Study of anti-microbial effects of Clarithromycin nanosuspensions against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*

Lotfipour F.[1,2*], Valizadeh H.[1], Azhdarzadeh M.[1], Zakeri-Milani P.[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2]Gastrointestinal and Liver Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 26 Nov. 2011, Accepted: 19 Jan. 2012

Objectives: Clarithromycin is a semi synthetic antibiotic from macrolid group that bind to 50 S ribosomal subunit of susceptible bacteria and inhibit essential bacterial protein synthesis. The purpose of this study is to prepare Clarithromycin-PLGA nanoparticles and to evaluate their antibacterial properties. **Methods:** Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion (MQESD) method was applied to prepare the Clarithromycin nanoparticles. Clarithromycin and PLGA were dissolved in acetone as a water miscible solvent and added to aqueous phase containing PVA2% as emulsifier and stabilizer agent, under homogenization. This led to formation of a quasi emulsion that contains Clarithromycin and PLGA and acetone in the inner phase. The microbial culture method was used to compare the effectiveness of nanosuspensions with untreated drug. *Staphylococcus aureus* PTCC 1112 and *Salmonella typhi* PTCC 1609 were used in this method. Minimum inhibitory concentration of clarithromycin nanosuspension was compared to those of clarithromycin solution. **Results:** Minimum inhibitory concentration of nanosuspensions in comparison with those of drug solution was significantly higher. This increased potency of formulated nanosuspensions is perhaps related to increased drug adsorption as well as lower drug degradation and modified surface characteristics. **Conclusion:** Our results indicate that clarithromycin in the form of nanosuspension has better antibacterial effect in comparison with untreated drug in the same drug concentration.

Keywords: *Clarithromycin, Poly (lactic-co-glycolic acid), Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion, nanosuspensions, Minimum inhibitory concentration*

بررسی کارایی ضد میکروبی نانوسوسپانسیون های کلاریترومایسین علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی

فرزانه لطفی پور*[۱،۲]، هادی ولیزاده[۱]، مرتضی اژدرزاده[۱]، پروین ذاکری میلانی[۱]

[۱]دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۲]مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۵ ، تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۹

زمینه و هدف: کلاریترومایسین یک آنتی بیوتیک نیمه سنتتیک از دسته ماکرولید ها بوده و از طریق اتصال به جزء S ۵۰ ریبوزوم باکتری سبب مهار سنتز پروتئین های ضروری باکتری می گردد. هدف از این مطالعه طراحی نانوسوسپانسیون کلاریترومایسین با استفاده از پلیمر پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) و بررسی اثر ضدمیکروبی نانوسوسپانسیون های حاصله علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی می باشد. **روش ها:** روش Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion (MQESD) برای تهیه نانوسوسپانسیون های کلاریترومایسین استفاده گردید. دارو و پلیمر در استون (حلال اختلاط پذیر با آب) حل گردیده و به فاز آبی حاوی امولسیون کننده (PVA 95000) در حالی که توسط هموژنایزر به هم زده می شد اضافه گردید که یک شبه امولسیون با فاز داخلی کلاریترومایسین، پلیمر و حلال تشکیل می گردد. به منظور بررسی اثربخشی نانوسوسپانسیون از باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112 و سالمونلا تیفی PTCC 1609 روش کشت میکروبی استفاده گردید که حداقل غلظت مهاری رشد بدست آمده برای فرمولاسیون های نانوسوسپانسیون کلاریترومایسین با محلول آن مقایسه گردید. **یافته ها:** حداقل غلظت مهاری رشد کمتر نانوسوسپانسیون در مقایسه با محلول دارو، به معنی افزایش اثربخشی نانوذرات می باشد که کاهش تخریب دارو، غلظت بیشتر نانوذرات در سطح سلول و بهینه شدن خصوصیات فیزیکوشیمیائی نانوذرات می تواند از دلایل این امر باشد. **نتیجه گیری:** نتایج بیانگر این است که فرموله کردن کلاریترومایسین به صورت نانوسوسپانسیون اثربخشی این دارو را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: *کلاریترومایسین، نانوسوسپانسیون، پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید، Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion، حداقل غلظت مهاری رشد*

*Corresponding Author: Farzaneh Lotfipour, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of medical sciences, Tabriz, Iran.Email: lotfipoor@tbzmed.ac.ir Tel: +98-411-3392580 Fax: +98-411-3344798

