólico pegilado (PLGA-mPEG). La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo empleando un agente catiónico para conferir una carga superficial positiva y lograr mejorar la interacción con la membrana celular de la bacteria. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los nanosistemas obtenidos frente a SARM empleando el método de microdilución en caldo.

Materiales y Métodos

Materiales y cepas

El ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA 50:50, PM 38000-54000 Da), poloxámero 407, Poli etilenglicol monometil éter (mPEG, PM 5000 Da), clorhidrato de vancomicina de *Streptomyces orientalis*, polietilenimina (50%(v/v) en solución acuosa, PM 2000), fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St Louis, Missouri). Los medios de cultivo, caldo Muller-Hilton (MH) e infusión cerebro corazón (BHI), fueron obtenidos de Oxoid. D-(+)-glucosa fue obtenida de Merck Novabiochem. El tolueno, diclorometano, acetato de etilo fueron obtenidos de Panreac. Todos los reactivos usados eran de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Agua MilliQ con resistividad de 18.3 MΩ fue usada para la preparación de todas las soluciones. La cepa SARM es un aislado clínico de la Escuela de Bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander.

Síntesis del bloque polimérico PLGA-mPEG

La síntesis del bloque polimérico se llevó a cabo por polimerización en masa fundida usando como catalizador 2-etilhexanoato estañoso siguiendo la metodología encontrada

en la literatura tal como se describe a continuación (21,23). En detalle, 1 gramo de PLGA y 0.2 gramos de mPEG fueron disueltos en 15 mL de tolueno seco, añadiendo como catalizador 2 mg de 2-etilhexanoato estañoso a la solución. La reacción se llevó a cabo a 114 °C en baño de aceite, con agitación a 250 rpm y atmósfera de N₂ durante 8 h en un matraz de tres bocas equipado con agitador magnético y reflujo. Posteriormente, el tolueno fue retirado bajo presión reducida; el sólido obtenido fue disuelto en diclorometano (DCM), para posteriormente añadir la solución orgánica sobre un volumen de agua de 100 mL a esta solución orgánica a 60° C con agitación vigorosa. Finalmente, el sólido fue separado por decantación y secado al vacío durante 3 horas.

Caracterización del bloque polimérico

Se obtuvo el espectro infrarrojo usando un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker-Tensor 27, con celda ATR Platimun A225/Q de cristal de diamante en un ancho espectral entre 4000 y 600 cm⁻¹. El espectro RMN-¹H fue adquirido utilizando un equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker Avance III de 400 MHz equipado con sonda para muestras líquidas usando como solvente CDCl₃ y como patrón interno de referencia TMS. El tratamiento del espectro de RMN-¹H se realizó en el software MestreNova 5.1.1.

Preparación de vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG

De acuerdo con las características hidrofílicas que presenta la vancomicina se eligió el método de doble emulsión solvente- evaporación para la obtención de las nanopartículas tal como se describe a continuación (24). Se tomó un volumen de solución acuosa (A₁) que contenía previamente disuelto el fármaco, se añadió sobre el solvente orgánico que contenía disuelto una cantidad de PLGA-mPEG; esta mezcla se colocó en un Vórtex a 3000 rpm para formar la primera emulsión (A₁/O). Inmediatamente después, esta primera emulsión fue añadida a una solución acuosa (A₂), que contenía disuelto el surfactante y un agente catiónico y se agitó empleando un homogenizador Ultraturax a 15500 rpm. Una vez formada la segunda emulsión (A₁/O/A₂), el solvente orgánico fue retirado por roto evaporación dando paso a la formación de las nanopartículas poliméricas. Posteriormente, se realizó la purificación de las nanopartículas por centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron tres lavados con agua tipo I para garantizar la completa eliminación de los remanentes de polímero, fármaco, surfactante y agente catiónico.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas del PLGA-mPEG.

La determinación del tamaño hidrodinámico promedio y el índice de polidispersión, se realizó a 25°C usando una cubeta plástica de volumen reducido utilizando la técnica DLS operado en un ángulo de incidencia de 90°, con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS. La carga superficial fue evaluada a través de la medición del potencial zeta tomando una dilución de muestra 1:10 con una solución fosfato 1 mM pH 6.0. Las medidas del potencial zeta se llevaron a cabo en el equipo zetasizer Nano-ZS (Malvern, USA) por triplicado con cubeta capilar plástica DST 1060 con electrodos de oro. El estudio de las características morfológicas de los encapsulados de vancomicina en nanopartículas de PLGA-mPEG se llevó a cabo utilizando un microscopio de barrido electrónico (FE-SEM, QUANTA 47FEC 650) con un detector de electrones secundario, mediante el modo STEM. La muestra fue depositada sobre un grid con recubrimiento de oro (EMS, 100–400 mesh). Posteriormente, se evaporó el solvente acuoso de las NPs a temperatura ambiente y se analizaron las muestras empleando un voltaje de aceleración de 30 kV y 60000 X de ampliación.

