

**Caracterización *in silico* de la interacción entre Eudragit E-100 y  
PAM-18 Na<sub>2</sub> con la proteína de unión a penicilina (PBP2a) de  
*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina**

**Ana María Amú Márquez y Astrid Viviana González Bermúdez**

**Director (a)  
José Fernando Oñate Garzón M.Sc., PhD  
Codirector  
Yamil Liscano PhD**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de **Microbiología**  
Cali, Colombia  
2021**

**Caracterización *in silico* de la interacción entre Eudragit E-100 y  
PAM-18 Na<sub>2</sub> con la proteína de unión a penicilina (PBP2a) de  
*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina**

**Ana María Amú Márquez y Astrid Viviana González Bermúdez**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Microbiólogo**

**Director (a)  
José Fernando Oñate Garzón M.Sc., PhD  
Codirector  
Yamil Liscano PhD**

**Línea de Investigación:  
Estudios computacionales de sistemas biológicos y químicos  
Grupo de Investigación:  
QUIBIO**

**Universidad Santiago de Cali**  
**Facultad de Ciencias Básicas**  
**Programa de **Microbiología****  
**Ciudad, Colombia**  
**2021**



## IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	Generación de nuevo conocimiento	Universidad Santiago de Cali
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

\*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

# CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN ENTRE EUDRAGIT E-100 Y PAM-18 NA CON LA PBP2a DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A LA METICILINA

Ana María Amú <sup>1</sup>, Astrid Viviana González <sup>2</sup>

<sup>1, 2</sup> Ana María Amú Márquez., Astrid Viviana González Bermúdez. Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

## RESUMEN

Las opciones de tratamiento antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) cada vez son más reducidas. Las cepas MRSA son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica para la PBP2a, la cual tiene muy poca afinidad por estos antibióticos. Estudios anteriores han demostrado que el uso de nanoliposomas funcionalizados con polímeros cargados con ampicilina, puede mejorar la actividad antimicrobiana de ampicilina en cepas resistentes de *S. aureus*. Sin embargo, el mecanismo antimicrobiano de estos sistemas no ha sido estudiado. Por lo tanto, en este trabajo se caracterizó de la interacción *in silico* del Eudragit E-100 y el PAM-18 Na con la PBP2a de MRSA. Para ello, se realizaron estudios de acoplamiento molecular de ambos polímeros en forma neutra e ionizada, así como de la ampicilina, en el sitio activo de la PBP2a. Los resultados mostraron que tanto la ampicilina como las del Eudragit y PAM18Na, exhibieron una ligera energía libre de unión a la proteína PBP2a.

**Palabras clave:** Interacción molecular; MRSA; Computacional; Polímeros.

## *IN SILICO* CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION BETWEEN EUDRAGIT E-100 AND PAM-18 NA WITH THE PENICILLIN-BINDING PROTEIN (PBP2a) OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

## ABSTRACT

Antimicrobial treatment options against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are increasingly limited. MRSA strains are resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics by acquiring the *mecA* gene, which codes for the penicillin-binding protein (PBP2a), which has very little affinity with these  $\beta$ -lactamics. Previous studies have shown that the use of functionalized nanoliposomes with ampicillin-laden particles can improve the antimicrobial activity of ampicillin in resistant strains of *S. aureus*. However, the biological mechanism of these systems has not yet been adequately elucidated. Therefore, this work characterized the interaction of two polymers, Eudragit E-100 and PAM-18 Na used for the recovery of the antibiotic activity of ampicillin against MRSA strains with PBP2a of *Staphylococcus aureus*, making use of bioinformatic tools. For this, molecular coupling studies were carried out at the active site of PBP2a, evaluating the monomeric units of both polymers in a neutral and ionized form as well as with the antibiotic ampicillin. The results showed that ampicillin and monomeric units of Eudragit and PAM18 Na described a slight free energy binding to the PBP2a protein.

**Keywords:** Molecular interaction; MRSA; Computational; polymers.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antimicrobianos se ha convertido en una problemática de salud mundial, debido a la falta de opciones disponibles para tratar aquellas infecciones causadas por bacterias resistentes [1]. La resistencia a los antibióticos está caracterizada por determinadas alteraciones genéticas, las cuales les permitirán a las células resistir al efecto de los antibióticos [2]. Dicha resistencia puede ser de tipo inherente o adquirida [3]. La resistencia inherente, es de carácter natural en algunas bacterias, especialmente en las Gram-negativas, aunque también hay bacterias grampositivas que poseen una resistencia natural como es el caso de los enterococos que a su vez, tienen la capacidad de adquirir resistencia a gran parte de los antibióticos disponibles (causando gracias a esto infecciones adquiridas en la comunidad y en hospitales en todo el mundo, incluidas bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario y sepsis neonatal) [4], [5]. Por su parte, la resistencia adquirida, ocurre cuando las bacterias que son naturalmente susceptibles a algún antibiótico obtienen genes que codifican a un mecanismo de resistencia, como es el caso de *Staphylococcus aureus* MRSA [4], [6]. Las cepas de *S. aureus* se han vuelto resistentes a los antibióticos como la meticilina por la adquisición del gen *mecA*, que codifica para la proteína de unión a la penicilina PBP2a, la cual tienen muy poca afinidad por los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas o los carbapenémicos) [7]. Además de ello, las cepas de *S. aureus* han generado mecanismos de resistencia debido a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas, las cuales son capaces de degradar el anillo  $\beta$  lactámico de estos antibióticos [8].

