

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO CARGADAS
CON ANTIBIÓTICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA
Escherichia coli O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA**

MÓNICA TATIANA HERRERA GAMBOA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO CARGADAS
CON ANTIBIÓTICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA
Escherichia coli O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA**

MÓNICA TATIANA HERRERA GAMBOA

**Trabajo de grado presentado como requisito
para optar al título de Químico**

Director:

RODRIGO TORRES SÁEZ *Ph.D*

Escuela de Química

Co-Director:

JHON ARTUNDUAGA BONILLA *MSc*

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza y paciencia para perseguir mis sueños.

A mis padres Santos Miguel Herrera y Heda Gamboa por apoyarme durante toda mi vida para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceras gracias al Doctor Rodrigo Torres y la Doctora Claudia Ortiz, por permitirme ser parte del grupo de investigación GIBIM, creer en mí al momento de desarrollar este proyecto y por cada una de las enseñanzas que recibí durante este proceso.

A todos mis compañeros del GIBIM, por ser parte de mi aprendizaje, por la colaboración recibida durante mi permanencia en el grupo.

A mis grandes amigos Mechas, Kathe, Gerly y Javier, por sus palabras de aliento en momentos difíciles y sus abrazos en momentos de alegría.

A Anderson Rodríguez Aguillón, por su infinita comprensión y amor.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1.1. REACTIVOS Y CEPAS BACTERIANAS	15
1.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA) CARGADAS CON OFLOXACINA (PLA-OFLOXACINA)	15
1.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLA CARGADAS CON VANCOMICINA (PLA-VANCOMICINA)	16
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	16
1.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO CARGADO EN LAS NANOPARTÍCULAS DE PLA	17
1.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	17
2. RESULTADOS.....	20
2.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLA- OFLOXACINA Y PLA-VANCOMICINA ..	20
2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO CARGADO EN LAS NANOPARTÍCULAS.....	22
2.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLA CARGADAS CON ANTIBIÓTICOS	23
3. DISCUSIÓN.....	26
4. CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. Caracterización de nanopartículas de PLA-ofloxacina (A) DLS (B) Potencial zeta (C) y (D) Imágenes S-TEM.....	20
Figura 2. Caracterización de nanopartículas de PLA-vancomicina (A) DLS (B) Potencial zeta (C) y (D) Imágenes S-TEM	21
Figura 3. Actividad antibacteriana de ofloxacina libre y nanopartículas de PLA-ofloxacina frente a <i>E. coli</i> O157:H7	23
Figura 4. Actividad antibacteriana de vancomicina libre y nanopartículas de PLA-vancomicina frente a SARM	24
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas PLA-antibiótico	22
Tabla 2. Actividad antibacteriana de compuestos contra <i>E. coli</i> O157:H7 y SARM	25

RESUMEN

TITULO: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO CARGADAS CON ANTIBIÓTICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA*

AUTOR: HERRERA GAMBOA, Mónica Tatiana**

PALABRAS CLAVES: Actividad antibacteriana, *E. coli* O157:H7, SARM, nanopartículas poliméricas, ácido poliláctico.

DESCRIPCIÓN

En los últimos años, las nanopartículas poliméricas han sido consideradas una herramienta nanotecnológica importante que podrían ayudar a combatir los microorganismos patógenos que han desarrollado resistencia frente a los antibióticos convencionales. En éste trabajo, se sintetizaron las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina y vancomicina, utilizando el método de emulsión evaporación de solvente (EES). Las nanopartículas se caracterizaron mediante las técnicas instrumentales de dispersión de luz en modo dinámico, electroforesis doppler con láser y microscopía electrónica de barrido. Además, se evaluó la actividad antibacteriana de las nanopartículas de ácido poliláctico-ofloxacina contra *Escherichia coli* O157:H7 y nanopartículas de ácido poliláctico-vancomicina contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *in vitro*, mediante el método de microdilución en caldo. Se obtuvieron nanopartículas poliméricas con tamaños inferiores a 379 nm y carga superficial positiva hasta 21 mV. Las nanopartículas cargadas con ofloxacina presentaron una CMI₅₀ de 0,001 µg/mL frente a *E. coli* O157:H7, valor 40 veces menor a la concentración de antibiótico libre necesaria para lograr el mismo efecto (CMI₅₀: 0,04 µg/mL). Para SARM, las nanopartículas poliméricas mejoraron la potencia del efecto antibacteriano *in vitro* de la vancomicina al exhibir una CMI₅₀ de 0,005 µg/mL, comparada con la CMI₅₀ de 0,5 µg/mL del antibiótico libre.

* Proyecto de Grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Co-Director: Jhon Artunduaga Bonilla.

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS OF POLYLACTIC ACID NANOPARTICLES LOADED WITH ANTIBIOTICS AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *Escherichia coli* O157: H7 AND *Staphylococcus aureus* RESISTANT TO METHICILLIN*

AUTHOR: HERRERA GAMBOA, Mónica Tatiana**

KEYWORDS: Antibacterial activity, *E. coli* O157:H7, MRSA, polymeric nanoparticles, polylactic acid.

DESCRIPTION

Polymeric nanoparticles are a promising nanotechnologic tool that could fight pathogenic bacteria that have developed resistance to conventional antibiotics. In this work, was aimed to synthesize polylactic acid nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin, by emulsification-solvent evaporation method (ESE). Nanoparticles were characterized by dynamic light scattering, *Laser Doppler electrophoresis* and scanning electron microscopy. *In vitro* antibacterial activity of ofloxacin-polylactic acid nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and vancomycin-polylactic acid nanoparticles against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were evaluated, *in vitro*, using broth microdilution method. The nanoparticles average size was less than 379 nm, with spherical shape and positive net surface charge up to 21 mV. Ofloxacin-polylactic acid nanoparticles showed a MIC₅₀ value of 0,001 µg/mL against *E. coli* O157:H7, 40 times enhanced antibacterial activity compared with free ofloxacin (MIC₅₀: 0,04 µg/mL). Vancomycin-polylactic acid nanoparticles improved *in vitro* antibacterial activity of vancomycin with a MIC₅₀ value of 0,005 µg/mL against Methicillin-resistant *S. aureus*, compared to MIC₅₀ value of 0,5 µg/mL of free antibiotic. The polylactic acid nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin have shown a higher antibacterial activity than free antibiotics against *E. coli* O157:H7 and Methicillin-resistant *S. aureus*, respectively. Polymeric nanoparticles constitute a possible alternative against bacterial strains of interest in public health.