Determinación del porcentaje de encapsulación

El contenido de vancomicina encapsulados en las nanopartículas (NPs) de PLGA-mPEG fue determinado empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa RP-HPLC. Para calcular el porcentaje de encapsulación de los antibióticos se destruyeron las nanopartículas poliméricas en solución orgánica y se realizó una extracción líquido-líquido de los fármacos para su posterior cuantificación. Los cálculos del porcentaje de encapsulación se llevaron a cabo por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Encapsulación = \frac{\text{antibiótico encapsulado}}{\text{antibiótico utilizado}} \times 100$$

La vancomicina fue cuantificada por HPLC con un cromatógrafo Agilent, modelo 1100, equipado con una bomba cuaternaria G1311A, detector de arreglo de diodos (DAD), modelo G1315A y un inyector automático, G1321. El método para la cuantificación de vancomicina se basó en el desarrollado por la FDA (24) Se empleó una columna C₁₈ (Zorbax GF-250) y como fase móvil isocrática 9% ACN/tampón 25 mM KH₂PO₄ (pH 3,2) y un flujo de 1 mL/min con detector UV-230 nm.

Determinación del efecto antimicrobiano de vancomicina libre y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de vancomicina sin encapsular y encapsulados en nanopartículas de PLGA-mPEG usando el método de microdilución en caldo en placas multi-pocillo de ELISA. Los protocolos para el control y crecimiento de bacterias fueron estandarizados previamente en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (25).

Inicialmente, se preparó un preinóculo para cada una de las bacterias en medio líquido, caldo Muller-Hilton (MH) para SARM. Los preinóculos se realizaron en el 10% del volumen final de crecimiento, y se llevó a incubación por un período de 12 h a 37 °C y 200 rpm. Después de transcurrido el tiempo se llevó al volumen final, se ajustó a la escala McFarland hasta alcanzar una concentración bacteriana de 7×10^8 UFC/mL para SARM.

Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 μ L de este inóculo bacteriano durante 8 horas, en microplacas que previamente contenían diluciones acuosas de vancomicina (0.3– 3.2 μ g/mL) o de antibiótico encapsulado en nanopartículas de PL-

GA-mPEG. A continuación, se incubaron las microplacas a 37°C con una agitación de 200 rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm durante 8h. La CMI fue definida como la menor concentración de antibiótico (encapsulado y sin encapsular) que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI_{50} y CMI_{90} corresponden a las dosis que inhibieron el 50% y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

Los porcentajes de inhibición para cada uno de los antibióticos (libres y encapsulados) se calcularon por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = 100 - \frac{[(A_f - A_0) * 100]}{A_c}$$

A_f = Absorbancia final de crecimiento en la concentración del fármaco evaluada

A_0 = Absorbancia inicial de crecimiento en la concentración del fármaco evaluada

A_c = Absorbancia final de la bacteria en ausencia de fármaco

La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó a partir de los valores que presentaron una $CMI \geq 50\%$.

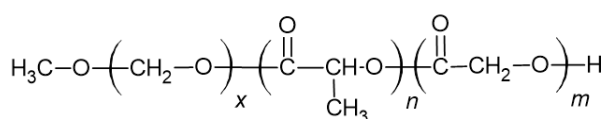
Inmediatamente después de realizada la determinación de las CMI, se tomó una alícuota de 100 µL en cada uno de los pocillos con las concentraciones a evaluar y se inocularon con 900 µL de medio de cultivo líquido infusión de cerebro corazón (BHI). Los cultivos se llevaron a cabo en tubos Eppendorf previamente esterilizados y fueron incubados a 37°C con los respectivos controles. Después, se confirmó la CMB sembrando en medio sólido aquellas concentraciones donde la absorbancia haya sido igual a la del medio puro. Posterior a la incubación en medio sólido BHI durante 24h, se determinó como CMB aquella concentración donde no hubo crecimiento alguno de colonias microbianas.

Resultados y discusión

Caracterización del bloque polimérico

La identidad del bloque polimérico sintetizado PLGA-mPEG (**Figura 1**) fue determinada por espectroscopia infrarroja y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

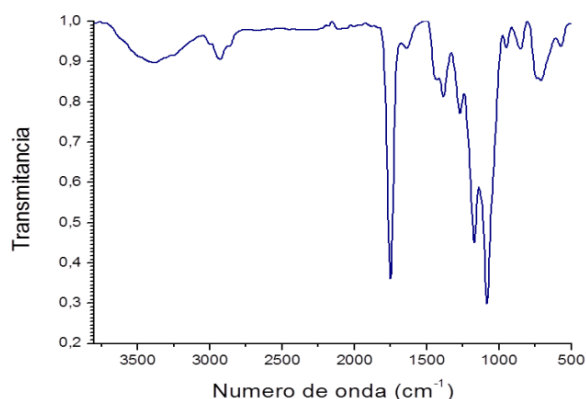
Figura 1. Estructura bloque polimérico PLGA-mPEG.