El mecanismo farmacológico de la ampicilina, está basado en su unión con las proteínas PBP (Penicillin-Binding Proteins), que son enzimas ancladas a la membrana celular y que permiten que se de la construcción del peptidoglicano como componente de la pared celular. De esta manera, la ampicilina inhibe la última etapa de síntesis de la pared celular de los microorganismos. Sin embargo, esta capacidad de inhibición se ha perdido con el tiempo, dando lugar a lo que se conoce ampliamente como resistencia a los antibióticos como resultado de la aparición de la isoenzima PBP2a en las cepas de MRSA, que exhibe una baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [9]. El gen *mecA* es una región altamente conservada entre las especies de estafilococos [10]. Por su parte, el mecanismo que confiere la resistencia a meticilina, es complejo, ya que la bacteria ha generado una variación genética, que se encuentra codificada en el gen *mecA*, por la cual modifica la estructura de su proteína ligadora o fijadora de penicilina (PBP2a), lo que impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa (cuya función en el ciclo de vida bacteriana es sintetizar la pared bacteriana) [11], [12]. Debido a la acción de la PBP2a y que las enzimas  $\beta$ -lactamasas no destruyen el antibiótico, la resistencia a meticilina fue denominada "intrínseca" [8].

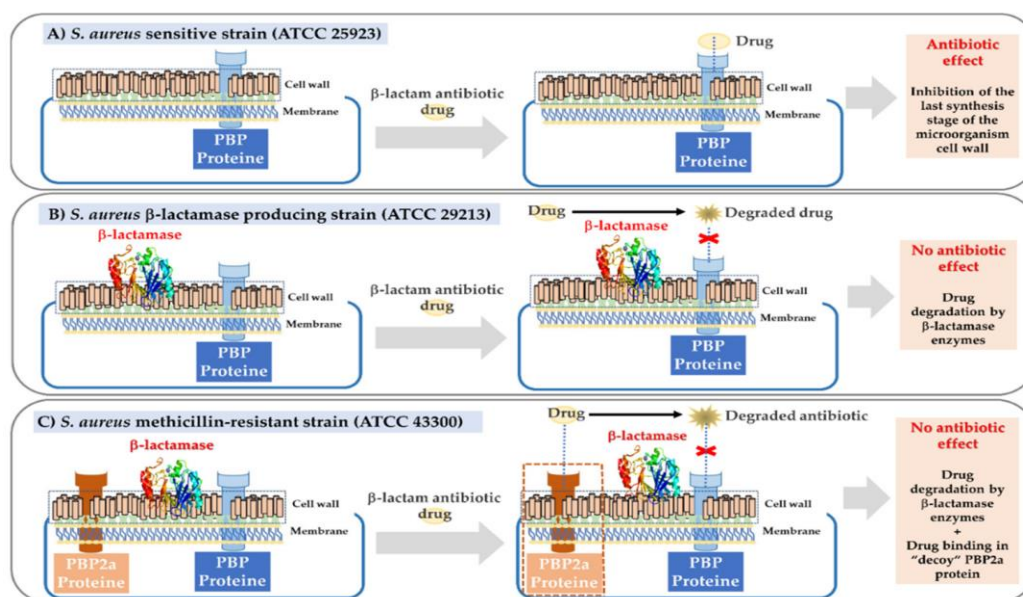
Las cepas de *S. aureus* pueden ser resistentes y multirresistentes, estas últimas, en respuesta a la presión selectiva a causa de las terapias antimicrobianas mal manejadas, al uso subterapéutico en las granjas de animales y a la automedicación. No obstante, esta multirresistencia puede darse también en *S. aureus*, como consecuencia de elementos genéticos como transposones o plásmidos [8]. *S. aureus* posee ADN exógeno, móvil, formado por secuencias de inserción, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad, siendo éstos determinantes para el desarrollo de la enfermedad y resistencia a múltiples antibióticos. Gracias a la presencia de elementos móviles, *S. aureus* puede intercambiar material genético por transferencia horizontal de genes con bacterias de su mismo género u otras diferente al propio [14], [8]. Con base en lo anterior, se podría decir que el intercambio de genes es la clave de *S. aureus* en la evolución.

La actual crisis a causa de la resistencia de *S. aureus* a los  $\beta$ -lactámicos, ha dado lugar a una gran cantidad de investigaciones que se han centrado en encontrar y/o generar nuevas moléculas [7], [15]. Por ejemplo, las terapias con bacteriófagos y péptidos antimicrobianos se han investigado como tratamientos potenciales para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes [16]. La bioinformática estructural y las simulaciones computacionales son empleadas con mayor frecuencia para abordar esta problemática [7]. Uno de los enfoques empleados recientemente, ha sido la búsqueda y/o el desarrollo de polímeros con actividad antimicrobiana, debido a que los polímeros poseen una tasa más lenta de desarrollar resistencia y son menos tóxicos que otros antibióticos convencionales (meticilina, ampicilinas, vancomicina) [16]. En varios estudios se han empleado los liposomas recubiertos con polímeros (han sido llamados de distintas maneras como 'coloidosomas' o 'liposomas furtivos' al utilizar polímeros iónicos o derivado polimérico de polietilenglicol, respectivamente) para superar el problema de resistencia bacteriana. Además, los polímeros permiten la liberación del fármaco de forma controlada por lo que se podría mantener regulada la concentración de éste en la circulación sistémica [15], [17].

