

ARTÍCULO ORIGINAL

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Mónica Tatiana Herrera¹, Jhon Jhamilton Artunduaga²,
Claudia Cristina Ortiz², Rodrigo Gonzalo Torres¹

¹ Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. Las nanopartículas poliméricas constituyen una herramienta nanotecnológica que podría ayudar a combatir los microorganismos patógenos que han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales.

Objetivo. Sintetizar nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina y vancomicina, y determinar su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

Materiales y métodos. Las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina y vancomicina se sintetizaron utilizando el método de emulsión y evaporación de solvente. Se caracterizaron mediante dispersión de luz en modo dinámico, electroforesis Doppler con láser y microscopía electrónica de barrido (S-TEM). Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de las nanopartículas de ácido poliláctico con ofloxacina contra *E. coli* O157:H7 y nanopartículas de ácido poliláctico con vancomicina contra SARM, mediante el método de microdilución en caldo.

Resultados. Se obtuvieron nanopartículas poliméricas con tamaños inferiores a 379 nm y carga superficial positiva de hasta 21 mV. Las nanopartículas cargadas con ofloxacina presentaron una concentración inhibitoria mínima (CIM₅₀) de 0,001 µg/ml frente a *E. coli* O157:H7, valor 40 veces menor que la concentración de antibiótico libre necesaria para lograr el mismo efecto (CIM₅₀=0,04 µg/ml). Para SARM, las nanopartículas mejoraron la potencia farmacológica *in vitro* de la vancomicina al exhibir una MIC₅₀ de 0,005 µg/ml, comparada con la de 0,5 µg/ml del antibiótico libre.

Conclusiones. Se mejoró el efecto antibacteriano de la ofloxacina y la vancomicina incorporadas en la matriz polimérica de ácido poliláctico. Las nanopartículas poliméricas constituirían una alternativa para el control de cepas bacterianas de interés en salud pública.

Palabras clave: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; nanopartículas antibacterianas.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995>

Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Introduction: Polymeric nanoparticles are promising nanotechnology tools to fight pathogenic bacteria resistant to conventional antibiotics.

Objective: To synthesize polylactic acid nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin, and to determine their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Materials and methods: We synthesized ofloxacin or vancomycin loaded polylactic acid nanoparticles by the emulsification-solvent evaporation method, and characterized them by dynamic light scattering, laser Doppler electrophoresis and scanning electron microscopy. We evaluated *in vitro* antibacterial activity of ofloxacin- and vancomycin-loaded polylactic acid nanoparticles against *E. coli* O157:H7 and MRSA using the broth microdilution method.

Results: Ofloxacin- and vancomycin-loaded polylactic acid nanoparticles registered a positive surface charge density of 21 mV and an average size lower than 379 nm. *In vitro* minimum inhibitory concentration

Contribución de los autores:

Mónica Tatiana Herrera: fase experimental y discusión de resultados

Jhon Jhamilton Artunduaga: asesoría de ensayos microbiológicos

Claudia Cristina Ortiz y Rodrigo Gonzalo Torres: concepción de la idea de investigación

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

(MIC₅₀) of ofloxacin-polylactic acid nanoparticles was 0,001 µg/ml against *E. coli* O157:H7, i.e., 40 times lower than the free ofloxacin (MIC₅₀: 0.04 µg/ml), indicating enhanced antibacterial activity while the *in vitro* MIC₅₀ of vancomycin-polylactic acid nanoparticles was 0,005 µg/ml against MRSA, i.e., 100 times lower than that of free vancomycin (MIC₅₀: 0.5 µg/ml).

Conclusion: Polymeric nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin showed a higher antibacterial activity. Polymeric nanoparticles are a possible alternative for drug design against pathogenic bacterial strains of public health interest.

Key words: *Escherichia coli*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; nanoparticles: antibacterial agents.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995>

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* constituyen especies bacterianas relevantes en salud pública debido a la alta prevalencia y complejidad de las enfermedades que causan (1), así como por su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos (2). Las infecciones ocasionadas por la cepa enterohemorrágica de *E. coli* O157:H7 producen complicaciones gastrointestinales que ocasionalmente conducen al síndrome urémico hemolítico, principalmente en la población infantil. El cuadro clínico se caracteriza por trombocitopenia, deficiencia renal y anemia (3).

El primer brote epidémico causado por *E. coli* O157:H7 se registró en Estados Unidos en 1982 debido al consumo de hamburguesas contaminadas con este agente, lo cual produjo diarrea con sangre y dolor abdominal grave entre las personas afectadas (4). En la década de los noventa, también se presentaron brotes en Canadá, Reino Unido, Bélgica, Irlanda, África y Nueva Zelanda (5-8). Dos de los mayores brotes se han registrado en Japón e Inglaterra. En 1996, en un comedor escolar de Japón, se diagnosticaron 7.966 casos, en 106 de los cuales se presentó el síndrome urémico hemolítico (9). Asimismo, en el brote en Inglaterra en el 2009, hubo 95 personas afectadas, 17 de las cuales desarrollaron un cuadro clínico más grave con deficiencia renal y anemia (10).

En Suramérica hay menos información sobre los brotes causados por *E. coli* O157:H7 debido a la falta de un sistema riguroso de vigilancia epidemiológica para este agente. No obstante, Argentina es uno de los países con mayor número de casos de

niños con diarrea con sangre (alrededor de 7 %) asociados a infecciones con esta cepa bacteriana (11). Del mismo modo, en algunas investigaciones en Colombia se ha encontrado una prevalencia de 4,7 % en niños afectados por *E. coli* O157:H7 causante de diarrea. Recientemente, esta condición ha sido categorizada como “enfermedad humana en progreso” por los organismos de vigilancia (12).