El espectro infrarrojo del producto sintetizado (**Figura 2**) muestra las

principales bandas características de los grupos funcionales presentes en la estructura del bloque polimérico PLGA-mPEG.

Figura 2. Espectro infrarrojo del bloque PLGA-mPEG sintetizado.



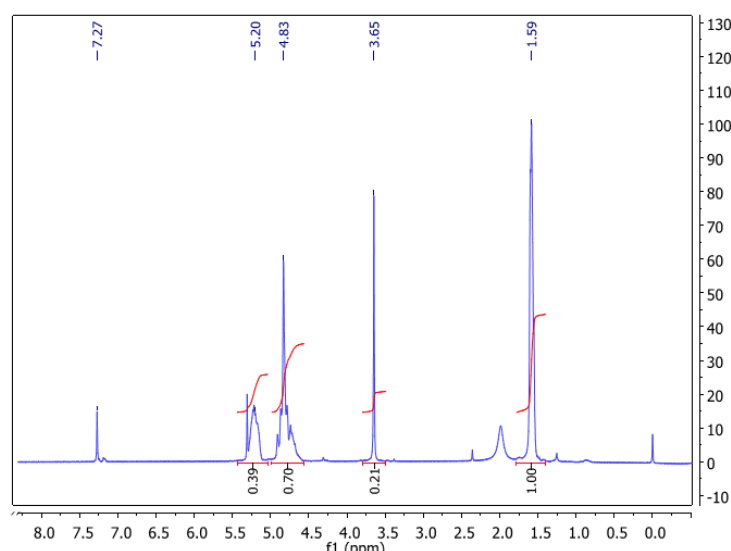
En el espectro se observa una banda a 3376 cm⁻¹ correspondiente a la tensión del enlace OH presente en el extremo glicólico de la estructura; mientras que a 2996 cm⁻¹ se observan las tensiones generadas por los grupos CH₂ y CH del residuo glicólico y láctico, respectivamente. La banda observada a 1751 cm⁻¹ es atribuida a la vibración del enlace C=O presentes en los residuos del ácido láctico y glicólico del copolímero. Finalmente, a 1171 y 1085 cm⁻¹ aparecen las vibraciones de la flexión del enlace C-O de los ácidos láctico y glicólico (23,26).

El análisis de RMN-¹H se realizó usando como patrón de referencia el desplazamiento químico de tetrametilsilano (TMS) (**Figura 3**). En el espectro se observa un singulete con despla-

zamiento químico de 3.65 ppm generado por los grupos metilenos del mPEG. La superposición de dobletes observada a 1.56 ppm es atribuida a los protones de los grupos metil del ácido láctico en la cadena polimérica. Finalmente, las señales observadas en 5.2 ppm y 4.8 ppm corresponden a los multipletes del grupo CH del ácido láctico y CH₂ del ácido glicólico, res-

pectivamente. La relación monomérica del ácido láctico, ácido glicólico y etilenglicol en la composición del bloque polimérico PLGA-mPEG se calculó integrando las señales normalizadas tomando como referencia la señal de 1.56 ppm del ácido láctico que presenta la mayor intensidad; la relación encontrada fue 1:0.70:0.21 respectivamente (27,28).

Figura 3. Espectro RMN-¹H del bloque polimérico PLGA-mPEG sintetizado



Los análisis llevados a cabo por espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear confirmaron la identidad del bloque polimérico sintetizado.

Caracterización de vancomicina encapsulada en nanopartículas poliméricas de PLGA-mPEG

Se realizó la caracterización fisicoquímica determinando el tamaño hidro-

dinámico promedio, carga superficial, morfología y porcentaje de encapsulación para cada uno de los parámetros evaluados. Se estudió el efecto sobre el tamaño hidrodinámico promedio y la carga superficial de las nanopartículas mediante la variación de los agentes estabilizante-agente catiónico manteniendo una concentración constante (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño hidrodinámico promedio.

Agente Estabilizante [0.5 %p/v]	Agente Catiónico [0.5 %p/v]	Tamaño ±DS [nm]	PdI (índice de polidispersión)	Potencial zeta [mV]±DS
PVA	Gelatina	710±12	1	+ 0,94±0,2
PVA	PEI	452±19	1	+ 6,25±0,3
Poloxámero 407	Gelatina	233±13	0,3	+ 0,33±0,06
Poloxámero 407	PEI	292±17	0,3	+ 3,14±0,70

*Concentración del polímero 25 mg/mL, concentración de vancomicina 12,5 mg/mL, relación A₁:O:A₂ 1:10:100, pH:7.4