El Eudragit E-100 y PAM 18 Na se han empleado previamente para la liberación controlada de fármacos, se ha demostrado que el uso de nanoliposomas funcionalizados con polímeros cargados con ampicilina, puede mejorar la actividad antimicrobiana de este contra cepas resistentes de *S. aureus*. El Eudragit E-100 [poli (butilmetacrilato, (2-dimetilaminoetil) metacrilato, metilmetacrilato) 1:2:1], es un polímero catiónico derivado de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, este es utilizado para aumentar la aceptación de sabores en paciente. A su vez, el PAM 18 Na que es un polímero derivado del ácido maleico, es capaz de formar nano y micro dominios de naturaleza hidrofóbica que permite solubilizar la ampicilina. Ambos polímeros son capaces de generar complejos de asociación iónica polímero- fármaco [18].

Trabajos anteriores, han encontrado que el recubrimiento de la ampicilina con Eudragit E-100, aumenta considerablemente su actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* MRSA ATCC 43300. Del mismo modo, el polímero PAM 18-Na2 favoreció el tiempo de vida medio de la ampicilina en condiciones ácidas. Estos resultados muestran que los polímeros pueden ser una alternativa promisoriosa al tratamiento de enfermedades infecciosas con problemas de resistencia [19], [15].

A su vez, en estudios previamente publicados, donde busca mejorar la actividad biológica (evitar la degradación química y enzimática y potenciar la actividad biológica) de la ampicilina se ha demostrado que el uso de nanoliposomas funcionalizados con polímeros cargados con ampicilina, puede mejorar la actividad antimicrobiana de este contra cepas resistentes de *S. aureus*. El primer estudio se centró en evaluar el efecto antimicrobiano de los nanocomplejos de inclusión formados entre la ampicilina y la sal sódica de poli(ácido maleico - alt -octadecano) (PAM-18Na). Este estudio demostró un aumento de 3 y 4 veces en la actividad antimicrobiana en cepas resistentes de *S. aureus* ATCC 29213 (productora de  $\beta$ -lactamasa) y ATCC 43300 (MRSA), respectivamente, cuando se nanocomplejó con ampicilina. El segundo estudio evaluó el efecto de los nanoliposomas recubiertos con el polímero catiónico Eudragit E-100 cloruro (EuCl) y cargados con ampicilina, encontrando un aumento en la actividad antimicrobiana de 8 y 16 veces frente a las cepas ATCC 29213 y ATCC 43300, respectivamente. Por el contrario, el tercer estudio evaluó diferentes nanopartículas complejas de polielectrolitos (PECN) formadas entre polímeros PAM-18Na y EuCl cargados con ampicilina [9] (fig.1). En este caso, se encontró un aumento moderado en la actividad antimicrobiana en cada una de las cepas de *S. aureus* resistentes. Sin embargo, sus mecanismos de acción son poco conocidos, ya que ninguno de estos estudios pudo dilucidar si los resultados antimicrobianos observados se debieron a que las NP proporcionaron un efecto protector al fármaco contra las enzimas  $\beta$ -lactamasas o impidieron que se unieran a la proteína “señuelo” PBP2a o ambas. Con base a todo lo anterior, en la presente investigación se caracterizará la interacción in silico del Eudragit E-100 y el PAM-18 Na con la PBP2a de MRSA.



**Figura 1.** Esquema de los mecanismos farmacológicos de los fármacos  $\beta$ -lactámicos sobre cepas de *S. aureus* con diferentes grados de resistencia. (A) Tensión sensible. (B) Cepa productora de  $\beta$ -lactamasa. (C) Cepa resistente a la metilina con un mecanismo dual (producción de proteína “señuelo” de  $\beta$ -lactamasa y PBP2a).

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Obtención de receptor

La proteína de unión a la metilicina PBP2a, se obtuvo en la base de datos Protein Data Bank (PDB: <https://www.rcsb.org/>) con un ID de PDB 1VQQ y una resolución de 1,80 Å. La PBP2a utilizada en este trabajo fue obtenida de la cepa 27r de *S. aureus* por difracción de rayos X, tiene un peso total de estructura de 148,48 kDa y 10644 átomos.

### 2.2. Obtención de ligandos

Las estructuras en 3D del Eudragit E-100 y la ampicilina se obtuvieron de la base de datos de Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), con un ID de **107676** y **6249**, respectivamente. Para el diseño del EI PAM 18 Na en forma única se diseñó en Mol View (<https://molview.org/>) (Se consultó la página el 16 de marzo del 2020), se tomó como referencia [20]. Para diseñar el PAM 18 Na se tomó como referencia las estructuras de un estudio donde se evaluaron los efectos de los sistemas poliméricos PAM-18 K2 y PAM 18 Na 2 sobre los perfiles de disolución de comprimidos de ampicilina [17]. Los PDB para el acoplamiento molecular, se optimizaron las estructuras de las unidades monoméricas y la ampicilina en el software Avogadro versión 1.2, y se aplicaron los campos de fuerza MMFF94 (Merch Molecular fuerza de campo) y Garfio (Generalidades ÁMBAR fuerza de campo) [21].