En cuanto a *S. aureus*, desde los años sesenta se han venido identificando cepas con resistencia a los antibióticos betalactámicos, como la penicilina y la meticilina causantes de infecciones, principalmente en hospitales. Las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) son responsables de enfermedades graves como la sepsis y la neumonía necrosante (13,14). La enfermedad infecciosa causada por SARM puede ser letal en pacientes inmunosuprimidos que se hayan contagiado mediante el contacto directo con un individuo portador o con dispositivos médicos contaminados, lo cual contribuye en gran medida a la colonización e invasión bacteriana (15).

En 1999, la causa de más de 25 % de las enfermedades registradas en Europa fue SARM (16), especialmente en Italia, con una incidencia de 35 % (17). Asimismo, 25 % de las enfermedades registradas en Estados Unidos se atribuyeron a cepas de *S. aureus* resistente a los antibióticos betalactámicos (18). En Latinoamérica ha habido un continuo incremento de las enfermedades infecciosas asociadas a SARM. Así, en el 2004, la prevalencia de *S. aureus* como agente infeccioso fue de 80 a 82 % en Perú y Chile, en tanto que en México fue de 52 %, en Colombia de 47 %, en Argentina de 42 % y en Venezuela de 25 % (19-21).

Hoy en día, los tratamientos disponibles para combatir las enfermedades infecciosas causadas por *E. coli* O157:H7 se centran en el uso de antibióticos del tipo de las quinolonas, por ejemplo, la ofloxacina, y en las causadas por SARM, se

Correspondencia:

Claudia Cristina Ortiz, Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Calle 9 Carrera 27, Edificio Camilo Torres, laboratorio 202, Bucaramanga, Colombia
Teléfono: (577) 634 4000, extensión 3404-1529
ortizc@uis.edu.co

Recibido: 04/08/15; aceptado: 16/05/16

emplean los glucopéptidos, como la vancomicina. A pesar de que ya hay cepas resistentes a estos antibióticos, se continúan prescribiendo para afecciones causadas por cepas sensibles, aunque desencadenan efectos secundarios (cefalea, anemia, trombocitopenia, diarrea) y, además, se sabe que son poco eficaces, principalmente por su baja solubilidad y la dificultad para llegar hasta su blanco terapéutico (13,22-24).

De allí la necesidad de alternativas que permitan contrarrestar las infecciones bacterianas causadas por *E. coli* O157:H7 y SARM. Una de las opciones promisorias para mejorar la eficacia y la biodisponibilidad de los antibióticos convencionales es su incorporación en polímeros biodegradables. Los antibióticos incorporados en una partícula polimérica de tamaño nanométrico tienen mejor solubilidad, distribución en los tejidos y penetración celular, con menor citotoxicidad y efectos secundarios, entre otras ventajas (1,24,25).

Las investigaciones en nanotecnología sobre el transporte de compuestos biológicamente activos hacia sitios de interés han resultado en el desarrollo de sistemas nanoestructurados con fines terapéuticos, como las nanopartículas poliméricas (26). Los polímeros biodegradables más empleados para la síntesis de nanopartículas han sido el ácido poliláctico y el ácido poliláctico coglicólico (*polylactic-co-glycolic acid*, PLGA) debido a que son materiales biocompatibles y presentan una liberación controlada del principio activo. Además, han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos (27,28).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) cargadas con ofloxacina (PLA-ofloxacina) y vancomicina (PLA-vancomicina) según su tamaño, forma, carga superficial neta y concentración de antibiótico en el polímero. Además, se determinó la actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* de la ofloxacina y la vancomicina en ácido poliláctico frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente.

Materiales y métodos

Reactivos y cepas bacterianas

El ácido poliláctico (con peso molecular, PM, de 85 a 160 kDa), la ofloxacina (OFLX, PM: 361,37 g/mol), la vancomicina (VCM, PM: 1485,71 g/mol), el poloxámero 407 (PM: 12,5 kDa) y la polietilimina

(PM: 2 kDa) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El acetonitrilo de máximo grado de pureza (*High Purity Liquid Chromatography*, HPLC) y el metanol en grado HPLC (MetOH) se obtuvieron de J.T. Baker. El diclorometano y el medio de cultivo de Mueller-Hinton (MH) se adquirieron de Merck. El medio de cultivo de infusión de cerebro y corazón (*Brain Heart Infusion*, BHI) se obtuvo de Oxoid. La cepa *E. coli* O157:H7 fue donada por la Escuela de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana y la cepa de *S. aureus* resistente a la metilicina (SARM) fue donada por la Escuela de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander. Las dos cepas bacterianas se mantuvieron en medio de cultivo BHI.

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina

Las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico se sintetizaron mediante el método de emulsión y evaporación de solvente descrito por Jeffery, *et al.* (29,30). Inicialmente, se preparó una solución de ofloxacina en ácido poliláctico en una relación de 1 a 5 en diclorometano. Esta primera solución se homogeneizó en un vórtex a 300 rpm durante 20 minutos y se la agregó a una fase acuosa formada por un agente estabilizante, el poloxámero (0,5 % p/v), y un agente catiónico, la polietilimina (0,0025 % p/v). Posteriormente, la mezcla se homogeneizó utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax® (IKA) a 15.500 rpm durante cinco minutos. El solvente orgánico se evaporó a presión de 120 mbar a 23 °C en un rotoevaporador Heidolph. Las nanopartículas se purificaron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 20 minutos, y se lavaron con agua desionizada. La emulsión blanquecina obtenida se almacenó bajo refrigeración a una temperatura entre 4 y 8 °C.