* Bachelor Thesis

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Co-Director: Jhon Artunduaga Bonilla.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* constituyen especies bacterianas relevantes en salud pública, debido a la alta prevalencia y complejidad de las patologías que causan (Turos et al., 2007). Además cabe resaltar la notable capacidad que han tenido para desarrollar resistencia antibiótica (Sharpe, Shively, & Polk, 2005). Las infecciones ocasionadas por la cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 producen complicaciones gastrointestinales que ocasionalmente conducen hacia el síndrome urémico hemolítico (SUH), afectando principalmente a la población infantil. El cuadro clínico se caracteriza por trombocitopenia, deficiencia renal y anemia (Wong, Jelacic, Habeeb, Watkins, & Tarr, 2000).

El primer brote epidémico causado por *E. coli* O157:H7 fue registrado en Estados Unidos en 1982, debido al consumo de hamburguesas contaminadas con este agente y se caracterizó por un cuadro clínico de diarrea con sangre y dolor abdominal severo (Besser, Griffin, & Slutsker, 1999). También, en la década de los noventa se presentaron brotes en Canadá, Reino Unido, Bélgica, Irlanda, África y Nueva Zelanda (Ateba & Mbewe, 2011; Doyle, 1991; Thomas et al., 2012; Xavier, Morgan, McDonald, & Withers, 2014). Dos de los mayores brotes se han registrado en Japón e Inglaterra. En 1996 en un comedor escolar de Japón se diagnosticaron 7966 casos, de los cuales 106 casos presentaron el SUH (Michino et al., 2004). Asimismo, el brote ocurrido en Inglaterra en el año 2009 generó 95 casos, de los cuales, 17 desarrollaron un cuadro clínico más severo con deficiencia renal y anemia (Pennington, 2010).

En Suramérica hay menor información acerca de 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 que presenta mayor número de casos estimados de niños con diarrea con sangre (alrededor del 7%) asociados a infecciones con esta cepa bacteriana (11). Del mismo modo, algunas investigaciones en Colombia han mostrado una prevalencia del 4,7% en niños afectados por *E. coli* O157:H7 como causante de diarrea e incluso recientemente los organismos de vigilancia han categorizado como “enfermedad humana en progreso”, a la patología generada por la cepa enterohemorrágica de *E. coli* (Park, Worobo, & Durst, 2001; Piedrahita, Márquez, & Máttar, 2001).

En relación a *Staphylococcus aureus*, desde los años sesenta se han identificado cepas con resistencia a antibióticos betalactámicos como penicilina y meticilina, causantes de infecciones principalmente a nivel intrahospitalario. Desde entonces, estas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) son responsables de enfermedades severas como sepsis y neumonía necrotizante (Boucher & Corey, 2008; Mora et al., 2005). La enfermedad infecciosa causada por SARM puede ser letal en pacientes inmunosuprimidos que adquieren el microorganismo mediante el contacto directo con un individuo portador y con dispositivos médicos contaminados como catéteres, que contribuyen de forma importante a la colonización e invasión bacteriana (Martínez Buitrago et al., 2014).

En Europa en 1999, más del 25% de las enfermedades registradas fueron causadas por SARM (Moellering, 2012). Particularmente Italia con un 35% de

incidencia fue el país que presentó la mayor cantidad de infecciones causadas por esta cepa (Normanno et al., 2007). Igualmente, en Estados Unidos el 25% de las patologías registradas fueron atribuidas a cepas de *S. aureus* resistente a antibióticos betalactámicos (Shopsin & Kreiswirth, 2001). Respecto a Latinoamérica, se ha presentado un continuo incremento en las enfermedades infecciosas asociadas a la cepa meticilino resistente de *S. aureus*. Así, para el año 2004 la prevalencia de *S. aureus* como agente infeccioso fue entre el 80-82% en países como Perú y Chile. Otros países con notable prevalencia fueron México (52%), Colombia (47%), Argentina (42%) y Venezuela (25%) (Espinosa & Cortés, 2014; Guzmán-Blanco et al., 2009; Machuca, González, & Sosa, 2014).

Hoy en día, los tratamientos disponibles para combatir las enfermedades infecciosas causadas tanto por *E. coli* O157:H7 como por SARM tienen menor eficacia debido principalmente a la poca solubilidad de los medicamentos, la falta de control en el tratamiento y la resistencia quimioterapéutica a los antibióticos convencionales (Gemmell et al., 2006; Schroeder et al., 2002). Y adicionalmente, debido a la dificultad que tienen algunos medicamentos para llegar hasta su blanco terapéutico (Zhang, Pornpattananangku, Hu, & Huang, 2010).

En este sentido, existe la necesidad de generar 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,

presentan mejor solubilidad, distribución en los tejidos, penetración celular y además, disminución en la citotoxicidad o efectos secundarios, entre otras ventajas (Radovic-Moreno et al., 2012).

Las investigaciones en nanotecnología han explorado extensamente el transporte de compuestos biológicamente activos hacia sitios de interés, y como resultado, ha sido posible el desarrollo de sistemas nanoestructurados con fines terapéuticos, como las nanopartículas poliméricas (Soppimath, Aminabhavi, Rudzinski WE, & Kulkarni AR, 2001). Los polímeros biodegradables más empleados para la síntesis de nanopartículas han sido el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) debido a que son materiales biocompatibles y presentan una liberación controlada del principio activo. Además son polímeros aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos (Kumari, Yadav, & Yadav, 2010; Reinert et al., 2007).

Teniendo en cuenta las múltiples ventajas de las nanopartículas poliméricas, el objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) cargadas con ofloxacina (PLA-ofloxacina) y vancomicina (PLA-vancomicina). Las nanopartículas cargadas con antibiótico fueron caracterizadas en cuanto a su tamaño, forma, carga superficial neta y concentración de antibiótico cargado en el polímero. Adicionalmente, se determinó la actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* de las nanopartículas poliméricas de PLA-ofloxacina y PLA-vancomicina frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. REACTIVOS Y CEPAS BACTERIANAS

El ácido poli-láctico (PLA, PM 85-160 KDa), ofloxacina (OFLX, PM 361,37 g/mol), vancomicina (VCM, PM 1485,71 g/mol), poloxámero 407 (POLO, PM 12,5 KDa) y polietilenimina (PEI, PM 2 KDa) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El acetonitrilo grado HPLC (ACN) y metanol grado HPLC (MetOH) fueron obtenidos de J.T. BAKER. El diclorometano (DCM) y el medio de cultivo Mueller Hinton (MH) fueron adquiridos de MERCK. El medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) fue obtenido de OXOID. La cepa *Escherichia coli* O157:H7 fue donada por la Escuela de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia y la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) fue donada por la Escuela de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Las dos cepas bacterianas fueron mantenidas en medio de cultivo BHI.

1.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA) CARGADAS CON OFLOXACINA (PLA-OFLOXACINA)

Las nanopartículas de PLA-ofloxacina fueron sintetizadas mediante el método emulsificación- evaporación de solvente descrito por Jeffery y Jones (Jeffery, Davis, & O'Hagan, 1991; Jones & Pearce, 1996). Inicialmente se preparó una solución de PLA-ofloxacina en DCM. Esta primera solución se homogenizó en un vortex a 300 rpm/20 min y luego, se adicionó a una fase acuosa formada por un agente estabilizante, POLO (0,5% p/v) y un agente catiónico, PEI (0,0025% p/v).