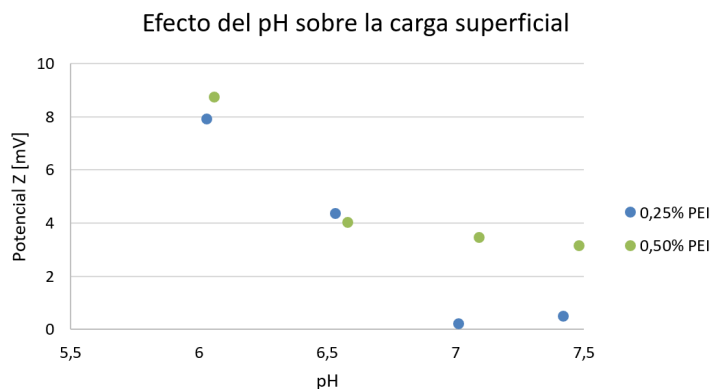
Con el uso de poloxámero 407 se obtuvieron nanopartículas con un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 300 nm y menor índice de polidispersión. La mayor estabilidad estérica del poloxámero frente al PVA podría estar asociada al volumen de los grupos hidrofílicos de polioxietileno POE orientados hacia la fase acuosa evitando la aglomeración y precipitación de las mismas (29–31)

Se buscó la obtención de nanopartículas poliméricas con carga superficial positiva para mejorar la interacción electrostática con la membrana bacteriana la cual posee una carga superficial negativa (32–34). Como puede observarse en la **Tabla 1**, el uso de PEI aumentó significativamente la carga superficial positiva de las nanopartículas respecto al uso de gelatina. Estos resultados podrían estar atribuidos a la abundancia de grupos amino en la estructura del PEI (35). Por otro lado, la menor carga superficial positiva conferida por la gelatina con respecto a PEI se debe

a que su punto isoeléctrico está en un rango de pH entre 7.0 y 9.0, por lo tanto, a pH 7.4 la carga neta tiende a ser cero (36,37), de manera que existe una menor interacción con la superficie de las nanopartículas. Además, la adición de gelatina causó formación de agregados al cabo de tres horas, evidenciando una baja estabilidad de la emulsión.

Se ha demostrado que la carga superficial es directamente proporcional al pH (34,38), por esta razón, se estudió el cambio del potencial zeta a diferentes pH. Utilizando la mezcla poloxámero-PEI (**Figura 4**).

Figura 4. Evaluación de la carga superficial de las nanopartículas recubiertas con PEI a diferentes pHs. Condiciones: 25 mg/mL PLGA-mPEG, 1 mL DCM, 100 µL vancomicina 12,5 mg/mL como fase acuosa interna, 10 mL de 0,5% p/v poloxámero y PEI (0,25 y 0,5) % p/v como fase acuosa externa.



Los resultados mostraron una dependencia de la carga superficial respecto al pH. Este hecho podría estar asociado a una mayor adsorción del PEI sobre las nanopartículas. Debido a la disminución del pH, un mayor número de grupos amino presentes en la estructura del PEI podrían encontrarse protonados, de manera que la

potencial zeta tiende a valores positivos (36). Además, se encontró que a pH 6.0 se obtiene un potencial zeta positivo de mayor magnitud. Por esta razón, y con el fin de aumentar esta carga superficial se estudió el efecto de la concentración de PEI (0.15, 0,25, 0.35, 0,5 y 1 % p/v) a pH 6.0 (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación del efecto de la variación de la concentración de PEI a pH 6.0

Porcentaje PEI %(p/v)	Tamaño±DS [nm]	Carga ± DS [mV]
0	253±1,73	-6,38±0,4
0,15	293±2,6	+ 9,3±0,6
0,25	278±13	+ 7,9±0,7
0,35	294±8	+ 3,8±1,2
0,5	243±11	+ 3,14±0,3
1	223±7	+ 0,13±0,05

*Concentración del polímero 25 mg/mL, concentración de vancomicina 12,5 mg/mL, relación A₁:O:A₂ 1:10:100, pH:6,0 poloxámero 407 0.5% p/v

Como se puede observar en la tabla 2, dado que el PEI es un polielectrolito, el aumento de su concentración incrementa la fuerza iónica del medio, lo que da como resultado una disminu-

nución de las interacciones iónicas con la nanopartícula que se ve reflejado en un potencial zeta bajo (36). La mayor carga superficial positiva se obtuvo a una concentración de PEI de 0,15

%(p/v). Esta concentración se mantuvo constante en los ensayos posteriores de porcentaje de encapsulación, morfología y ensayos microbiológicos.