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con vancomicina

Las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico se sintetizaron según el método de doble emulsión y evaporación de solvente (31-33). Se preparó la primera emulsión de vancomicina en ácido poliláctico, usando diclorometano con una relación de medicamento y polímero de 1 a 5, y esta emulsión se añadió a la fase acuosa que contenía el poloxámero (0,5 % p/v) y la polietilimina (0,0025 % p/v). Estas dos fases se sometieron a emulsión utilizando el homogeneizador Ultra-Turrax® (IKA). El diclorometano se evaporó a presión reducida y las nanopartículas de vancomicina

en ácido poliláctico se purificaron mediante centrifugación y posteriormente se lavaron con agua desionizada. La emulsión final fue almacenada bajo refrigeración a temperaturas entre 4 y 8 °C.

Caracterización de las nanopartículas poliméricas

Se caracterizó el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante dispersión de luz dinámica. La carga superficial se determinó mediante el potencial zeta, utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano Series Nano-zs90, equipado con un láser operado a 633 nm, 25 °C y un ángulo de dispersión fijo de 90°. Las muestras se diluyeron diez veces con agua desionizada y cada medición se hizo por triplicado. También, se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas. Para ello, se usó el microscopio FEI Quanta 650 del Laboratorio de Microscopía del Parque Tecnológico de la Universidad Industrial de Santander. La concentración de antibiótico se determinó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Determinación de la concentración del antibiótico cargado en las nanopartículas de ácido poliláctico

Para determinar la cantidad de ofloxacina o vancomicina cargada en la matriz polimérica, las nanopartículas se centrifugaron durante 40 minutos a 12.000 rpm. El precipitado se disolvió en 1 ml de diclorometano, se añadieron 4 ml de solución tampón fosfato (pH 3) y se agitó durante 20 minutos con el fin de extraer el antibiótico de la solución tampón a partir de la solución orgánica. Después de separar las dos fases mediante decantación durante 30 minutos, la solución tampón se filtró y la concentración del medicamento se determinó mediante HPLC (34,35).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima

La actividad antibacteriana se evaluó mediante la metodología de microdilución en caldo (36,37). Inicialmente, se prepararon el preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo de Luria-Bertani (LB) y el de SARM en caldo de Muller-Hilton (MH) durante 12 a 14 horas a 37 °C y a 200 rpm. El inóculo final para cada cepa se ajustó a la escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/ml). La cinética de crecimiento de cada microorganismo se determinó mezclando una parte de suspensión bacteriana con una parte de suspensión de nanopartículas en diferentes concentraciones, utilizando los 96 pozos

de microplacas de la prueba ELISA, y se incubaron a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm durante ocho horas. Se tomaron muestras cada hora y se analizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Bio Rad, iMarck™) a 595 nm. Los ensayos se hicieron por triplicado con los respectivos controles de esterilidad del medio de cultivo (éste únicamente), el control de antibiótico (en ausencia de nanopartículas) y el control de crecimiento para cada bacteria (medio de cultivo más inóculo bacteriano). Las concentraciones inhibitorias mínimas de 50 % (CIM₅₀) y de 90 % (CIM₉₀) se definieron como la menor concentración del nanomaterial capaz de reducir la concentración bacteriana en un 50 y 90 %, respectivamente, en relación con el control de crecimiento y en ausencia de los inhibidores. Asimismo, se evaluó la actividad antibacteriana de los polímeros empleados en la síntesis de las nanopartículas (polietilenoimina 0,0025 % p/v y poloxámero 0,5 % p/v).

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM), se tomaron alícuotas 100 µl a partir de la CIM₅₀ determinada para cada bacteria, y para las concentraciones de nanopartículas cargadas con medicamento en las cuales no se evidenció crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µl que se agregó a 900 µl de caldo de cultivo BHI, con el fin de revitalizar las células bacterianas existentes. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los cultivos líquidos obtenidos se sembraron en superficies utilizando agar BHI en cajas de Petri durante 24 horas a 37 °C, con el fin de corroborar la ausencia de crecimiento bacteriano. Se definió la CBM como la menor concentración de nanopartículas que produjo una reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) mayor de 99,9 % en comparación con el inóculo sin tratamiento.

Resultados

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de ofloxacina y vancomicina en ácido poliláctico

Las nanopartículas poliméricas obtenidas se caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica, electroforesis Doppler con láser y microscopía electrónica de barrido (S-TEM) (figuras 1 y 2). El análisis mediante dispersión de luz dinámica (figuras 1A y 2A) y electroforesis Doppler con láser (figura 1B y 2B), evidenció la obtención de nanopartículas de tamaños hidrodinámicos de 348 a 379 nm y carga superficial máxima de +21 mV. La carga positiva de las nanopartículas se debió