Posteriormente, la mezcla se homogenizó utilizando un Ultra-Turrax® (IKA) a 15500 rpm durante 5 min. El solvente orgánico se evaporó a presión reducida en un rotoevaporador Heidolph. Las nanopartículas se purificaron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos, posteriormente y se lavaron con agua desionizada. La emulsión blanquecina obtenida fue almacenada bajo refrigeración a 4-8 °C.

1.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLA CARGADAS CON VANCOMICINA (PLA-VANCOMICINA)

Las nanopartículas de PLA-vancomicina se sintetizaron según el método de doble emulsión-evaporación de solvente (Lotfipour et al., 2013; Loveymi, Jelvehgari, Zakeri-Milani, & Valizadeh, 2012; Rosca, Watari, & Uo, 2004). Se preparó la primera emulsión de vancomicina-PLA (en relación 1:5, medicamento:polímero) en diclorometano y esta emulsión se añadió a la fase acuosa que contenía POLO (0,5% p/v) y PEI (0,0025% p/v). Estas dos fases se emulsificaron utilizando homogenizador Ultra-Turrax® (IKA). El solvente orgánico, diclorometano, fue evaporado a presión reducida y las nanopartículas de PLA-vancomicina fueron purificadas mediante centrifugación, posteriormente se lavaron con agua desionizada. La emulsión final fue almacenada bajo refrigeración a 4-8 °C.

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Se caracterizó el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante dispersión de luz en modo dinámico (DLS). La carga superficial se determinó a través del Potencial zeta (Pz) utilizando un equipo Zetasizer Nano Series Nano-zs90, equipado con un láser operando a 633 nm, a 25°C y un ángulo de dispersión fijo

de 90°. Las muestras se diluyeron 10 veces con agua desionizada y cada medición se realizó por triplicado. También, se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido en modo TEM (S-TEM) para determinar la morfología y 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, Piedecuesta, Colombia. Adicionalmente, la concentración de antibiótico se determinó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

1.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO CARGADO EN LAS NANOPARTÍCULAS DE PLA

Para determinar la cantidad de ofloxacina o vancomicina cargada en la matriz polimérica, las nanopartículas se centrifugaron durante 40 min a 12000 rpm. El precipitado se disolvió en 1 mL de DCM y se añadió 4 mL de solución tampón fosfato (pH 3). Se agitó durante 20 minutos con el fin de extraer el antibiótico a la solución tampón desde la solución orgánica. Después de separar las dos fases por medio de decantación durante 30 minutos, la solución tampón se filtró y la concentración del medicamento se determinó mediante HPLC (Yang, Chia, & Chung, 2000; Yang, Chung, & Ping Ng, 2001).

1.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

La actividad antibacteriana se evaluó mediante la metodología de microdilución en caldo (Martinez-Gutierrez et al., 2010; Paredes Guerrero, 2011). Inicialmente se preparó el preinóculo de *E. coli* O157:H7 y de SARM en caldo Luria-Bertani (LB) y caldo Muller-Hilton (MH), respectivamente, durante 12-14h a 37°C y 200 rpm. El

inóculo final para cada cepa se ajustó a la escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL). Posteriormente se determinó la cinética de crecimiento de cada microorganismo, mezclando una parte de suspensión bacteriana con una parte de suspensión de nanopartículas en diferentes concentraciones, utilizando los 96 pozos de microplacas de elisa. Se incubaron a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm durante ocho horas. Se tomaron muestras cada hora para ser analizadas en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado con los respectivos controles de esterilidad del medio del cultivo (medio de cultivo únicamente), el control de antibiótico (en ausencia de nanopartículas) y el control de crecimiento para cada bacteria (medio de cultivo más inóculo bacteriano). La concentración mínima inhibitoria al 50% (CMI₅₀) y 90% (CMI₉₀), fue definida 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, en ausencia de los inhibidores.

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se tomaron alícuotas 100 µL a partir de la CMI₅₀ determinada para cada bacteria y las concentraciones de nanopartículas cargadas con medicamento donde no se evidenció crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µL y fue agregada 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. Posteriormente, los cultivos líquidos obtenidos se sembraron en superficies, utilizando BHI-agar en cajas de Petri, durante 24 horas a 37°C. Esto con el fin de corroborar ausencia de crecimiento bacteriano. Se

definió la CMB como la menor concentración de nanopartículas que produjo una reducción de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) >99,9% en comparación con el inóculo sin tratamiento.

2. RESULTADOS

2.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLA- OFLOXACINA Y PLA-VANCOMICINA

Las nanopartículas poliméricas obtenidas fueron caracterizadas mediante DLS, Electroforesis Doppler con Láser y Microscopía Electrónica de Barrido (S-TEM), los resultados se presentan en la **Figura 1 y 2**.