Porcentaje de encapsulación

Se evaluaron dos solventes orgánicos, acetato de etilo y diclorometano (DCM), en el porcentaje de encapsula-

ción. Este análisis se realizó debido a que el tipo de solvente orgánico ejerce una influencia significativa en el porcentaje de encapsulación. Este efecto se atribuye a las diferentes tasas de precipitación de las nanopartículas, las cuales dependen del nivel de miscibilidad del solvente en la fase acuosa (39). Los resultados pueden observarse en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto del solvente orgánico sobre el porcentaje de encapsulación

Solvente	mg vancomicina/ g de NPs
DCM	0,11
Acetato de Etilo	0,50

*Concentración del polímero 25 mg/mL, concentración de vancomicina 12.5 mg/mL, relación A₁:O:A₂ 1:10:100, poloxámero 407 0.5% p/v, PEI 0.15%

El uso de acetato de etilo condujo a un mayor porcentaje de encapsulación respecto al DCM. Esto se debe a que el acetato de etilo es parcialmente soluble en agua y puede difundirse en el medio acuoso más fácilmente que el DCM creando regiones de supersaturación. Como resultado de la agregación de polímero cada gota de solvente en la emulsión en las regiones de supersaturación conduce a la formación de varias nanopartículas atrapando una mayor cantidad de fármaco (39–41).

Zakeri y colaboradores (42) encapsularon vancomicina en nanopartículas de PLGA por el método doble emulsión-solvente evaporación (A1/O/A2).

Los tamaños hidrodinámicos promedio para vancomicina encapsulada en PLGA fueron mayores que los obtenidos en este trabajo, este hecho podría ser atribuido a las condiciones de la emulsión utilizados. Para la obtención de nanopartículas en este trabajo se usó una mayor velocidad y tiempo de agitación lo que conduce a una disminución del tamaño hidrodinámico (43). La carga superficial aumentó debido a la presencia del agente catiónico PEI. Sin embargo, el porcentaje de encapsulación fue menor con respecto a los resultados de Zakeri, las diferencias podrían ser atribuidas al mayor tiempo de formación de la emulsión lo que facilita la difusión de la vancomicina al medio acuoso (44).

Radovic y colaboradores (34) encapsularon vancomicina en NPs de PLGA-mPEG y PLGA-PLH-mPEG (PLH: polihistidina) por el método $A_1/O/A_2$ con un tamaño de 196 nm y 221 nm, respectivamente. El tamaño hidrodinámico mayor con respecto al obtenido por Radovic podría atribuirse a una mayor concentración del polímero en la fase orgánica y una menor relación entre las fases $A_1/O/A_2$ (45).

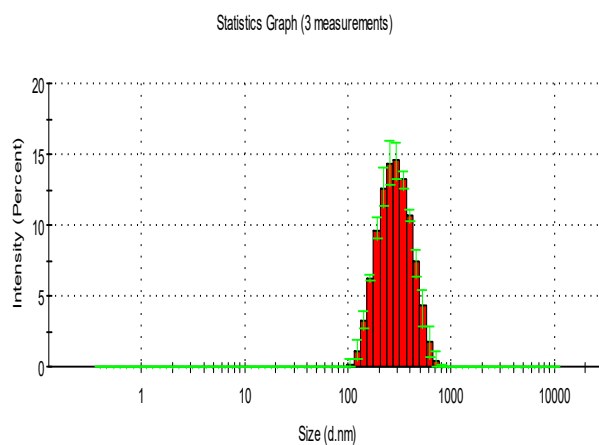
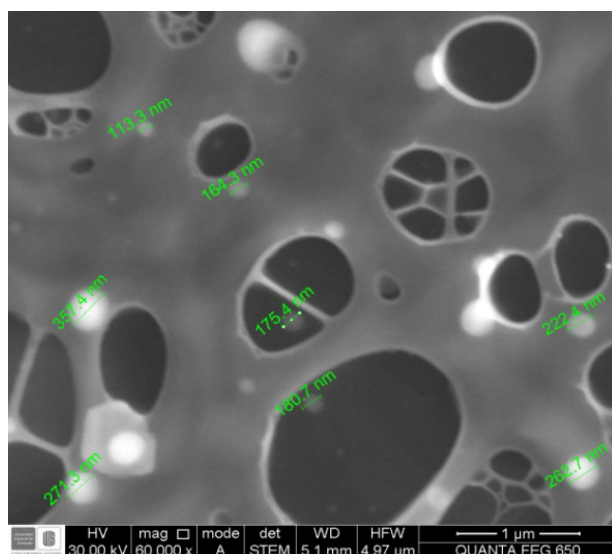
Finalmente, las mejores condiciones encontradas para obtener vancomicina encapsulada en un sistema nanoestructurado de PLGA-mPEG con un promedio hidrodinámico de 300 nm y carga superficial positiva fueron:

25 mg PLGA-mPEG, 1 mL de acetato de etilo, 100 μ L (12,5 mg/mL) de vancomicina, 0,5 % (p/v) de poloxámero 407, 0,15% de PEI, velocidad de emulsión 15500 rpm.