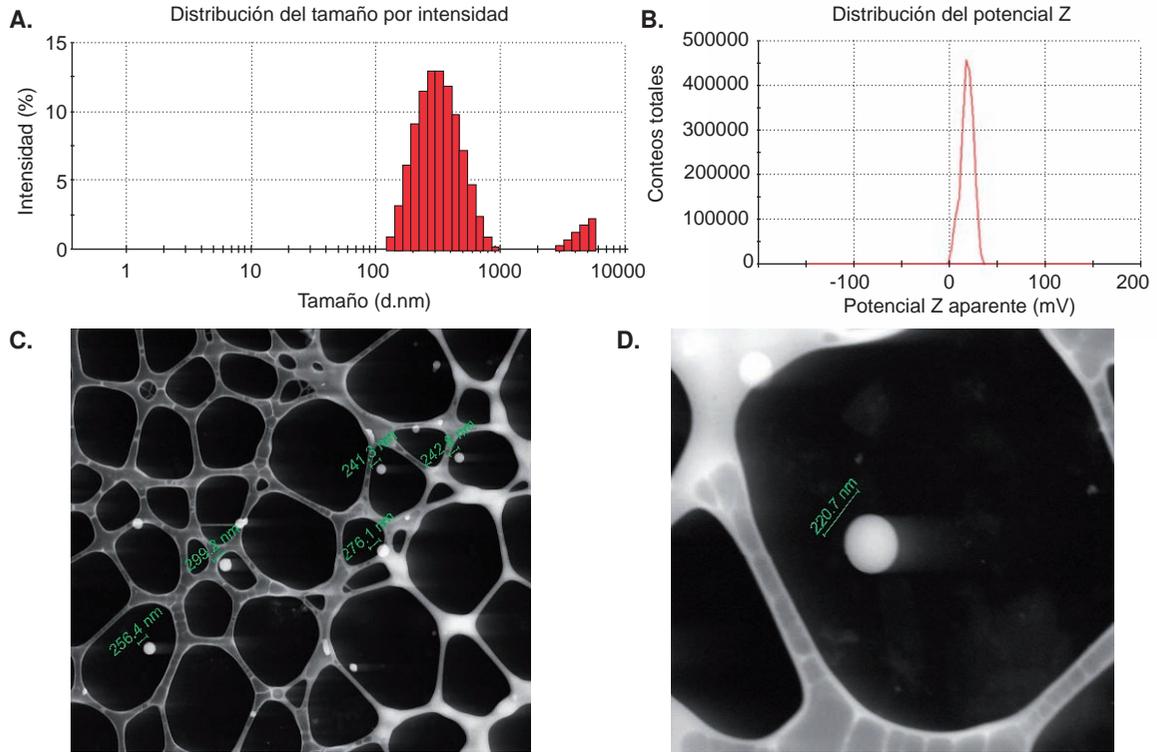


Figura 1. Caracterización de nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico. **A.** Dispersión de luz dinámica. **B.** Potencial zeta. **C.** y **D.** Imágenes en microscopía electrónica de barrido (S-TEM)

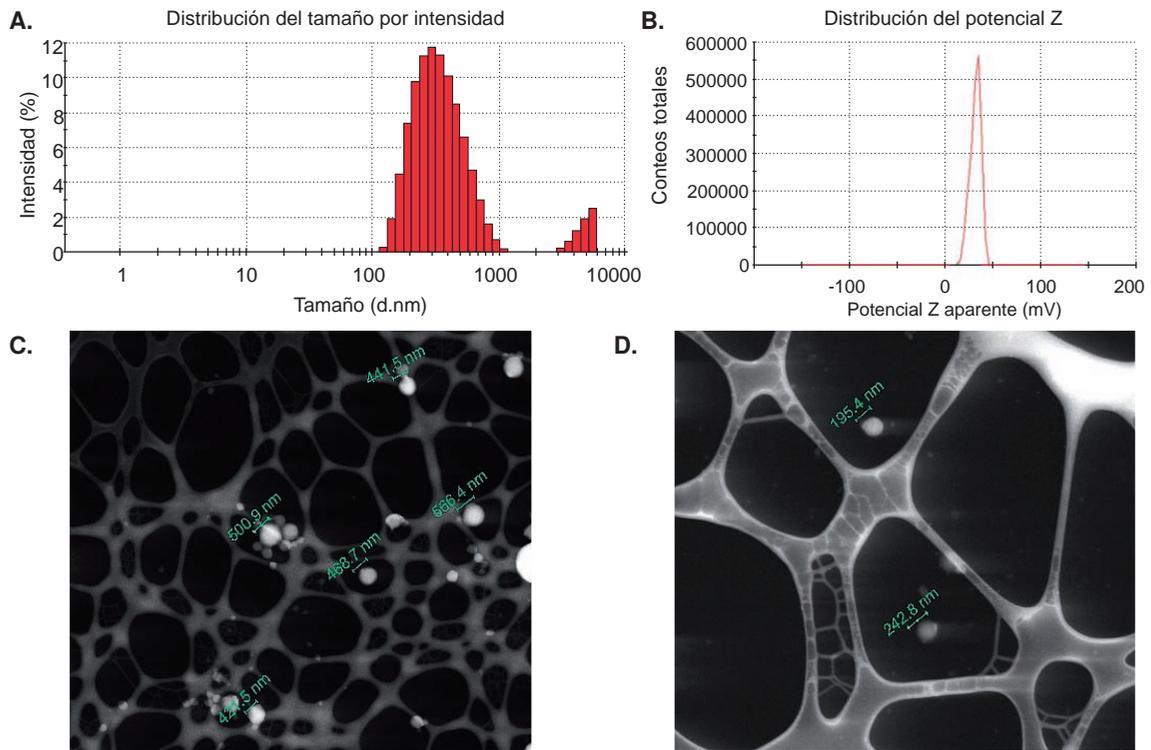


Figura 2. Caracterización de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico. **A.** Dispersión de luz dinámica. **B.** Potencial zeta. **C.** y **D.** Imágenes en microscopía electrónica de barrido (S-TEM)

a la presencia del agente catiónico polietilenimina, el cual también estabilizó la emulsión mediante repulsiones electrostáticas. Los tamaños menores de 379 nm y la carga superficial de las nanopartículas obtenidas fueron comparables e, incluso, mejores que las obtenidas por otros autores (38,39). En las microfotografías S-TEM se evidencian las nanopartículas monodispersas, sin agregados y de morfología esférica (figuras 1, C-D y 2, C-D). En el cuadro 1 se presenta un resumen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con los medicamentos.

Determinación de la concentración del antibiótico cargado en las nanopartículas

Mediante HPLC en fase inversa se determinó una concentración de la vancomicina en las nanopartículas de ácido poliláctico de 0,090 µg del medicamento por mg de polímero. Para la ofloxacina, se obtuvo una mayor concentración, de 0,73 µg de medicamento por mg de polímero (cuadro 1).