### 2.3. Preparación de receptor y ligandos

La preparación del receptor (PBP2a) y ligandos (PAM-18 Na<sub>2</sub>, Eudragit E-100 y Ampicilina) se llevó a cabo mediante un visor molecular, llamado PyMOL versión 2.5 [22]. El tratamiento del receptor, consistió en la extracción de los ligandos y eliminación de las moléculas de agua las cuales vienen resueltas en su estructura cristalina. Para evitar errores en el cálculo de la energía de unión, se agregaron átomos de hidrógeno y cargas de Kollman al receptor, en AutoDock [23], [24]. Para los ligandos, se revisó las posiciones de sus átomos y todos los enlaces de cada estructura, se tomaron como referencia las estructuras en 2D mostradas en la base de datos Pubchem.

### 2.4. Búsqueda del sitio activo

Para conocer el centro activo de la PBP2a y seleccionar el mejor sitio de unión de los ligandos se buscó en toda la superficie del receptor (docking ciego). Para esto, se utilizó CB-DOCK ([http://clab.labshare.cn/cb\\_dock/php/](http://clab.labshare.cn/cb_dock/php/)), este software identifica los sitios de unión, calcula el centro de la caja de acoplamiento de acuerdo con los ligandos de consulta (Se consultó la página el 26 de abril del 2020) [25]. CB-Dock utiliza un enfoque de detección de cavidades basado en la curvatura (CurPocket) y las poses de unión de los ligandos de consulta utilizando AutoDock Vina [25].

### 2.5. Acoplamiento molecular

Los acoplamientos moleculares se realizaron en Autodock Vina, configurando una caja de dimensiones X: 1, Y: 37, Z: 57; coordenadas X: 27, Y: 27, Z: 27. El acoplamiento se realizó bajo los siguientes parámetros: libre rotación de todos los enlaces de los ligandos con libertad conformacional, generación de varias poses para cada ligando. Luego se evaluaron las energías de unión y la afinidad de enlaces obtenidos. La visualización de los resultados se realizó en Discovery Studio BIOVIA [26].

### 3. RESULTADOS

Las energías de unión obtenidas a partir de las interacciones moleculares entre, Eudragit E100, PAM 18 Na (en forma iónica y neutra) y la ampicilina con la PBP2a de *S. aureus* se presentan en la tabla 1. Se obtuvieron energías de unión en Kcal/mol para las unidades monoméricas en forma iónica y neutra de -4.6 y -4.5 Eudragit E100, -5.2 -4.7 PAM 18 Na respectivamente y -6.4 para la ampicilina. Los resultados de las energías de unión son valores negativos, lo cual indica que las unidades monoméricas son capaces de interactuar con la PBP2a de *S. aureus* de cepas MRSA, sin embargo, estas tienen valores más altos de energía de unión en comparación a la ampicilina. Es decir, la ampicilina es termodinámicamente más favorable con la PBP2a de *S. aureus* que el Eudragit E100 y PAM 18 Na.

En la figura 2, se muestran las interacciones en 2D de los ligandos (ampicilina, Eudragit E 100 y PAM 18 Na) con la PBP2a de *S. aureus*. En esta se observan los tipos de interacciones entre las unidades monoméricas y la ampicilina con los aminoácidos de la PBP2a, en rosado se muestran las interacciones hidrofóbicas entre los ligandos y la proteína, en amarillo las electrostáticas y en verde la formación de puentes de hidrogeno. Los resultados de la interacciones entre las ampicilina con la PBP2a de *S. aureus* se presentan en la figura 2B, se observa que las interacciones hidrofóbicas se dieron entre el grupo fenilo de la ampicilina y la VAL A: 277 y entre el anillo de pirrolidina de PRO A: 370. Otras interacciones hidrofóbicas se dieron entre los metilenos  $\beta$ -lactámicos de ampicilina con el butilamino e isobutilo de LYS A: 382 y LEU A: 383, respectivamente. También se observó que la ampicilina exhibía un puente de hidrógeno (HB) con ASP A: 367 y una interacción electrostática con LYS A: 382.

En la figura 2C y 2D, se muestran los resultados de las interacciones del Eudragit en forma neutra y ionizada, respectivamente. El Eudragit E-100 en su forma iónica formó tres tipos de interacciones; hidrofóbicas, puente de hidrógeno y electrostáticas. Las interacciones hidrofóbicas fueron generadas por los grupos poliméricos de metil y butilmetacrilato y los anillos de imidazol y pirrolidina de HIS A: 351 y PRO A: 625., respectivamente. Las de puente de hidrógeno y electrostáticas, se produjeron entre el grupo dimetilaminoetilo (DMAE) del Eudragit E100 y ASN B: 555 y ASP A: 665 aminoácidos, respectivamente. En contraste las interacciones hidrofóbicas del Eudragit en su forma neutra se dieron entre el anillo de imidazol de LYS B: 319 y los sustituyentes poliméricos metacrilato de metilo y butilo, la formación de puentes de hidrógeno, se generaron entre el grupo de metilmetacrilato polimérico y el ácido carboxílico de ASP B: 320. De la misma forma, el nitrógeno del grupo polimérico DMAE generó tres puentes de hidrógeno con HIS B: 293, GLU B: 294 y ASP B: 275. Las interacciones electrostáticas del Eudragit en forma neutra fueron generadas entre el grupo dimetilaminoetilo y los aminoácidos GLU B: 294 y ASP B: 275. Estos resultados sugieren que el grado de ionización del Eudragit E 100 no afecta a la fuerza de interacción, pero si cambia el sitio de interacción de la PBP2a.