Morfología

Los sistemas nanoencapsulados de PLGA-mPEG/PEI con vancomicina presentan una morfología esférica, con una distribución de tamaños cercana a 300 nm, tal como fue observada por DLS. La morfología de las nanopartículas fue similar a la obtenida por otros autores para vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG (34).

Figura 5. Distribución de tamaño y morfología de las nanopartículas de PLGA-mPEG/PEI.



Concentración del polímero 25 mg/mL, concentración de vancomicina 12.5 mg/mL, relación A₁:O:A₂ 1:10:100, poloxámero 407 0.5% p/v, PEI 0.15%. La figura de la izquierda muestra imagen obtenida por la técnica DLS con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS de las NPs sintetizadas, mientras que la figura de la derecha corresponde a la imagen obtenida por microscopio de barrido electrónico (FE-SEM, QUANTA 47FEC 650) de las NPs sintetizadas.

La evaluación de los diferentes parámetros permitió obtener nanopartículas poliméricas con un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de los

300 nm, (**Figura 5**) con una carga superficial positiva de +9.7 mV y un porcentaje de encapsulación de 0,50%.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de vancomicina encapsulada en NPs de PLGA-mPEG/PEI mostró que para una CMI₅₀ no hay diferencias significativas en el efecto antimicrobiano respecto a la vancomicina libre, estos resultados son comparables con los obtenidos por (34). Sin embargo, para la CMI₉₀ se observó que la vancomicina encapsulada tuvo una pérdida de actividad del 29.1% con respecto a la vancomicina libre.

Tabla 4. CMI50 y CMI90 de vancomicina frente a SARM.

Bacteria	Antibiótico		CMI50 µg/mL	CMI90 µg/mL
SARM	Vancomicina	Libre	0.50	1.10
		Encapsulada	~0.51	1.42

Teniendo en cuenta que la vancomicina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, es posible que se haya presentado una competencia entre el antibiótico y la nanopartícula cargada positivamente con PEI por la afinidad de la membrana externa de la bacteria. Por lo tanto, en presencia de las nanopartículas no se observaría un aumento en la actividad antimicrobiana sino una disminución en la misma (referencia). Adicionalmente, la baja relación en-

tre el antibiótico y polímero, es decir el porcentaje de encapsulación alcanzado 0,50 mg vancomicina/ g de NPs, pudo haber afectado el efecto antimicrobiano dada la baja disponibilidad del fármaco. (referencia)Otros autores, han encontrado que algunos sistemas nanoencapsulados tienen una pérdida de actividad antimicrobiana posiblemente asociada a la alta afinidad de los fármacos con el nanocarrier o la lenta tasa de liberación del fármaco (46,47).

Posterior a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizó la evaluación del efecto bactericida de las nanopartículas. De acuerdo con las concentraciones evaluadas se evidenció que la vancomicina encapsulada en nanopartículas de PLGA-mPEG/PEI presentó actividad bactericida. Por tanto, se consideran estas concentraciones como bacteriostáticas frente a la cepa de estudio.

Conclusiones

Se realizó la síntesis del bloque polimérico PLGA-mPEG por polimerización en masa fundida, los espectros de FTIR y RMN-¹H fueron congruentes con la estructura del copolímero. Mediante la metodología de doble emulsión evaporación de solvente se lograron obtener nanopartículas de PLGA-mPEG encapsulando dos antibióticos de diferente naturaleza. Las nanopartículas sintetizadas presentaron un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 300 nm y carga superficial alrededor de +10 mV utilizando poloxámero 407 como agente estabilizante y PEI como agente catiónico. De acuerdo con las imágenes obtenidas se pudo confirmar que se obtuvieron nanopartículas poliméricas cargadas, con una morfología esférica, y estables en función del tiempo, lo que valida

los parámetros de síntesis analizados en el presente trabajo.

Los resultados de actividad antimicrobiana mostraron que la vancomicina encapsulada no presentó una disminución del CMI₅₀ en tanto que los resultados fueron comparables con la vancomicina libre. Si bien, es probable que la vancomicina haya competido con la nanopartícula cargada positivamente buscando afinidad por la membrana celular de este tipo de bacteria gram-positiva, este estudio también permite analizar la posibilidad de emplear el método de síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas utilizando antibióticos gram-específicos que tengan un mecanismo de acción dual, no solamente enfocado a la inhibición de la formación de la pared celular sino también presenten un mecanismo de acción que procure la degradación desde la parte interna de la bacteria. De igual manera, el presente estudio se limitó a la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a una única cepa de SARM, por lo que un estudio posterior podría incluir una mayor diversidad de cepas no solo de *Staphylococcus* resistentes, sino también de estreptococos, enterococos de forma que se pueda determinar el posible cambio en la actividad antibacteriana del antibiótico estando en un sistema nanoparticulado polimérico.