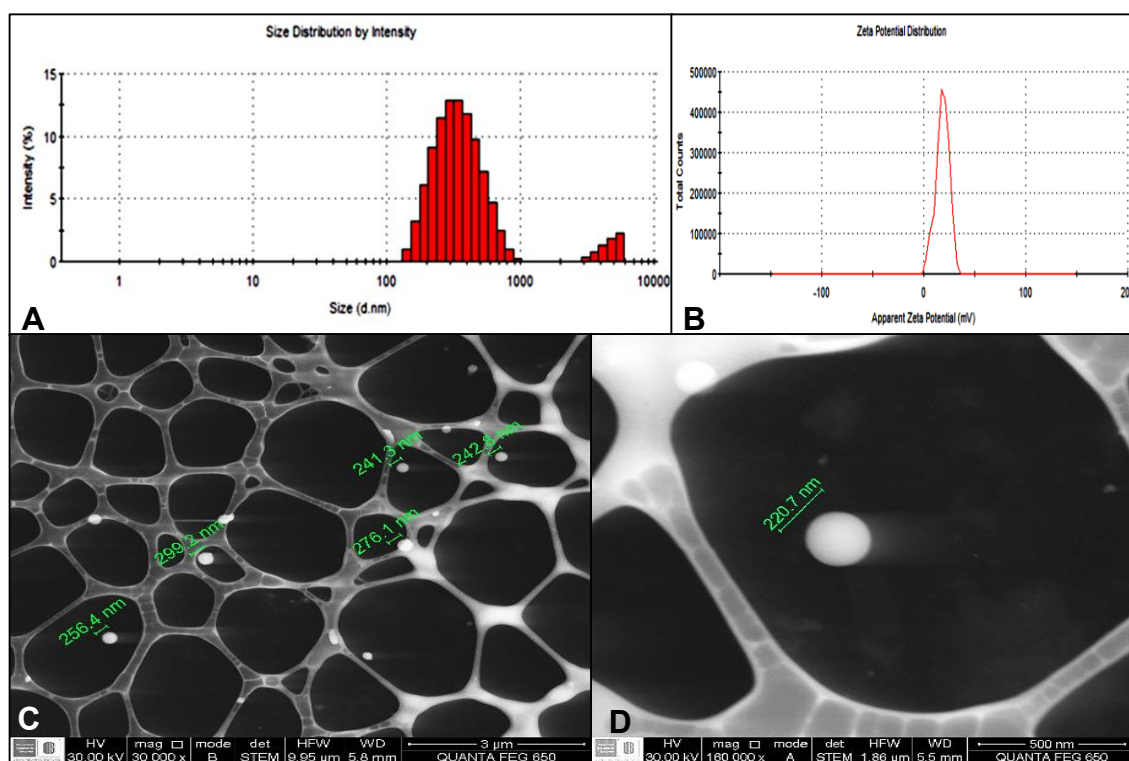


Figura 1. Caracterización de nanopartículas de PLA-ofloxacin (A) DLS (B) Potencial zeta (C) y (D) Imágenes S-TEM.

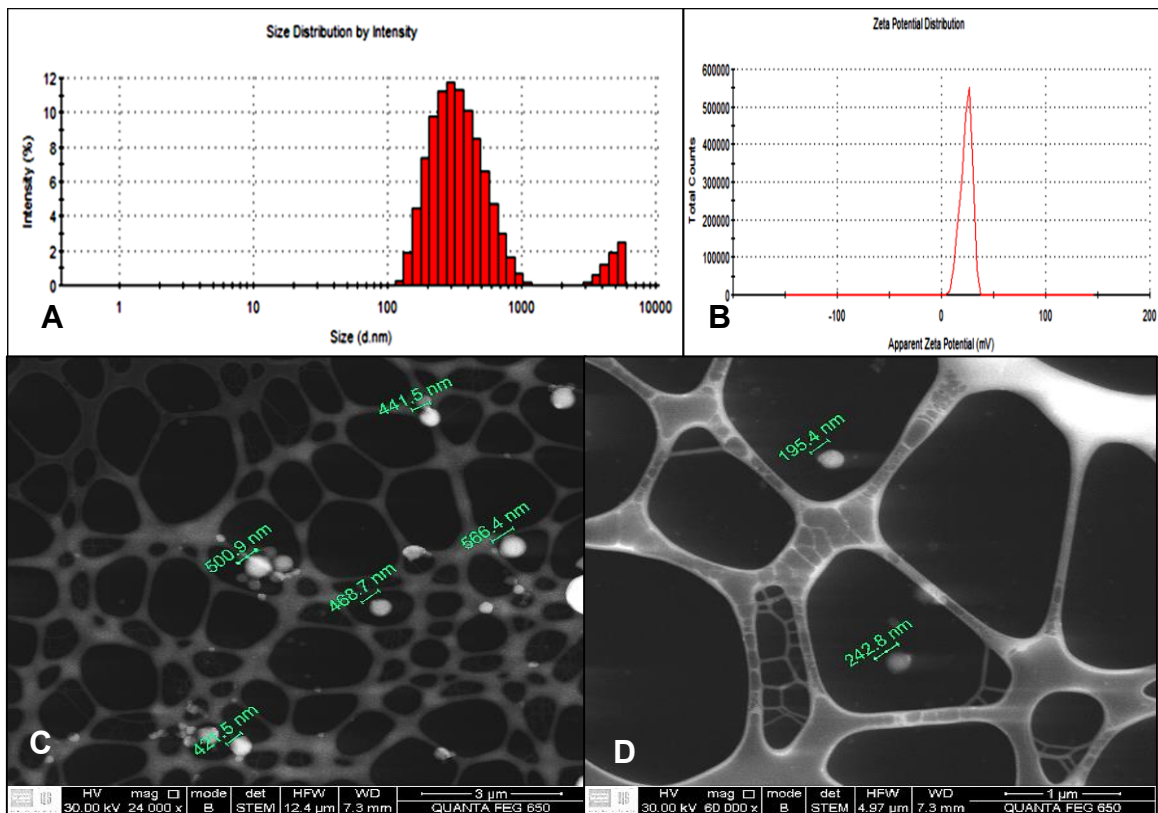


Figura 2. Caracterización de nanopartículas de PLA-vancomicina (A) DLS (B) Potencial zeta (C) y (D) Imágenes S-TEM.

El análisis mediante DLS (Ver **Figura 1A** y **2A**) y Electroforesis Doppler con Láser (Ver **Figura 1B** y **2B**), evidencian 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 a la presencia del agente catiónico PEI, que también estabilizó la emulsión por medio de repulsiones electrostáticas. Los tamaños menores a 379 nm y la carga superficial de las nanopartículas obtenidas son comparables e incluso mejores que las obtenidas por otros autores (Abazinge, Jackson, Yang, & Owusu-Ababio, 2000; Hans & Lowman, 2002). En las

microfotografías S-TEM, presentadas en las **Figuras 1C-D** y **2C-D**, se evidencian las nanopartículas monodispersas, sin agregados y morfología esférica.

En la **Tabla 1** se presenta un resumen de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas de PLA cargadas con los medicamentos.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas PLA-antibiótico

Sistema nanoestructurado	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión (Pdl)	Potencial zeta (mV)	µg antibiótico / mg PLA
NPs PLA- ofloxacina	379,3±3,372	0,335±0,004	+ 16,4±3,70	0,730±5,4
NPs PLA-vancomicina	348,2±8.869	0,299±0,002	+ 21,6±3,70	0,090±7,3

2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO CARGADO EN LAS NANOPARTÍCULAS

Por medio de HPLC en fase reversa, se determinó la concentración del medicamento hidrofílico vancomicina, en nanopartículas de PLA, la cual fue de 0,090 µg de vancomicina por mg de polímero. Para el antibiótico ofloxacina, se obtuvo una mayor concentración, de 0,73 µg de medicamento por mg de polímero (ver **Tabla 1**).

2.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS PLA CARGADAS CON ANTIBIÓTICOS

En las **Figura 3** y **4** se presentan los resultados de CMI₅₀, CMI₉₀ y CMB de las PLA-ofloxacina, PLA-vancomicina y los medicamentos libres frente, a las cepas patógenas estudiadas.