*نویسنده مسئول: فرزانه لطفی پور، استادیار، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۳۳۹۲۵۸۰-۰۴۱۱، نمابر: ۳۳۴۴۷۹۸-۰۴۱۱ Email: lotfipoor@tbzmed.ac.ir

۱- مقدمه

با وجود پیشرفت های فراوان در توسعه داروهای ضد میکروبی، هنوز هم درمان بعضی از بیماریهای عفونی خصوصاً عفونت های داخل سلولی از مشکلات اصلی درمانی می باشد. در این خصوص یکی از چالش های اصلی انتقال دارو از بین غشا های زیستی و فعالیت آن در داخل سلول می باشد که می تواند منجر به کاهش اثربخشی آنها و به تبع آن افزایش مقاومت دارویی شود. از راهکارهـای برطرف کـردن ایـن مشکلات استفاده از سیستم های دارورسانی جدید می باشد.

مزایای فراوان سیستم های دارورسانی جدید بر حامل های دارویی رایج مانند افزایش فراهمی زیستی، اختصاصی شدن تحویل دارو به بافت هدف، افزایش محلولیت دارو، کاهش تخریب دارو، کنترل رهش دارو و کاهش عوارض جانبی دارو منجر به افزایش روزافزون استفاده از این سیستم های دارورسانـی گردیـده است. نانـو ذرات یکـی از ایـن سیستم های دارورسانی جدید می باشد که اندازه ذره ای کوچک و نسبت سطح بـه حجم بالا، ایـن ذرات را قـادر می سازد که از موانع بیولوژیک موجود در بدن از جمله غشای سلولی راحت تر عبور کرده و وارد سلول شده و محتوای دارویی خود را آزاد کنند (۱). همچنین استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر در نانوذرات منجر به رهش هدفمند دارو می گردد که این امر باعث افزایش اثربخشی دارو می گردد (٤-۲).

محمدی و همکارانش نشان داده اند که استفاده از نانوسوسپانسیون آزیترومایسین باعث افزایش اثربخشی این دارو می گردد (٦، ٥). در مطالعه دیگری که از نانوذرات حاوی ونکومایسین استفاده گردیده، اثر بخشی بیشتر این دارو در باکتریهای گرم مثبت و منفی مشاهده گردید (۸، ۷). همچنین مشاهده شده است که نانوذرات سیپروفلوکساسین در درمان ماکروفاژهای انسانی آلوده با مایکوباکتریوم آویوم اثربخشی بیشتری در مقایسه با داروی آزاد دارد (۹).

Fattal و همکارانش نشان داده اند که اگر آمپی سیلین به صـورت نانـوذره فرموله گردد در درمان سالمونلوزیس موثرتر می باشد (۱۰).

کلاریترومایسین از ماکرولید های جدید است که ساختاری مشابه با اریترومایسین دارد. این دارو از طریق اتصال به جزء S ۵۰ ریبوزوم باکتری ها سبب مهار سنتز پروتئین های ضروری باکتری شده و از این طریق جلوی تکثیر و افزایش باکتری ها را می گیرد. این دارو یک‌آنتی بیوتیک وسیع الطیف بوده و در درمان عفونت ناشی از دسته وسیعی از باکتری ها از جمله عفونت های مجاری تنفسی فوقانی و تحتانی مانند برونشیت، سینوزیت، پنومونی، عفونت های پوست و گوش (اوتیت مدیا) و بافت های نرم کاربرد دارد (۱۳). با توجه به کاربردهای فراوان این دارو در درمان عفونت های ذکر شده و برخی موارد دیگر هدف از این پـژوهش بررسـی میـزان اثـربخشی نانوسوسپانسیون کلاریترومایسین علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی نسبت به محلول آن می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: تهیه نانوسوسپانسیون