Referencias

- Mishra RPN, Oviedo-Orta E, Prachi P, Rappuoli R, Bagnoli F. Vaccines and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. octubre de 2012 [citado 12 de enero de 2015];15(5):596-602. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981392>
- Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. Colombia Médica La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación Colombia Médica. *Colomb Med*. 2007;38:149-58.
- Nandhini P, Kumar P, Mickymaray S, Alothaim AS, Somasundaram J, Rajan M. Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. *Antibiotics*. 1 de mayo de 2022;11(5).
- Camacho-Cruz J, Gutiérrez IF, Brand-López K, Sosa-Rodríguez YA, Vásquez-Hoyos P, Gómez-Cortés LC, et al. Differences between Methicillin-susceptible Versus Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Pediatrics: Multicenter Cohort Study Conducted in Bogotá, Colombia, 2014-2018. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1 de enero de 2022;41(1):12-9.
- Gomes AR, Sanches IS, Sousa MADE, Castañeda E. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian Hospitals : Dominance of a Single Unique Multidrug-Resistant Clone. *microbial drug resistance*. 2001;7(1):23-32.
- Alvarez CA, Yomayusa N, Leal AL, Moreno J, Mendez-Alvarez S, Ibañez M, et al. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *Am J Infect Control* [Internet]. mayo de 2010 [citado 18 de febrero de 2014];38(4):315-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042253>
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *The Society for Healthcare Epidemiology of America*. 2003;24(5):362-86.
- Albregard Peripato L, Taminato M, Francisco Peripato Filho A, Laura Remédio Zeni Beretta A. Mortality among Burned Colonized/ Infected by *Staphylococcus aureus* Sensitive and Resistant to Methicillin: Meta-Analysis. *Am J Public Health Res* [Internet]. 5 de mayo de 2014 [citado 21 de enero de 2015];2(3):103-7. Disponible en: <http://pubs.sciepub.com/ajphr/2/3/7/index.html>
- Atshan SS, Hamat RA, Aljaberi MA, Chen JS, Huang SW, Lin CY, et al. Phage Therapy as an Alternative Treatment Modality for Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Vol. 12, *Antibiotics*. MDPI; 2023.
- Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1 de enero de 2003;36(1):53-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491202>
- Shimizu M, Mihara T, Ohara J, Inoue K, Kinoshita M, Sawa T. Relationship between mortality and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *PLoS One*. 1 de julio de 2022;17(7 July).

12. Pothineni BK, Keller A. Nanoparticle-Based Formulations of Glycopeptide Antibiotics: A Means for Overcoming Vancomycin Resistance in Bacterial Pathogens? *Adv Nanobiomed Res.* abril de 2023;3(4).
13. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* [Internet]. junio de 2009 [citado 13 de julio de 2014];86(3):215-23. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3249419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Singh S, Pandey VK, Tewari RP, Agarwal V. Nanoparticle based drug delivery system : Advantages and applications. *Indian J Sci Technol.* 2011;4(3):177-80.
15. Huh AJ, Kwon YJ. «Nanoantibiotics»: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release* [Internet]. 10 de diciembre de 2011 [citado 20 de enero de 2014];156(2):128-45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763369>
16. Chan YH, Fan MM, Fok CM, Lok ZL, Ni M, Sin CF, et al. Antibiotics nonadherence and knowledge in a community with the world's leading prevalence of antibiotics resistance: implications for public health intervention. *Am J Infect Control* [Internet]. marzo de 2012 [citado 15 de febrero de 2014];40(2):113-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741119>
17. Karavelidis V, Giliopoulos D, Karavas E, Bikiaris D. Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 23 de diciembre de 2010 [citado 29 de enero de 2014];41(5):636-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863892>
18. Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, Sadhu V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. Vol. 20, *Nano-Structures and Nano-Objects.* Elsevier B.V.; 2019.
19. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* [Internet]. 20 de julio de 2012 [citado 19 de febrero de 2014];161(2):505-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353619>
20. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm* [Internet]. 10 de abril de 2000;199(1):95-110. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794931>
21. Murugesan S, Ganesan S, Averineni RK, Nahar M, Mishra P, Jain NK. PEGylated Poly(Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticulate Delivery of Docetaxel: Synthesis of Diblock Copolymers, Optimization of Preparation Variables on Formulation Characteristics and *In Vitro* Release Studies. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 1 de abril de 2007 [citado 15 de febrero de 2014];3(1):52-60. Disponible en: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&iissn=1550-7033&volume=3&issue=1&spage=52>
22. An MM, Shen H, Zhang JD, Xu GT, Jiang YY. Linezolid versus vancomycin for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. mayo de 2013 [citado 7 de febrero de 2014];41(5):426-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537580>