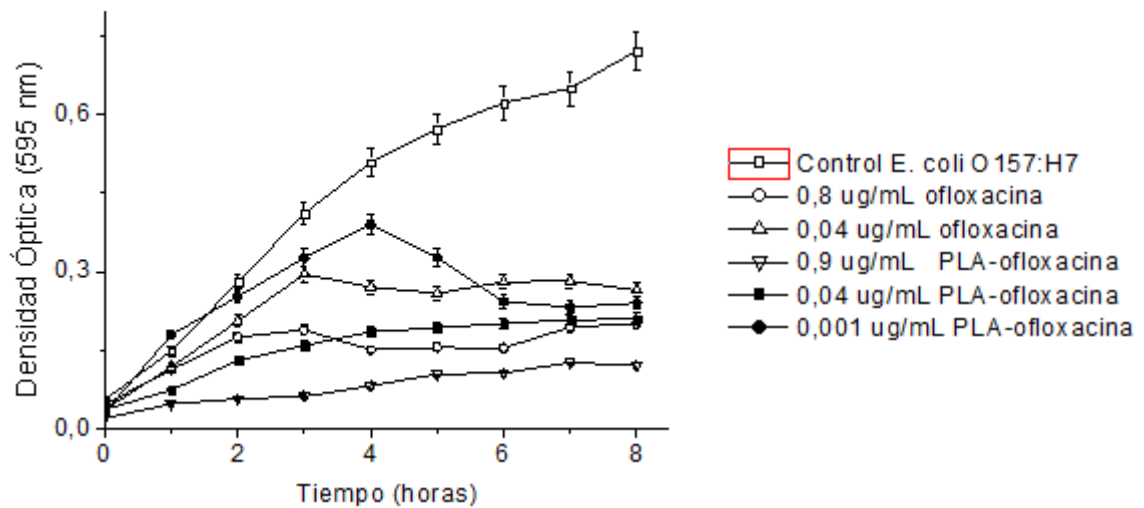


Figura 3 Actividad antibacteriana de ofloxacina libre y nanopartículas de PLA-ofloxacina frente a *E. coli* O157:H7. Ofloxacina libre: CMI₅₀: 0,04 µg/mL, CMI₉₀: > 3,2 µg/mL; Nanopartículas PLA-ofloxacina: CMI₅₀: 0,001 µg/mL, CMI₉₀: > 0,9 µg/mL.

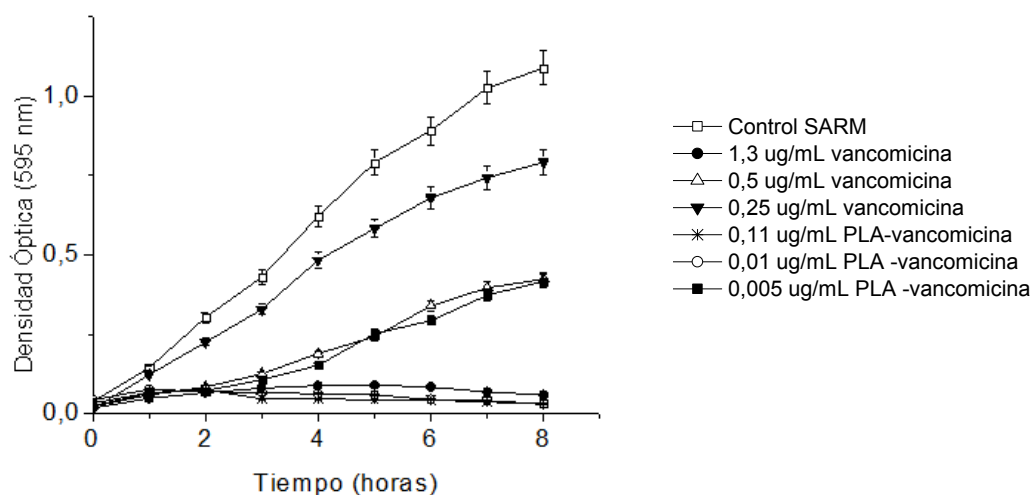


Figura 4. Actividad antibacteriana de vancomicina libre y nanopartículas de PLA-vancomicina frente a SARM. Vancomicina libre; CMI₅₀: 0,5 µg/mL, CMI₉₀: 1,3 µg/mL; Nanopartículas PLA-vancomicina: CMI₅₀: 0,005 µg/mL, CMI₉₀: 0,01 µg/mL

Las nanopartículas PLA- ofloxacina inhibieron el 50% de las células de *E. coli* O157:H7 a una concentración de 0,001 µg/mL, concentración 40 veces menor a la requerida por el antibiótico libre (CMI₅₀: 0,04 µg/mL). En relación con SARM, la CMI₅₀ obtenida de las nanopartículas PLA-vancomicina fue de 0,005 µg/mL; concentración que es 100 veces menor que la necesaria para lograr que el antibiótico libre alcance el mismo efecto de inhibición (CMI₅₀: 0,5 µg/mL).

En la **Tabla 2** se presenta el resumen de todos los resultados de actividad antibacteriana obtenidos.

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

CMI₅₀: Concentración mínima inhibitoria al 50%; CMI₉₀: Concentración mínima inhibitoria al 90%; CMB: Concentración mínima bactericida

Cepa bacteriana	Compuesto	CMI₅₀ (µg/mL)	CMI₉₀ (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>E. coli</i> O157:H7	Ofloxacina	0,040	> 3,2	> 3,2
	PLA- ofloxacina	0,0010	0,90	> 0,90
SARM	Vancomicina	0,50	1,3	> 2,0
	PLA-vancomicina	0,0050	0,010	> 0,10

3. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de emplear nanopartículas poliméricas como dispositivos de entrega de medicamentos, es optimizar su eficacia terapéutica. Se ha demostrado que los sistemas nanoestructurados son una potencial alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas; por ejemplo, las nanopartículas de alginato-rifampicina, mejoraron la eficacia de rifampicina contra *Mycobacterium tuberculosis*; las nanoesferas de policaprolactona-anfotericina contra *Candida albicans*, que disminuyeron la toxicidad *in vivo* de anfotericina y las nanopartículas de poliacrilato glicosilado-ciprofloxacina contra *S. aureus*, las cuales mejoraron la biodisponibilidad de ciprofloxacina (Zhang et al., 2010).

En relación con los medicamentos de naturaleza hidrofóbica, el principal método empleado para la síntesis de nanopartículas poliméricas, es el de emulsificación- evaporación de solvente (Li, Rouaud, & Poncelet, 2008; Mora et al., 2005; Wischke & Schwendeman, 2008). Utilizando este método, las nanopartículas de PLA- ofloxacina presentaron forma esférica con tamaño promedio de 379 nm (Ver **Figura 1, Tabla 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 gelatina, polivinilalcohol o poloxámeros (Desgouilles et al., 2003;

Quintanar-Guerrero, Fessi, Allémann, & Doelker, 1996; Vauthier & Bouchemal, 2009).

En este estudio se usó POLO 407 como agente emulsificante, el cual estabiliza las nanopartículas al absorberse a la superficie de las partículas formadas mediante interacciones hidrofóbicas a través del bloque de óxido de polipropileno (PEO) y el bloque hidrofílico (óxido de polietileno-POE), que se extiende hacia el medio acuoso. De esta manera se forma una capa hidrofílica que es la que estabiliza a las nanopartículas de PLA (Redhead, Davis, & Illum, 2001).