Actividad antibacteriana de las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos

En las figuras 3 y 4 se presentan la CIM_{50} , la CIM_{90} y la CBM de la ofloxacina y la vancomicina en ácido poliláctico, y de los medicamentos libres para las cepas patógenas estudiadas. Las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico inhibieron el 50 % de las células de *E. coli* O157:H7 en una concentración de 0,001 µg/ml, concentración 40 veces menor que la requerida por el antibiótico libre ($CIM_{50}=0,04$ µg/ml). En cuanto a SARM, la CIM_{50} obtenida de las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico fue de 0,005 µg/ml, la cual es 100 veces menor que la necesaria para que el antibiótico libre alcance el mismo efecto de inhibición ($CIM_{50}=0,5$ µg/ml). En el cuadro 2 se presenta el resumen de todos los resultados de actividad antibacteriana obtenidos. Los polímeros empleados en la síntesis de las nanopartículas, polietilenimina (0,0025 % p/v) y poloxámero 407 (0,5 % p/v), no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7 y SARM.

Discusión

Uno de los objetivos del empleo de nanopartículas poliméricas como dispositivos de entrega de medicamentos es optimizar su eficacia terapéutica. Se ha demostrado que los sistemas nanoestructurados son una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas; por ejemplo, las nanopartículas de rifampicina en alginato mejoraron la eficacia del

medicamento contra *Mycobacterium tuberculosis*, las nanoesferas de anfotericina en policaprolactona contra *Candida albicans* disminuyeron la toxicidad *in vivo* de la anfotericina, y las nanopartículas de ciprofloxacina en poliácido 'glicosilado' contra *S. aureus* mejoraron la biodisponibilidad de la ciprofloxacina (24).

En cuanto a los medicamentos de naturaleza hidrofóbica, el principal método empleado para la síntesis de nanopartículas poliméricas es el de emulsión y evaporación del solvente (13,40,41). Utilizando este método, las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico presentaron forma esférica y un tamaño promedio de 379 nm (figura 1, cuadro 1). Un posible mecanismo de formación de las nanopartículas poliméricas es la progresiva disminución del tamaño de las gotas de emulsión durante la evaporación del solvente (en este caso, diclorometano), hasta la obtención de las nanopartículas que se estabilizan debido a la presencia de agentes como la gelatina, el polivinilalcohol o los poloxámeros (42-44).

En este estudio se usó poloxámero 407 como agente emulsionante, el cual estabiliza las nanopartículas al absorberse en la superficie de las partículas formadas mediante interacciones hidrofóbicas por medio del bloque de óxido de polipropileno y el bloque hidrofílico (óxido de polietileno), los cuales se extienden hacia el medio acuoso. De esta manera, se forma una capa hidrofílica que estabiliza las nanopartículas de ácido poliláctico (45).

Algunos autores han empleado la técnica de emulsión y evaporación del solvente para encapsular medicamentos hidrofóbicos y han obtenido tamaños entre 0,2 y 8 µm (46,47). Sin embargo, son pocos los estudios en los cuales se ha implementado para la encapsulación de ofloxacina; por ejemplo, Abazinge, *et al.*, obtuvieron partículas entre 37 µm y 425 µm (38); Cheow, *et al.*, prepararon nanopartículas de alrededor de 360 nm (48), tamaños comparables con los obtenidos en este trabajo (<379 nm) (cuadro 1).

Por otro lado, las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico sintetizadas mediante el método de doble emulsión y evaporación del solvente, también se estabilizaron empleando poloxámero (49). Se ha descrito que la formación de las nanopartículas mediante esta técnica, se presenta en el momento de evaporación del solvente orgánico, proceso mediante el cual se acelera la precipitación del polímero atrapando el principio activo (antibiótico) y formando las partículas nanométricas (31). Algunos autores han obtenido

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de antibiótico en ácido poliláctico

Sistema nanoestructurado	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión (Pdl)	Potencial zeta (mV)	µg de antibiótico por mg de ácido poliláctico
Ofloxacina en ácido poliláctico	379,3±3,372	0,335±0,004	+ 16,4±3,70	0,730±5,4
Vancomicina en ácido poliláctico	348,2±8,869	0,299±0,002	+ 21,6±3,70	0,090±7,3

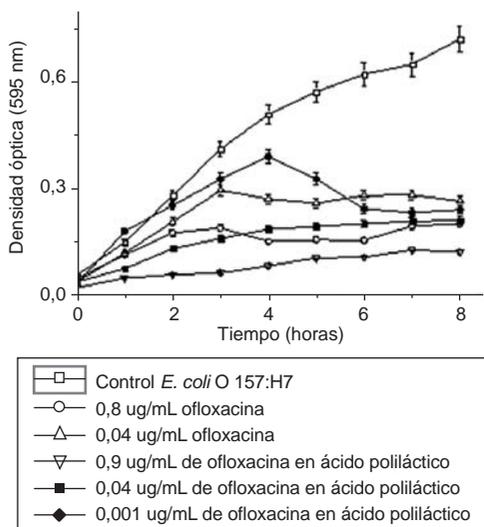


Figura 3. Actividad antibacteriana de ofloxacina libre y nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico frente a *E. coli* O157:H7 (ofloxacina libre, CIM₅₀=0,04 µg/ml, CIM₉₀>3,2 µg/ml; nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico, CIM₅₀=0,001 µg/ml, CIM₉₀>0,9 µg/ml). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