23. Li YP, Pei YY, Zhang XY, Gu ZH, Zhou ZH, Yuan WF, et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release* [Internet]. abril de 2001;71(2):203-11. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365901002188>
24. Faustino P, Khan M (FDA). OFFICE OF GENERIC DRUGS VANCOMYCIN SOLUBILITY STUDY DIVISION OF PRODUCT QUALITY RESEARCH OFFICE OF TESTING AND RESEARCH. Center for Drug Evaluation and Research. 2008;2-17.
25. Paredes D. Estudio del efecto antibacteriano de nanoparticulas de plata sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureus. Universidad Industrial de Santander; 2011.
26. Yadav K, Chunttani K, Mishra A, Sawant K. Long Circulating Nanoparticles of Etoposide Using PLGA-MPEG and PLGA-Pluronic Block Copolymers: Characterization, Drug-Release, Blood-Clearance, and Biodistribution Studies. *Drug Dev Res*. 2010;239(November 2009):228-39.
27. Kim MS, Seo KS, Hyun H, Kim SK, Khang G, Lee HB. Sustained release of bovine serum albumin using implantable wafers prepared by MPEG-PLGA diblock copolymers. *Int J Pharm* [Internet]. 4 de noviembre de 2005 [citado 24 de marzo de 2014];304(1-2):165-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198075>
28. Mattheolabakis G, Taoufik E, Haralambous S, Roberts ML, Avgoustakis K. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. febrero de 2009 [citado 24 de marzo de 2014];71(2):190-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929649>
29. Moghimi SM, Hunter AC. engineering and experimental medicine. *Reviews*. 2000;18(October):2958-64.
30. Keegan ME, Falcone JL, Leung TC, Saltzman WM. Biodegradable Microspheres with Enhanced Capacity for Covalently Bound Surface Ligands. *Macromolecules*. 2004;14:9779-84.
31. El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol* [Internet]. 15 de febrero de 2010;44(4):1260-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20099802>
32. Wilson WW, Wade MM, Holman SC, Champlin FR. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge. *J Microbiol Methods*. 2001;43:153-64.
33. Dillen K, Bridts C, Veken P Van Der, Cos P, Vandervoort J, Augustyns K, et al. Adhesion of PLGA or Eudragit / PLGA nanoparticles to Staphylococcus and Pseudomonas. *Pharm Nanotechnol*. 2008;349:234-40.
34. Radovic-moreno AF, Lu TK, Puscasu VA, Yoon CJ, Langer R, Farokhzad OC. Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall- Targeted Delivery of Antibiotics. *America Chemical Society Nanotechnology*. 2012;6(5):4279-87.
35. Hunter a C. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 1 de diciembre de 2006 [citado 3 de marzo de 2014];58(14):1523-31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079050>

36. Vandervoort J, Ludwig a. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. marzo de 2004 [citado 4 de febrero de 2014];57(2):251-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15018982>
37. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 1 de enero de 2010 [citado 19 de febrero de 2014];75(1):1-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782542>
38. Rezvani Amin Z, Rahimizadeh M, Eshghi H, Dehshahri A, Ramezani M. The effect of cationic charge density change on transfection efficiency of polyethylenimine. *Iran J Basic Med Sci* [Internet]. febrero de 2013;16(2):150-6. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3843858&-tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Cheow WS, Hadinoto K. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* [Internet]. noviembre de 2010 [citado 18 de marzo de 2014];370(1-3):79-86. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775710004954>
40. Freytag T, Dashevsky A, Tillman L, Hardee GE, Bodmeier R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *J Colloid Interface Sci*. 2000;69:197-207.
41. Cohen-sela E, Teitlboim S, Chorny M, Koroukhov N, Danenberg HD, Gao J, et al. Single and Double Emulsion Manufacturing Techniques of an Amphiphilic Drug in PLGA Nanoparticles : Formulations of Mithramycin and Bioactivity. *J Pharm Sci*. 2009;98(4):1452-62.
42. Zakeri-milani P, Delf B, Jelvehgari M, Valizadeh H. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2013;103:174-81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.021>
43. Ahmed N, Fessi H, Elaissari A. Modified double emulsion process as a new route to prepare submicron biodegradable magnetic / polycaprolactone particles for in vivo theranostics. *Soft Matter*. 2012;8:2554-64.
44. Al-Ajmi F, Loveday DL, Hanby VI. The cooling potential of earth-air heat exchangers for domestic buildings in a desert climate. *Build Environ*. 2006;41(3):235-44.
45. Giri TK, Choudhary C, Ajazuddin, Alexander A, Badwaik H, Tripathi DK. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. abril de 2013 [citado 18 de marzo de 2014];21(2):125-41. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3744931&-tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Nehme H, Saulnier P, Ramadan AA, Cassisa V, Guillet C, Eveillard M, et al. Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity. *PLoS One*. 1 de enero de 2018;13(1).
47. Shakya AK, Al-Sulaibi M, Naik RR, Nsairat H, Suboh S, Abulaila A. Review on PLGA Polymer Based Nanoparticles with Antimicrobial Properties and Their Application in Various Medical Conditions or Infections. Vol. 15, *Polymers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.