Algunos autores han empleado la técnica de emulsificación-evaporación de solvente para encapsular medicamentos hidrofóbicos, obteniendo tamaños entre 0,2-8 μm (Cheng, Illum, & Davis, 1998; Hermans, Van Den Plas, Everaert, Weyenberg, & Ludwig, 2012). Sin embargo, son pocos los estudios que han implementado este método para la encapsulación de ofloxacina; por ejemplo, Abazinge *et al.* 2000, obtuvo un tamaño de partícula entre 37 μm y 425 μm (Abazinge *et al.*, 2000); Cheow y Hadinoto, prepararon nanopartículas de alrededor de 360 nm (Cheow & Hadinoto, 2011), tamaños comparables con los obtenidos en este trabajo (< 379 nm) (Ver **Tabla 1**).

Por otro lado, las nanopartículas de PLA-vancomicina sintetizadas mediante el método de doble emulsión-evaporación de solvente, también fueron estabilizadas empleando POLO (Moghimi & Hunter, 2000). 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 (Rosca et al., 2004). Algunos autores han obtenido nanopartículas y micropartículas poliméricas cargadas con vancomicina de tamaños entre 466 nm y 11,8 μm (Hachicha, Kodjikian, & Fessi, 2006; Lotfipour et al., 2013). Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron nanopartículas esféricas de tamaño promedio de 348 nm, resultados comparables e incluso mejores que las obtenidas en las investigaciones antes mencionadas.

Para la preparación de nanopartículas PLA-vancomicina, el método de síntesis doble emulsión agua-aceite-agua (W/O/W) evaporación de solvente, es considerado como la técnica más adecuada, al igual que para la encapsulación de otras moléculas hidrosolubles como péptidos, proteínas y vacunas (Makadia & Siegel, 2011; Schugens et al., 1994). Por medio de ésta técnica, se han encapsulado diferentes sustancias de carácter hidrofílico como albúmina de suero bovino (BSA) (Yang et al., 2001), insulina y lisozima (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010), y los tamaños obtenidos han sido desde 200 nm hasta 1200 nm (Hans & Lowman, 2002).

Con respecto a la concentración del medicamento hidrofílico vancomicina en nanopartículas de PLA (0,09 μg de vancomicina por mg de PLA), fue suficiente para evaluar el efecto antibacteriano. Sin embargo, fue difícil alcanzar mayor concentración del medicamento porque en la mayoría de moléculas hidrofílicas, se presenta una rápida difusión dentro de la fase acuosa durante la emulsificación

(Hombreiro Pérez et al., 2000; Jalil & Nixonts, 1990; Vrignaud, Benoit, & Saulnier, 2011). La liberación rápida de vancomicina en PLA es favorecida durante el proceso de evaporación de solvente, pues la sustancia encapsulada puede liberarse a la fase acuosa, a través de poros presentes en las nanopartículas (Hans & Lowman, 2002; Rosca et al., 2004). Adicionalmente, la baja concentración de antibiótico encapsulado puede deberse a que el medicamento se encuentra en la superficie de las nanopartículas (Panyam, William, Dash, Leslie-Pelecky, & Labhasetwar, 2004) y se elimina al momento de la purificación (Wischke & Schwendeman, 2008).

Es importante mencionar que la cantidad de medicamento incorporado en el polímero es dependiente de las interacciones entre el polímero y la presencia de grupos funcionales como ésteres o carboxilos (Mohanraj & Chen, 2007). En este contexto, para las nanopartículas de PLA-ofloxacina, se obtuvo mayor concentración de antibiótico (0,73 µg de medicamento por mg de polímero), probablemente, debido a una mayor interacción electrostática entre las cargas negativas de los grupos carboxilos terminales del PLA (Kim et al., 2005) y las cargas positivas generadas en el nitrógeno de la piperazina presente en la ofloxacina (a valores de pH inferiores a $pK_{a1} < 6,08$) (Okeri & Arhewoh, 2008).

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado el mejoramiento de la eficacia de los antibióticos al estar incorporados en las nanopartículas poliméricas (Allahverdiyev, Kon, Abamor, Bagirova, & Rafailovich, 2011; Radovic-Moreno et al., 2012). En este trabajo, las nanopartículas de PLA-ofloxacina como agente

antibacteriano contra *E. coli* O157:H7, exhibieron un efecto potencializado 40 veces mayor que el obtenido con la CMI₅₀ del antibiótico libre (ver **Tabla 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 (Giovanni Puglisi a & C, 1995). El aumento en la capacidad inhibitoria de ofloxacin, y de otras fluoroquinolonas, se ha estudiado en investigaciones realizadas por Jeong y colaboradores, quienes determinaron un incremento del 30% del efecto antibacteriano de ciprofloxacina encapsulada en ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) contra *E. coli* (Jeong et al., 2008). De igual manera, se encontró que la ofloxacin encapsulada en liposomas aumentó la inhibición dos veces (CMI 0,0525 µg/mL) en comparación con el medicamento libre (CMI 0,12 µg/mL) contra *E.coli* ATCC 25922 (Giovanni Puglisi a & C, 1995). También, se evidenció la potencialización del efecto inhibitorio en más de 200 veces al emplear nanopartículas de ofloxacin-PECA (polietilencianoacrilato) (CMI 0,0005 µg/mL) en comparación con ofloxacin (CMI 0,12 µg/mL) contra *E. coli* ATCC 35218 (Fresta et al., 1995).

Cabe destacar que se han realizado pocos estudios empleando nanopartículas poliméricas de vancomicina contra SARM. Algunas investigaciones han mostrado resultados en los cuales se observó una disminución en la eficacia antibacteriana contra *S. aureus*, de nanopartículas de PLGA-PEG-vancomicina (CMI 128 µg/mL), en comparación al antibiótico libre (CMI 32 µg/mL) (Loffipour et al., 2013). En otros casos, se ha indicado un aumento en la eficacia del medicamento, al conjugarse

vancomicina en nanopartículas de quitosano, las cuales disminuyeron hasta el 97% en el valor de CMI contra *S. aureus* resistente a vancomicina (Chakraborty et al., 2010). Resultados similares se encontraron al usar nanopartículas de vancomicina conjugadas con oro y probadas frente a SARM, con un CMI₅₀ de 8 µg/mL, en comparación a CMI₅₀ de 64 µg/mL, para vancomicina libre (Lai, Chen, Wu, & Chen, 2015). En esta investigación, el uso de nanopartículas de PLA-vancomicina redujo el CMI₅₀ contra SARM, hasta en un valor 100 veces menor comparado con el antibiótico libre (Ver **Tabla 2**; **Figura 4**). En este caso, la actividad antibacteriana mejorada de la vancomicina cargada en nanopartículas de PLA, es debida posiblemente a una mayor biodisponibilidad y entrega del medicamento (Allahverdiyev et al., 2011). Asimismo, el incremento en la potencia del antibiótico, puede ser causada por la penetración de las nanopartículas poliméricas de vancomicina dentro de la membrana celular (Chakraborty et al., 2010).