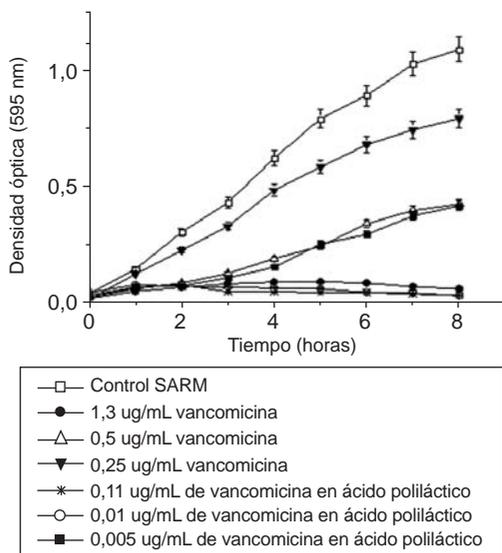


Figura 4. Actividad antibacteriana de vancomicina libre y nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico frente a SARM (vancomicina libre, CIM₅₀>0,5 µg/ml, CIM₉₀=1,3 µg/ml; nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico, CIM₅₀=0,005 µg/ml, CIM₉₀: 0,01 µg/ml). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

nanopartículas y micropartículas poliméricas cargadas con vancomicina con tamaños entre 466 nm y 11,8 µm (33,50). Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron nanopartículas esféricas con un tamaño promedio de 348 nm, resultados comparables e incluso mejores que los obtenidos en las investigaciones antes mencionadas.

Se considera que la técnica más adecuada para la preparación de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico y para la encapsulación de otras moléculas hidrosolubles como péptidos, proteínas y vacunas, es el método de síntesis de doble emulsión agua-aceite-agua (*water-oil-water*, W/O/W) y evaporación del solvente (51,52). Con esta técnica se han encapsulado diferentes sustancias de carácter hidrofílico, como la albúmina de suero bovino (35), así como la insulina y la lisozima (53), y los tamaños obtenidos fluctuaron entre 200 nm y 1.200 nm (39).

Con respecto a la concentración de la vancomicina en nanopartículas de ácido poliláctico (0,09 µg de vancomicina por mg de ácido), esta fue suficiente para evaluar el efecto antibacteriano. Sin embargo, fue difícil alcanzar una concentración mayor del medicamento, porque en la mayoría de moléculas hidrofílicas se presenta una rápida difusión en la fase acuosa durante la emulsión (54-56). La liberación rápida de vancomicina en ácido poliláctico se ve favorecida durante el proceso de evaporación del solvente, pues la sustancia encapsulada puede liberarse en la fase acuosa a través de poros presentes en las nanopartículas (31,39). Además, la baja concentración de antibiótico encapsulado podría deberse a la localización del medicamento en la superficie de las nanopartículas (57), el cual se elimina en el momento de la purificación (41).

Es importante mencionar que la cantidad de medicamento incorporada en el polímero depende de las interacciones entre este y la presencia de grupos funcionales como los ésteres o los carboxilos (58). En este contexto, para las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico se obtuvo una mayor concentración de antibiótico (0,73 µg de medicamento por mg de polímero), probablemente debido a una mayor interacción electrostática entre

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de compuestos contra *E. coli* O157:H7 y SARM

Cepa bacteriana	Compuesto	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)	CBM (µg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	Ofloxacina	0,040	>3,2	>3,2
	Ofloxacina en ácido poliláctico	0,0010	0,90	>0,90
SARM	Vancomicina	0,50	1,3	>2,0
	Vancomicina en ácido poliláctico	0,0050	0,010	>0,10

CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima de 50 %; CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima de 90 %; CBM: concentración bactericida mínima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

las cargas negativas de los grupos carboxilos terminales del ácido poliláctico (59) y las cargas positivas generadas en el nitrógeno de la piperazina presente en la ofloxacina (con valores de pH inferiores a pKa₁<6,08) (60).

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado una mayor eficacia de los antibióticos al estar incorporados en las nanopartículas poliméricas (25,61). En este trabajo, las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico como agente antibacteriano contra *E. coli* O157:H7 exhibieron un efecto 40 veces mayor que la CIM₅₀ del antibiótico libre (cuadro 2 y figura 3). El aumento de la actividad antibacteriana *in vitro* puede haberse debido a una mayor interacción entre la superficie de las nanopartículas y la membrana biológica (62). El aumento en la capacidad inhibitoria de la ofloxacina y de otras fluoroquinolonas ha sido objeto de las investigaciones de Jeong, *et al.*, quienes determinaron un incremento del 30 % en el efecto antibacteriano de la ciprofloxacina encapsulada en PLGA contra *E. coli* (63). De igual manera, se encontró que la ofloxacina encapsulada en liposomas aumentó dos veces la inhibición (CIM=0,0525 µg/ml) contra *E. coli* ATCC 25922, en comparación con el medicamento libre (CIM=0,12 µg/ml) (62). También, se evidenció la potencialización del efecto inhibitorio contra *E. coli* ATCC 35218 en más de 200 veces al emplear nanopartículas de ofloxacina en polietilenoacrilato (CIM=0,0005 µg/ml), en comparación con la ofloxacina (CIM=0,12 µg/ml) (64).

Cabe destacar que se han hecho pocos estudios empleando nanopartículas poliméricas de vancomicina contra SARM. En algunas investigaciones se ha observado una disminución de la eficacia antibacteriana contra *S. aureus* de la vancomicina en nanopartículas de ácido PLGA y polietilenglicol (CIM=128 µg/ml), en comparación con el antibiótico libre (CIM=32 µg/ml) (33). En otros casos, se ha reportado un aumento en la eficacia del medicamento al conjugarlo con vancomicina en nanopartículas de quitosano, cuya CIM contra *S. aureus* resistente a

vancomicina disminuyó hasta 97 % (65). Resultados similares se encontraron al usar nanopartículas de vancomicina conjugadas con oro y probadas frente a SARM, con una CIM₅₀ de 8 µg/ml, en comparación con los 64 µg/ml de la vancomicina libre (66). En esta investigación, el uso de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico redujo la CIM₅₀ contra SARM hasta en 100 veces comparada con la del antibiótico libre (cuadro 2; figura 4). En este caso, la mayor actividad antibacteriana de la vancomicina cargada en nanopartículas de ácido poliláctico se debió, posiblemente, a una mayor biodisponibilidad y entrega del medicamento (61). Asimismo, el incremento en la potencia del antibiótico puede responder a la penetración de las nanopartículas poliméricas de vancomicina en la membrana celular (65).