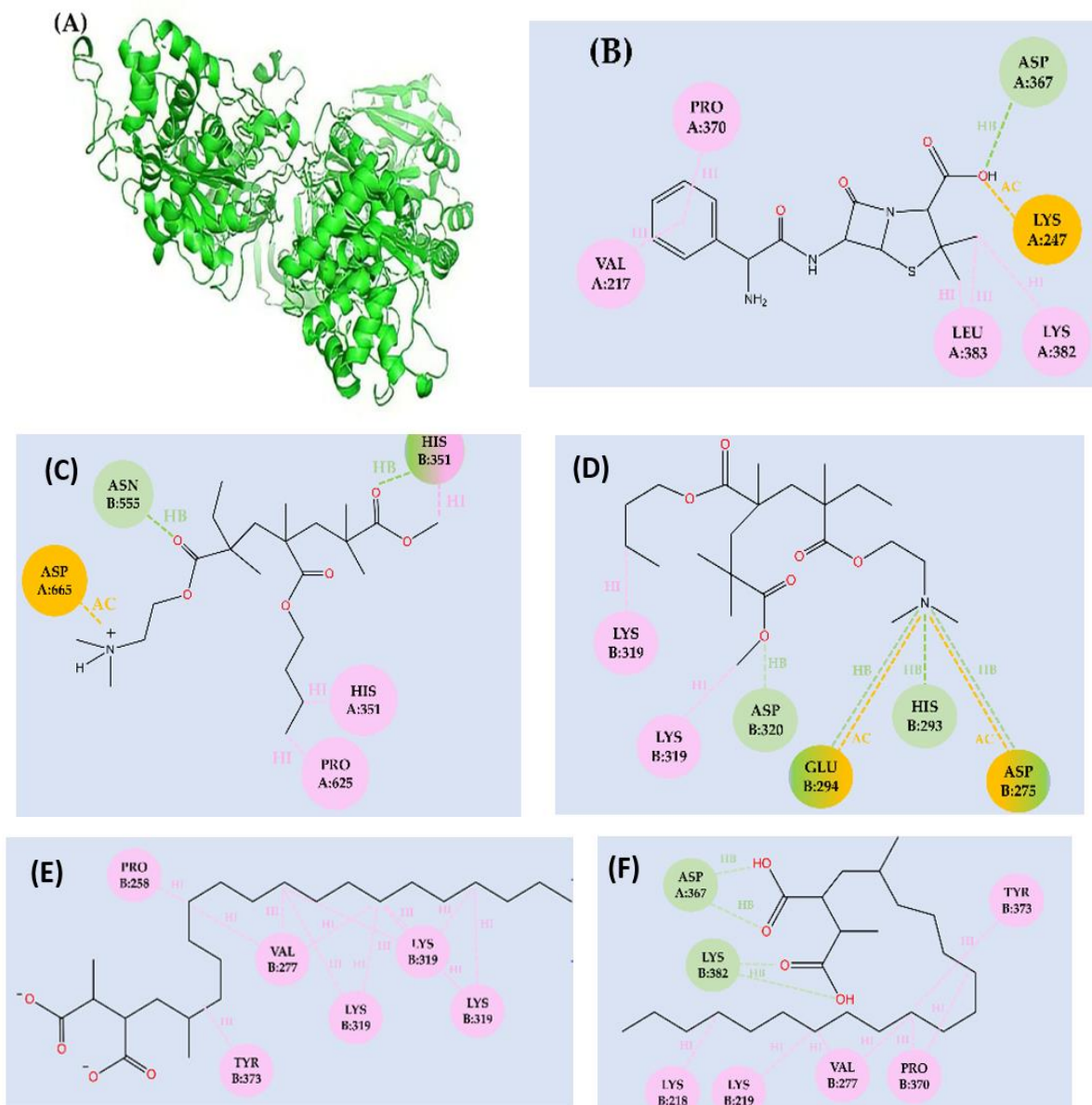
Las interacciones del PAM 18 en forma neutra y ionizada se muestran en la figura 2E y 2F, respectivamente. El PAM 18 Na en forma neutra mostró dos tipos de interacciones, hidrofóbicas y puentes de hidrógenos, las primeras se generaron entre la cadena de alquilo polimérico y los grupos pirrolidina, fenilo, isopropilo y butil-amino de PRO B: 370, TYR B: 373, VAL B: 279 y LYS B: 218-219 aminoácidos, respectivamente. Los puentes de hidrógenos se formaron entre los ácidos carboxílicos del polímero PAM-18 Na y aminoácidos ASP A: 367 LYS A: 382. Por el contrario en la unión del PAM 18 Na en forma iónica con la PBP2a, se obtuvieron sólo interacciones hidrofóbicas, estas formaron entre la cadena de alquilo polimérico y los grupos pirrolidina, fenilo, isopropilo y butilamino de los aminoácidos proteicos PRO B: 258, TYR B: 373, VAL B: 277 y LYS B: 319, respectivamente.