La actividad antibacteriana de los antibióticos fue claramente mejorada cuando se incorporaron en la matriz polimérica de PLA, teniendo en cuenta que la actividad antibacteriana fue causada únicamente a los medicamentos ofloxacina y vancomicina, debido a que la presencia de PEI a la concentración empleada (0,0025% p/v) y de POLO 407 (0,5% p/v) no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7 y SARM. Una de las principales características de las nanopartículas sintetizadas que favoreció la actividad antibacteriana es la carga superficial positiva por la presencia de PEI (Liu, Lo, Chen, Hsieh, & Huang, 2009)

(Ver **Tabla 1**). Se ha evidenciado 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 (Panyam & Labhasetwar, 2003; Xie et al., 2014). Es necesario mencionar que la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, presentan una carga neta negativa, ya sea por la presencia de ácidos lipoteicoicos, ácido teicoicos o por los lipopolisacáridos y fosfolípidos que conforman la estructura celular (Mohanraj & Chen, 2007; Radovic-Moreno et al., 2012).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demostraron que características como un tamaño inferior a 380 nm y la carga superficial positiva de las nanopartículas de PLA, mejoraron la potencia farmacológica de los medicamentos contra *E. coli* O157:H7 y SARM, considerándose como una importante alternativa en la inhibición del crecimiento de este tipo de cepas patógenas multidrogo-resistentes. Adicionalmente, es importante destacar, que el tipo de nanoestructuras sintetizadas en este trabajo -entendiéndose por el polímero y los antibióticos empleados- no se han publicado en otras investigaciones y constituye una base para continuar en el desarrollo de sistemas de entrega de medicamentos en nanopartículas de ácido poliláctico.

Financiación

Esta investigación fue financiada por Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander, y Colciencias (Código proyecto 1102-5453-1674).

4. CONCLUSIONES

El método de emulsión evaporación de solvente constituyó una alternativa reproducible y rápida para obtener nanopartículas de PLA de tamaños inferiores a 379 nm y carga superficial positiva de hasta +21 mV, con potencial uso para el transporte de antibióticos.

La encapsulación en PLA mejoró la actividad antibacteriana de ofloxacina y vancomicina, reduciendo entre 40 a 100 veces la concentración necesaria de antibiótico para inhibir el 50% del crecimiento de *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente.

El uso de nanopartículas de PLA como sistema de transporte de ofloxacina y vancomicina, es una alternativa promisoría para contrarrestar las enfermedades infecciosas causadas por *E. coli* O157:H7 y SARM.

BIBLIOGRAFÍA

- Abazinge, M., Jackson, T., Yang, Q., & Owusu-Ababio, G. "**Comparison of in vitro and in vivo release characteristics of sustained release ofloxacin microspheres**". *Drug Delivery*, 2000, 7(2): 77–81.
- Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. "**Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents**". *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011, 9(11): 1035–1052. <http://doi.org/10.1586/eri.11.121>
- Ateba, C. N., & 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**". *Research in Microbiology*, 2011, 162(3): 240–248. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.008>
- Besser, R. E., Griffin, P. M., & Slutsker, L. "**Escherichia coli O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease**". *Annual Review of Medicine*, 1999, 50: 355–367. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.355>
- Boucher, H. W., & Corey, G. R. "**Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus**". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2008, 46 Suppl 5(Suppl 5), S344–S349. <http://doi.org/10.1086/533590>
- Chakraborty, S. P., Sahu, S. K., Mahapatra, S. K., Santra, S., Bal, M., Roy, S., & Pramanik, P. "**Nanoconjugated vancomycin: new opportunities for the development of anti-VRSA agents**". *Nanotechnology*, 2010, 21(10): 105103. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/21/10/105103>
- Cheng, Y. H., Illum, L., & Davis, S. S. "**A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol**". *Journal of Controlled Release*, 1998, 55(2-3): 203–212. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00056-X](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00056-X)
- Cheow, W. S., & Hadinoto, K. "**Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles**". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 85(2): 214–220. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.033>

- Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J. L., Veillard, M., & Couvreur, P. **"The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study"**. *Langmuir*, 2011, 19(22): 9504–9510. <http://doi.org/10.1021/la034999q>
- Doyle, M. P. **"Escherichia coli O157:H7 and its significance in foods"**. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, 12(4): 289–301.
- Espinosa, C., & Cortés, J. A. **"Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias en aislamientos intrahospitalarios en Colombia"**. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 2014, 34(2), 3–12.
- Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G., Cavallaro, G., Micali, N., & Furneri, P. M. **"Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation"**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995, 84(7): 895–902. <http://doi.org/10.1002/jps.2600840721>
- Gemmell, C. G., Edwards, D. I., Fraise, A. P., Gould, F. K., Ridgway, G. L., & Warren, R. E. **"Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in the UK"**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57(4): 589–608. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl017>
- Giovanni, Puglisi., *et al.* **"Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in vitro antimicrobial activity"**. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, 118: 65-76.
- Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Isturiz, R., Alvarez, C., Bavestrello, L., Gotuzzo, E., Seas, C. **"Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Latin America"**. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 34(4): 304–308. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.06.005>
- Hachicha, W., Kodjikian, L., & Fessi, H. **"Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters"**. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 324(2): 176–184. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.005>
- Hans, M. L., & Lowman, a. M. **"Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting"**. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002, 6(4): 319–327. [http://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](http://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1)

- 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**". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 82(1): 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.003>
- Hombreiro Pérez, M., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., ... Maincent, P. "**The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug**". *Journal of Controlled Release*, 2000, 65(3): 429–438. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00253-9](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00253-9)
- Jalil, R., & Nixonts, J. R. "**Review Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties**". *Microencapsulation*, 1990, 7(3): 297–325.
- Jeffery, H., Davis, S. S., & O'Hagan, D. T. "**The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation**". *International Journal of Pharmaceutics*, 1991, 77(2-3): 169–175. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90314-E](http://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90314-E)
- Jeong, Y. Il, Na, H. S., Seo, D. H., Kim, D. G., Lee, H. C., Jang, M. K., Nah, J. W. "**Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity**". *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 352(1-2): 317–323. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001>
- Jones, D. S., & Pearce, K. J. "**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**". *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 131(1): 25–31. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04298-9](http://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04298-9)
- Kim, I. S., Lee, S. K., Park, Y. M., Lee, Y. B., Shin, S. C., Lee, K. C., & Oh, I. J. "**Physicochemical characterization of poly(l-lactic acid) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier**". *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 298(1): 255–262. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.017>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. "**Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems**". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75(1): 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>