La actividad de los antibióticos mejoró ostensiblemente cuando se incorporaron en la matriz polimérica del ácido poliláctico. Los controles de polietilenoimina y de poloxámero 407 en las concentraciones empleadas en la síntesis (0,0025 % p/v y 0,5 % p/v, respectivamente), no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7 y SARM. Una de las principales características de las nanopartículas sintetizadas favorable para la actividad antibacteriana es la carga superficial positiva por la presencia de polietilenoimina (67) (cuadro 1). Se ha comprobado que la carga positiva en la superficie de las nanopartículas es un parámetro importante en el anclaje inicial sobre la superficie bacteriana, ya que genera uniones electrostáticas con la superficie negativa de las bacterias (68,69). Debe recordarse que la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas presenta una carga neta negativa, ya sea por la presencia de ácidos lipoteicoicos o ácidos teicoicos, o por los lipopolisacáridos y fosfolípidos que conforman la estructura celular (25,58).

Los resultados del presente trabajo demostraron que características tales como un tamaño inferior a 380 nm y la carga superficial positiva de las nanopartículas de ácido poliláctico, mejoraron la potencia farmacológica de los medicamentos contra

E. coli O157:H7 y SARM, por lo cual se plantean como una importante alternativa en la inhibición del crecimiento de este tipo de cepas patógenas multirresistentes. Además, es importante destacar que no se han publicado otros estudios sobre el tipo de nanoestructuras sintetizadas empleadas en este trabajo, por lo cual estos resultados constituyen una base para continuar el desarrollo de sistemas de entrega de medicamentos en nanopartículas de ácido poliláctico.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

La presente investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander y por Colciencias (Código de proyecto: 1102-5453-1674).

Referencias

1. **Turos E, Reddy GS, Greenhalgh K, Ramaraju P, Abeylath SC, Jang S, et al.** Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of β -lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg Med Chem.* 2007;17:3468-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.077>
2. **Sharpe JN, Shively EH, Polk HC.** Clinical and economic outcomes of oral linezolid versus intravenous vancomycin in the treatment of MRSA-complicated, lower-extremity skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Surg.* 2005;189:425-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2005.01.011>
3. **Wong C, Jelacic S, Habeeb R, Watkins S, Tarr P.** The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med.* 2000;342:1930-6. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200006293422601>
4. **Besser RE, Griffin PM, Slutsker L.** *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: An emerging infectious disease. *Annu Rev Med.* 1999;50:355-67. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.355>
5. **Ateba CN, Mbewe M.** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: Public health implications. *Res Microbiol.* 2011;162:240-8. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.355>
6. **Doyle MP.** *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol.* 1991;12:289-301. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90143-D](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90143-D)
7. **Thomas KM, McCann MS, Collery MM, Logan A, Whyte P, McDowell DA, et al.** Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *Int J Food Microbiol.* 2012;153:288-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.012>
8. **Xavier RN, Morgan HW, McDonald IR, Withers H.** Effect of long-term starvation on the survival, recovery, and carbon utilization profiles of a bovine *Escherichia coli* O157: H7 isolate from New Zealand. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:4383-90. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00045-14>
9. **Michino H, Akari K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, et al.** Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol.* 1999;150:787-96. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
10. **Pennington H.** *Escherichia coli* O157. *Lancet.* 2010;376:1428-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60963-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4)
11. **Park S, Worobo RW, Durst RA.** *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A literature review. *Crit Rev Biotechnol.* 2001;21:27-48. <http://dx.doi.org/10.1080/20013891081674>
12. **Piedrahíta D, Márquez T, Máttar S.** Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. *Rev MVZ Córdoba.* 2001;6:119-26.
13. **Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dhahi G, Echeita A, et al.** Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res Microbiol.* 2005;156:793-806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.006>
14. **Boucher HW, Corey GR.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008;46 (Suppl.5):S344-9. <http://dx.doi.org/10.1086/533590>
15. **Martínez E, Hernández C, Pallares C, Pacheco R, Hurtado K, Recalde M.** Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali - Colombia. *Infectio.* 2014;18:3-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(14\)70734-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(14)70734-9)
16. **Moellering RC.** MRSA: The first half century. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:4-11. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr437>
17. **Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2007;117:219-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006>
18. **Shopsin B, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:323-6.
19. **Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Álvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, et al.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34:304-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.06.005>
20. **González L, Cortés JA.** Revisión sistemática de la farmacoresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. *Biomédica.* 2014;34:180-97. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1550>
21. **Machuca MA, González CI, Sosa LM.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. *Biomédica.* 2014;34(Suppl.1):163-9. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1648>