Los tipos y número de interacciones entre los ligandos con la PBP2a se presentan en la figura 3. Para el Eudragit en forma ionizada se obtuvieron 3 interacciones hidrofóbicas, 1 electrostática y se formaron 2 puentes de hidrógeno. En su estado neutro aumentó la formación de puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas 4 y 2, respectivamente pero disminuyeron las interacciones hidrofóbicas (2). El PAM 18 Na en forma neutra tuvo mayor número de interacciones (12), en comparación al Eudragit y la ampicilina, pero solo se obtuvieron interacciones hidrofóbicas. Por el contrario, el PAM 18 Na en forma iónica, se obtuvieron dos tipos de interacciones hidrofóbicas (7) y formación de puentes de hidrógeno (3).

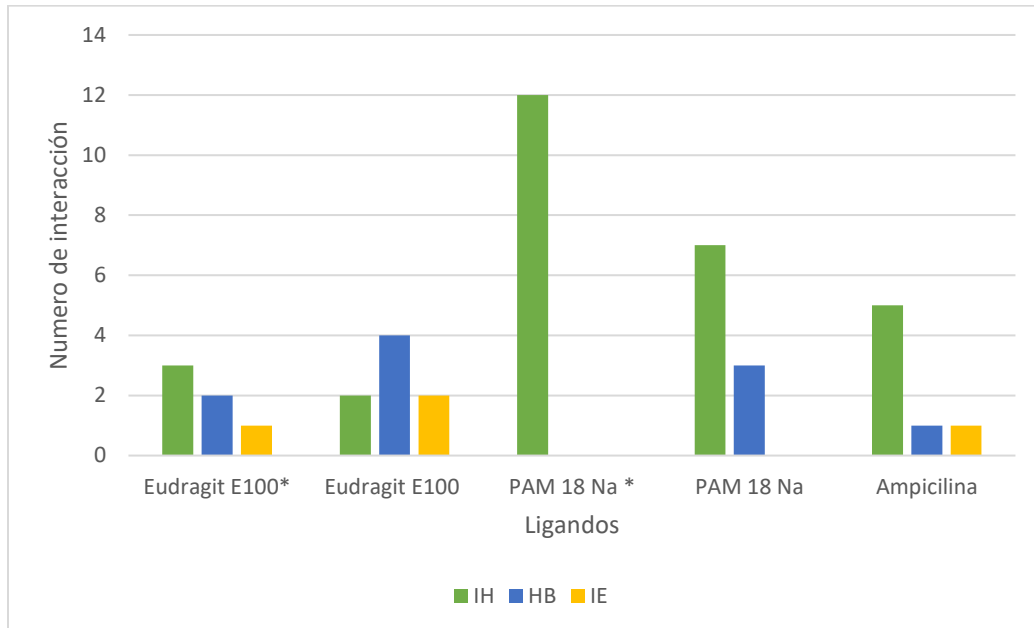
**Tabla 1.** Energías de unión de acoplamiento molecular entre ligandos con la PBP2a de *S. aureus* resistente a la meticilina. Los \* indican que el polímero está en forma ionizada.

Ligandos	Energía de unión (Kcal/mol)
Eudragit E100*	-4,6
Eudragit E100	-4,5
PAM 18 Na*	-5,2
PAM 18 Na	-4,7
Ampicilina	-6,4

**Figura 2.** Interacciones moleculares de ligandos con receptor en 2D. (A) Estructura cristalizada de la PBP2a de *S. aureus* resistente a la meticilina. (B) Interacciones entre ampicilina con la PBP2a (C) Interacciones entre Eudragit E100 (forma iónica) (D). Interacciones entre Eudragit E100 (forma neutral) con la PBP2a. (E). Interacciones entre PAM 18 Na (forma iónica) con la PBP2a. (F). Interacciones entre PAM 18 Na (forma neutral).



**Figura 3.** Tipos y número de interacciones entre ligandos con la PBP2a de *S. aureus* resistente a la meticilina. HB; Puente de hidrógeno, IE; interacción electrostática, IH; interacción hidrofóbica. Los \* indican que el polímero está en forma ionizada.



Debido a la problemática que representan las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina a nivel mundial por la falta de medicamentos para tratar las infecciones causadas por dichas bacterias resistentes, se ha puesto en relieve la necesidad de seguir desarrollando nuevas y diversas alternativas, como la síntesis de nuevos antibióticos [9]. Por tanto, estas estructuras poliméricas podrían considerarse para el recubrimiento de nanoliposomas cargados con antibióticos para mejorar la actividad antimicrobiana de dichos fármacos frente a cepas resistentes y, teniendo en cuenta que la ionización desempeña un papel importante en la solubilidad del fármaco, se optó por realizar las interacciones moleculares en su forma iónica y en su forma neutra. La mayoría de los fármacos son ácidos o bases orgánicas débiles que se encuentran en las formas ionizada y no ionizada en un entorno acuoso y, generalmente la forma ionizada suele ser más soluble en agua, mientras que la desionizada es absorbida con mayor facilidad en el tracto gastrointestinal por difusión pasiva. La forma no ionizada suele ser liposoluble (lipofílica) y difunde con facilidad a través de las membranas celulares. La forma ionizada es poco liposoluble (pero muy hidrosoluble, es decir, hidrofílica) y está sometida a una alta resistencia eléctrica, por lo que no le resulta fácil atravesar las membranas celulares [27].