- Lai, H.-Z., Chen, W.-Y., Wu, C.-Y., & Chen, Y.-C. "**Potent Antibacterial Nanoparticles for Pathogenic Bacteria**". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(3): 2046–2054. <http://doi.org/10.1021/am507919m>
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. "**Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches**". *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 363(1-2): 26–39. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>
- 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**". *Current Drug Metabolism*, 2009, 10(8): 875–884. <http://doi.org/10.2174/138920009790274522>
- Lotfipour, F., Abdollahi, S., Jelvehgari, M., Valizadeh, H., Hassan, M., & Mllani, M. "**Study of Antimicrobial Effects of Vancomycin Loaded PLGA Nanoparticles Against Enterococcus Clinical Isolates**". *Drug Research*, 2013, 348–352.
- Loveymi, B. D., Jelvehgari, M., Zakeri-Milani, P., & Valizadeh, H. "**Statistical Optimization of Oral Vancomycin-Eudragit RS Nanoparticles Using Response Surface Methodology**". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2012, 11: 1001–1012.
- Machuca, M. A., González, C. I., & Sosa, L. M. "**Methicillin-resistant Staphylococcus aureus causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander**", 2014, 34: 163–169.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. "**Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier**". *Polymers*, 2011, 3(3): 1377–1397. <http://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Martínez Buitrago, 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(1): 3–11. [http://doi.org/10.1016/S0123-9392\(14\)70734-9](http://doi.org/10.1016/S0123-9392(14)70734-9)
- Martinez-Gutierrez, F., Olive, P. L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E. M., Av-Gay, Y. "**Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles**". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2010, 6(5): 681–688. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>

- Moellering, R. C. "**MRSA: the first half century**". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(1): 4–11. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr437>
- Moghimi, S. M., & Hunter, a. C. "**Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine**". *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(10): 412–420. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01485-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01485-2)
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. "**Nanoparticles - A review**". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2007, 5(1): 561–573. <http://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>
- Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhabi, G., Echeita, A., ... Blanco, J. "**Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain**". *Research in Microbiology*, 2005, 156(7): 793–806. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.006>
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. "**Polymer-based nanocapsules for drug delivery**". *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 385(1-2): 113–142. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, a., Quaglia, N. C., Parisi, a., ... Celano, G. V. "**Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy**". *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(2): 219–222. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006>
- Okeri, H. A., & Arhewoh, I. M. "**Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials**". *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(6): 670–680.
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. "**Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue**". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(3), 329–347. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)
- 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**". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 93(7): 1804–1814. <http://doi.org/10.1002/jps.20094>
- Paredes Guerrero, D. J. "**Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre Escherichia coli Y Staphylococcus aureus**". *Universidad Industrial de Santander*, 2011: 1–99.

- Park, S., Worobo, R. W., & Durst, R. A. "**Escherichia coli O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review**". *Critical Reviews in Biotechnology*, 2001, 21(1): 27–48. <http://doi.org/10.1080/20013891081674>
- Pennington, H. "**Escherichia coli O157**". *The Lancet*, 2010, 376(9750): 1428–1435. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60963-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4)
- Piedrahita, D., Márquez, T., & Máttar, S. "**Detección de Escherichia Coli 0157: H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba**". *Revista MVZ Córdoba*, 2001, 6(2), 119–126. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3297680>
- 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**". *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 143(2), 133–141. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04697-2](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04697-2)
- Radovic-Moreno, A. F., Lu, T. K., Puscasu, V. a., Yoon, C. J., Langer, R., & Farokhzad, O. C. "**Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics**". *ACS Nano*, 2012, 6(5): 4279–4287. <http://doi.org/10.1021/nn3008383>
- Redhead, H. M., Davis, S. S., & 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**", *Journal of Control Release*, 2001, 70: 353–363.
- Reinert, R. R., Low, D. E., Rossi, F., Zhang, X., Wattal, C., & Dowzicky, M. J. "**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**". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(5): 1018–1029. <http://doi.org/10.1093/jac/dkm310>
- Rosca, I. D., Watari, F., & Uo, M. "**Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation**". *Journal of Controlled Release*, 2004, 99(2): 271–280. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007>
- Schroeder, C. M., Zhao, C., Debroy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Meng, J. "**Antimicrobial Resistance of Escherichia coli O157 Isolated from Humans , Cattle , Swine , and Food**". *Society*, 2002, 68(2), 576–581. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.2.576>

- 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"**, *Journal of Controlled Release*, 1994, 32(94): 161–176.
- Sharpe, J. N., Shively, E. H., & Polk, H. C. **"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"**. *American Journal of Surgery*, 2005, 189(4), 425–428. <http://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2005.01.011>
- Shopsin, B., & Kreiswirth, B. N. **"Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus"**, 2001, *Emerging Infectious Diseases*, 7(2): 323–326.
- Soppimath, K., Aminabhavi, Rudzinski WE, T., & Kulkarni AR. **"Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices"**. *Journal of Controlled Release*, 2001, 70: 1-20.
- Thomas, K. M., McCann, M. S., Collery, M. M., Logan, a., Whyte, P., McDowell, D. a., & Duffy, G. **"Tracking verocytotoxigenic Escherichia coli O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle"**. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(3): 288–296. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.012>
- Turos, E., Reddy, G. S. K., Greenhalgh, K., Ramaraju, P., Abeylath, S. C., Jang, S., & Lim, D. V. **"Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles : Restoring the activity of b -lactam antibiotics against MRSA"**, 2007, 17: 3468–3472. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.077>
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. **"Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles"**. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(5): 1025–1058. <http://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- Vrignaud, S., Benoit, J. P., & Saulnier, P. **"Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles"**. *Biomaterials*, 2011, 32(33): 8593–8604. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.057>
- Wischke, C., & Schwendeman, S. P. **"Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles"**. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 364(2): 298–327. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>

- 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**". *The New England Journal of Medicine*, 2000, 342: 1930–1936.
- Xavier, R. N., Morgan, H. W., McDonald, I. R., & 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**". *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4383–4390. <http://doi.org/10.1128/AEM.00045-14>
- Xie, S., Tao, Y., Pan, Y., Qu, W., Cheng, G., Huang, L., Yuan, Z. "**Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents**". *Journal of Controlled Release*, 2014, 187: 101–117. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.034>
- Yang, Y. Y., Chia, H. H., & Chung, T. S. "**Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method**". *Journal of Controlled Release*, 2000, 69(1): 81–96. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00291-1](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00291-1)
- Yang, Y. Y., Chung, T. S., & Ping Ng, N. "**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(3), 231–241. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00178-2](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2)
- Zhang, L., Pornpattananangku, D., Hu, C.-M. J., & Huang, C.-M. "**Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery**". *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(6): 585–594. <http://doi.org/10.2174/092986710790416290>