22. **Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE.** Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:589-608. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl017>
23. **Schroeder CM, Zhao C, Debroy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, et al.** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:576-81. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.2.576>
24. **Zhang L, Pornpattananangku D, Hu C-MJ, Huang C-M.** Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem.* 2010;17:585-94. <http://dx.doi.org/10.2174/092986710790416290>
25. **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. *ACS Nano.* 2012;6:4279-87. <http://dx.doi.org/10.1021/nn3008383>
26. **Soppimath K, Aminabhavi, Rudzinski WE T, Kulkarni AR.** Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001;70:1-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
27. **Kumari A, Yadav SK, Yadav SC.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75:1-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
28. **Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ.** Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1018-29. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm310>
29. **Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT.** The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *Int J Pharm.* 1991;77:169-75. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90314-E](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(91)90314-E)
30. **Jones DS, Pearce KJ.** Contribution of process variables to the entrapment efficiency of propranolol hydrochloride within ethylcellulose microspheres prepared by the solvent evaporation method as evaluated using a factorial design. *Int J Pharm.* 1996;131:25-31. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04298-9](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(95)04298-9)
31. **Rosca ID, Watari F, Uo M.** Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release.* 2004;99:271-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007>
32. **Loveymi BD, Jelvehgari M, Zakeri-Milani P, Valizadeh H.** Statistical optimization of oral vancomycin-eudragit rs nanoparticles using response surface methodology. *Iran J Pharm Res.* 2012;11:1001-12.
33. **Lotfipour F, Abdollahi S, Jelvehgari M, Valizadeh H, Hassan M, Milani M.** Study of antimicrobial effects of vancomycin loaded PLGA nanoparticles against enterococcus clinical isolates. *Drug Res (Stuttg).* 2014;64:348-52. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1358747>
34. **Yang YY, Chia HH, Chung TS.** Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *J Control Release.* 2000;69:81-96. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00291-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00291-1)
35. **Yang YY, Chung TS, Ng NP.** Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials.* 2001;22:231-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00178-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2)
36. **Martínez-Gutiérrez F, Olive PL, Bañuelos A, Orrantía E, Niño N, Sánchez EM, et al.** Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine.* 2010;6:681-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>
37. **Paredes-Guerrero DJ.** Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (tesis). Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2011. p. 1-99.
38. **Abazinge M, Jackson T, Yang Q, Owusu-Ababio G.** Comparison of *in vitro* and *in vivo* release characteristics of sustained release ofloxacin microspheres. *Drug Deliv.* 2000;7:77-81. <http://dx.doi.org/10.1080/107175400266632>
39. **Hans ML, Lowman AM.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2002;6:319-27. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1)
40. **Li M, Rouaud O, Poncelet D.** Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* 2008;363:26-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>
41. **Wischke C, Schwendeman SP.** Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm.* 2008;364:298-327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>
42. **Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E.** Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996;143:133-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04697-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04697-2)
43. **Desgouilles S, Vauthier C, Bazile D, Vacus J, Grossiord JL, Veillard M, et al.** The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comprehensive study. *Langmuir.* 2003;19:9504-10. <http://dx.doi.org/10.1021/la034999q>
44. **Vauthier C, Bouchemal K.** Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res.* 2009;26:1025-58. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
45. **Redhead HM, Davis SS, Illum L.** Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: *In vitro* characterisation and *in vivo* evaluation. *J Control Release.* 2001;70:353-63. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00367-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00367-9)
46. **Cheng YH, Illum L, Davis SS.** A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *J Control Release.* 1998;55:203-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00056-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00056-X)
47. **Hermans K, van Den Plas D, Everaert A, Weyenberg W, Ludwig A.** Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82:27-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.003>

48. **Cheow WS, Hadinoto K.** Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;85:214-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.033>
49. **Moghimi SM, Hunter AC.** Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol*. 2000;18:412-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01485-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01485-2)
50. **Hachicha W, Kodjikian L, Fessi H.** Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. *Int J Pharm*. 2006;324:176-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.005>
51. **Schugens C, Laruelle N, Nihant N, Grandfils C, Jkrome R, Teyssi P.** Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation. *J Control Release*. 1994;32:161-76. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90055-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(94)90055-8)
52. **Makadia HK, Siegel SJ.** Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3:1377-97. <http://dx.doi.org/10.3390/polym3031377>
53. **Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A.** Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385:113-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
54. **Jalil R, Nixonts JR.** Review biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. *Microencapsulation*. 1990;7:297-325. <http://dx.doi.org/10.3109/02652049009021842>
55. **Hombreiro M, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, et al.** The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release*. 2000;65:429-38. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00253-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00253-9)
56. **Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P.** Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:8593-604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.057>
57. **Panyam J, William D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V.** Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2004;93:1804-14. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.20094>
58. **Mohanraj VJ, Chen Y.** Nanoparticles - A review. *Trop J Pharm Res*. 2007;5:561-73. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>
59. **Kim IS, Lee SK, Park YM, Lee YB, Shin SC, Lee KC, et al.** Physicochemical characterization of poly(l-lactic acid) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier. *Int J Pharm*. 2005;298:255-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.017>
60. **Okeri HA, Arhewoh IM.** Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials. *African J Biotechnol*. 2008;7:670-80. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB07.174>
61. **Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M.** Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9:1035-52. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.11.121>
62. **Puglisi G, Fresta M, Mazzone G, Furneri PM, Tempera G.** Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and *in vitro* antimicrobial activity. *Int J Pharm*. 1995;118:65-76. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00340-B](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(94)00340-B)
63. **Jeong Y II, Na HS, Seo DH, Kim DG, Lee HC, Jang MK, et al.** Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int J Pharm*. 2008;352:317-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001>
64. **Fresta M, Puglisi G, Giammona G, Cavallaro G, Micali N, Furneri PM.** Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J Pharm Sci*. 1995;84:895-902. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600840721>
65. **Chakraborty SP, Sahu SK, Mahapatra SK, Santra S, Bal M, Roy S, et al.** Nanoconjugated vancomycin: New opportunities for the development of anti-VRSA agents. *Nanotechnology*. 2010;21:105103. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/21/10/105103>
66. **Lai H-Z, Chen W-Y, Wu C-Y, Chen Y-C.** Potent antibacterial nanoparticles for pathogenic bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;73:2046-54. <http://dx.doi.org/10.1021/am507919m>
67. **Liu P-F, Lo C-W, Chen C-H, Hsieh M-F, Huang C-M.** Use of nanoparticles as therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Drug Metab*. 2009;10:875-84. <http://dx.doi.org/10.2174/138920009790274522>
68. **Panyam J, Labhasetwar V.** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:329-47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)
69. **Xie S, Tao Y, Pan Y, Qu W, Cheng G, Huang L, et al.** Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *J Control Release*. 2014;187:101-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.034>