#### 4. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

Las proteínas son macromoléculas involucradas en numerosas interacciones, estas pueden reaccionar con ácidos nucleicos, ligandos de moléculas pequeñas y proteínas, sin embargo, hasta el momento no se había estudiado la interacción con unidades monoméricas como el Eudragit E100 y PAM 18 Na [28]. Por lo tanto, es importante el estudio en profundidad de sus interacciones con la proteína PBP2a para comprender sus comportamientos. En estudios previamente publicados, el Eudragit E 100 y PAM 18 Na fueron empleados para el desarrollo de nanoliposomas cargados con ampicilina, ambos mostraron un aumento en la actividad antimicrobiana sobre cepas resistentes de *S. aureus* [15], [18] Los resultados de este estudio sugieren que ambos polímeros tienen una interacción poco significativa con la PBP2a de *S. aureus* (tabla 1). Por lo tanto, se puede establecer que los incrementos en la actividad antimicrobiana observados en dichos estudios dependen principalmente de la protección de la ampicilina por las nanoliposomas frente a las enzimas betalactamasas y no de la interacción con la proteína PBP2a [20]. Los resultados obtenidos son congruentes a los expuestos por Arévalo y Salamanca, en los que utilizaron el PAM 18 Na y Eudragit E100 para el recubrimiento de la ampicilina

en nanoliposomas, en donde, no se evidenció una actividad antimicrobiana marcada por parte de los polímeros en solitario contra cepas *S. aureus* resistente a la meticilina, por el contrario, cuando éstos eran utilizados para recubrir la ampicilina cargada en liposomas, la actividad antimicrobiana aumentaba considerablemente logrando obtener hasta un MIC de 25,2 a 1,41 µg/mL para cepas de *S. aureus* muy resistentes (ATCC 43300), como ocurrió en el caso del Eudragit E-100 [15], [18].

A pesar que la interacción entre el Eudragit E 100 y PAM 18 Na no mostraron una interacción termodinámica favorable en comparación a la ampicilina, la hipótesis de que dichos polímero pueden tener afinidades con otros componentes de la pared bacteriana externa de *S. aureus* no se descartan por completo. Foxley y col. revelaron que la polietilenimina (polímero obtenido a partir de monómeros de etilendiamina) se unía al ácido lipoteicoico en la pared celular de las cepas de MRSA, aumentando la actividad antibacteriana de la ampicilina, incluso superando a la de la vancomicina [29]. Otro aspecto importante en las interacciones de proteínas con ligandos es que la conformación y orientación pueden modificarse por diferentes grupos químicos de los polímeros [30].

#### 4. CONCLUSIONES

Los polímeros Eudragit E-100 y PAM-18Na mostraron una interacción poco favorable con la proteína PBP2a de *S. aureus* resistente a la meticilina. Por lo tanto, el aumento en la actividad antimicrobiana de los nanoliposomas formados con Eudragit E-100 y PAM-18Na y cargados con ampicilina descrita en estudios previos, podría atribuirse principalmente a un efecto protector de la ampicilina contra las enzimas β-lactamasas.

Los polímeros en su forma iónica y neutra no mostraron valores de la energía de unión similar, sin embargo se comportan de forma distinta en el sitio de unión de la PBP2a de *S. aureus*.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecerle a Dios por habernos permitido llegar hasta este punto. Por la oportunidad de presentar este trabajo y de lograr culminarlo. También, le agradecemos a nuestro tutor de tesis José Oñate y a nuestro cotutor Yamil Liscano, quiénes nos apoyaron y guiaron con sus conocimientos en cada una de las etapas de este proyecto.

También queremos agradecer a la Universidad, por brindarnos todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. Además, le agradecemos a Multidisciplinar y Digital Publishing Instituto o MDPI, por darnos la oportunidad de presentar junto al acompañamiento de nuestro cotutor y tutor, una comunicación corta relacionada a este trabajo y a publicaciones anteriores relacionadas a la temática, publicada por ellos y terceros.

Por último, queremos agradecer a todos nuestros compañeros y familia, por apoyarnos no solo con recursos, sino que también eran quiénes nos daban ánimos y nos alentaban a esforzarnos. En especial, queremos hacer mención de nuestros padres, que siempre estuvieron ahí presentes para darnos fuerzas y ser nuestro punto de apoyo.

#### 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] V. Thakur, A. Uniyal y V. Tiwari, Una revisión completa sobre la farmacología de las bombas de eflujo y sus inhibidores en la resistencia a los antibióticos. *Revista europea de farmacología*, pp. 174151, 2021.

[2] D. Sindeldecker y P. Stodley, The many antibiotic resistance and tolerance strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofilm*, pp. 100056, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2021.100056>

[3] D. Patiño, L. Pérez., *et al.* Uso de biocidas y mecanismos de respuesta bacteriana. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, Vol. 37, No. 3, pp. 1-17, 2018.

- [4] F. Edwards, *et al.* Antibiotic resistance, *Prevention and control of infection*, Medicine, Vol. 49, No. 10, pp. 632-637, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.07.006>
- [5] N. Makowska, *et al.* Urban wastewater as a conduit for pathogenic Gram-positive bacteria and genes encoding resistance to  $\beta$ -lactams and glycopeptides. *Science of The Total Environment*, 2021, Vol. 765, p. 144176.
- [6] J. da Silva, *et al.* A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 2018, Vol. 123, p. 385-392.
- [7] G. Petrunaro, Y. Mulla y T. Bollenbach, Antibiotic resistance: Insights from evolution experiments and mathematical modeling, *Current Opinion in Systems Biology*, pp. 100365, 2021.
- [8] M. Castellano y A. Perozo, Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*, *Kasmera*, Vol. 38, No. 1, pp. 18-25, 2010.
- [9] Y. Liscano, *et al.* *In Silico* Characterization of the Interaction between the PBP2a “Decoy” Protein of Resistant *Staphylococcus aureus* and the Monomeric Units of Eudragit E-100 and Poly (Maleic Acid-alt-Octadecene) Polymers. *Polymers*, 2021, Vol. 13, No 14, p. 2320.
- [10] J. Camarena, R. Sánchez. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia*, 1999, p. 1.
- [11] E. Cervantes, R. García y P. Salazar. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 2014, vol. 61, no 1, p. 28-40.
- [12] J. Boyce, *et al.* Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis. *Clinical infectious diseases*, 1993, Vol. 17, No 3, p. 496-504.
- [13] S. Chakraborty, *et al.* Isolation and identification of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* from post operative pus sample. *Al Ameen J Med Sci*, 2011, Vol. 4, No 2, p. 152-68.
- [14] Lam, I y Bittar, J. *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 2012, Vol. 84, No 4.
- [15] L. Arévalo, C. Yarce, J. Oñate y C. Salamanca. Decrease of Antimicrobial Resistance through Polyelectrolyte Coated Nanoliposomes Loaded with  $\beta$ -Lactam Drug, *Pharmaceuticals*, Vol. 12, No. 1, pp. 1, 2019.
- [16] Assoni, L., Milani, B., Carvalho, M. R., Nepomuceno, L. N., Waz, N. T., Guerra, M., Converso, T. R., & Darrieux, M. (2020). Resistance Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 11, 593215. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593215>
- [17] M. Aghdam., *et al.* Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release, *Journal of Controlled Release*, Vol. 315, pp. 1-22, 2019.
- [18] Pineda, D. Estudio del efecto de los sistemas poliméricos PAM-18 K2 y PAM-18 Na2 sobre los perfiles de disolución de comprimidos de ampicilina [Pregrado]. Universidad Icesi; 2013.
- [19] C. Salamanca., *et al.* Application of Nanoparticle Technology to Reduce the Anti-Microbial Resistance through  $\beta$ -Lactam Antibiotic-Polymer Inclusion Nano-Complex. *Pharmaceuticals*, Vol. 11, No. 1, pp. 19, 2018. <https://doi.org/10.3390/ph11010019>
- [20] S. Yuan, H. Chan y Z. Hu. Implementing WebGL and HTML5 in macromolecular visualization and modern computer-aided drug design. *Trends in biotechnology*, Vol. 35, No. 6, pp. 559-571, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.009>

- [21] L. Vignau. Selección de moléculas reguladoras de  $[Ca^{2+}]$  en miocitos mediante modelización molecular. Universidad del País Vasco, Donostia-San Sebastián, septiembre de 2018.
- [22] W, Delano. The PyMOL molecular graphics system. Available on: <https://pymol.org/2/> (accessed on 23 May 2021)
- [23] Trott, O; Olson, A. AutoDock Vina: mejora la velocidad y la precisión del acoplamiento con una nueva función de puntuación, optimización eficiente y subprocesos múltiples. *Revista de química computacional* 2010, 31(2), 455-461.
- [24] Kuhn, B.; Kollman, P.A. Binding of a diverse set of ligands to avidin and streptavidin: an accurate quantitative prediction of their relative affinities by a combination of molecular mechanics and continuum solvent models. *J. Med. Chem* 2000. 43, 3786–3791.
- [25] Y. Liu, M. Grimm, W, Dai, M. Hou, Z. Xiao, y Y. Cao. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 41, No. 1, 138-144, 2020.
- [26] BIOVIA. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, Dassault Systèmes 2017, San Diego, California, USA.
- [27] L. Monada. *Farmacocinética y farmacodinamia intracelular de antimicrobianos utilizados en la terapia de la mastitis subclínica bovina por Staphylococcus aureus*. 2017. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- [28] Hernández, R. La modificación covalente de proteínas. Un nivel cualitativamente superior de la información molecular. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Vol. 13, No. 1, pp. 20-35, 2014. <https://doi.org/10.1081/RRS 120037896>.
- [29] M. Foxley., *et al.* Efficacy of ampicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* restored through synergy with branched poly (ethylenimine). *The Journal of antibiotics*, Vol. 69, No. 12, pp. 871-878, 2016. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.44>.
- [30] Bronowska, A. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design: Interactions mediated by aromatic rings. En CPirajan, *Thermodynamics – Interaction Studies – Solids, Liquids and Gases*, pp. 1 - 49, 2011.