با توجه به محلولیت پایین کلاریترومایسین از تکنیک Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion (MQESD) به منظور تهیه نانوذرات استفاده گردید (۱۲، ۱۱). نسبت های مختلفی از کلاریترومایسین (Elder، هند) و PLGA (۵۰:۵۰) (Boehringer Ingelheim، آلمان) را در حلال استون (Merck، آلمان) حل کرده (مطابق جدول ۱) و به فاز آبی حاوی ٤۰ میلی لیتر PVA ۲درصد (Acros، بلژیک) که توسط هموژنایزر (TYPE:silent Crusher M HEIDOLPH، آلمان) با دور ۱۳۰۰۰ rpm به هم زده می شد اضافه گردید. مدت هموژنیزاسیون ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. در مرحله بعد نمونه ها توسط مگنت به مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۰ درجه سانتیگراد) به هم زده شدند تا حلال فاز داخلی خارج گردد. بعد از تهیه نانوذرات با سانتریفوژ (Beckman Avanti ™ j-25، آمریکا) با ۲۱۰۰۰g رسوب داده شد و بعد از شستشو لیوفیلیزه (Chrixt Alpha 1-4، آلمان) گردیدنـد. بـه منظور انجام آزمایشات میکروبـی نمونه ها در سدیم هیدروکساید با pH برابر۸/۵ پراکنده شدند. در جدول ۱ فرمولاسیون نانوذرات مختلف تهیه شده آورده شده است.

۲-۲: تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات

انـدازه ی نـانـوسوسپانسیون هـا تـوسط دستگاه Laser diffraction particle size analyzer (Shimadzu,SALD-2101، ژاپن) تعیین گردید.

بدین منظور، نانوسوسپانسیون لیوفیلیزه شده در آب مقطر پراکنده شده و سپس اندازه ی ذرات توسط دستگاه تعیین شد. توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM) (Leo Electron Microscopy Ltd, Cambridge, UK) مورفولوژی نانوذرات تعیین گردید. با توجه اندازه ذره ای مناسب فرمولاسیون های F1 و F2 و F3 از این فـرمـولاسیـون هـا بـرای مطالعات کشت میکروبـی استفاده گردیـد.

۳-۲: آزمایش میکروبی

۱-۳-۲: فعال سازی باکتری های مورد آزمایش و تهیه اینوکولوم

باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112 و سالمونلا تیفی PTCC 1609 با توجه به طیف اثر کلاریترومایسین (۱۳) انتخاب شده و از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه و بر اساس پروتکل الحاقی شرکت فعال گردید. جهت استفاده های بعدی از باکتری فعال شده، استوک باکتری حاوی ۲۰٪ گلیسرول تهیه و در فریزر ۲۰- نگهداری گردید. باکتری فعال را در محیط مغذی و اختصاصی نوترینت براث (HIMEDIA، هندوستان) کشت داده شد (۲٤ ساعت قبل از انجام آزمایش) و از کلنی های حاصله اینوکولوم باکتریایی ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید.

۲-۳-۲: تهیه نمونه های نانوسوسپانسیون کلاریترومایسین و اضافه کردن باکتری ها

در تمامی آزمایشات انجام گرفته از نمونه های زیر استفاده گردید:

(۱) محلول کلاریترومایسین در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ (نمونه کنترل) (۲) محلول کلاریترومایسین و PLGA در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ (۳) سوسپانسیون نانوذرات در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ حاوی نسبت های ۱:۱ و ۲:۱ و ۳:۱ کلاریترومایسین به PLGA (٤) نانوذرات فاقد دارو در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ . در مرحله بعد استوک نمونه های اشاره شده تهیه و سری غلظت ها با ضریب رقیق سازی ۲ تهیه گردید. محدوده غلظت براساس منابع موجود برای باکتری های مورد نظر تعیین گردید (۱۳) و برای تهیه ی سری غلظت ها از روش رقیق سازی متوالی استفاده شد (۱٤).

در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از اینوکولوم باکتریایی به هر کدام از لوله ها اضافه شد، به طوری که غلظت باکتری در هر کدام از لوله ها برابر با 10^6 CFU شد و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیده و در نهایت پس از کشت خطی از نمونه ها، نتایج حداقل غلظت مهاری رشد ثبت گردید. همچنین در آزمایشات از کنترل مثبت (رشد)، یعنی لوله حاوی محیط کشت به همراه باکتری ها و کنترل منفی یعنی لوله حاوی محیط کشت بدون باکتری استفاده گردید. هر کدام از آزمایشات سه بار تکرار شدند.

٤-۲: روش های آماری

به منظور مقایسه نتایج حاصله از فرمولاسیون های تهیه شده با داروی دست نخورده از نرم افزار SPSS 19 و تست One-Way ANOVA استفاده گردید و $p<0/05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۱-۳: توزیع اندازه ذره ای نانوسوسپانسیون های تهیه شده

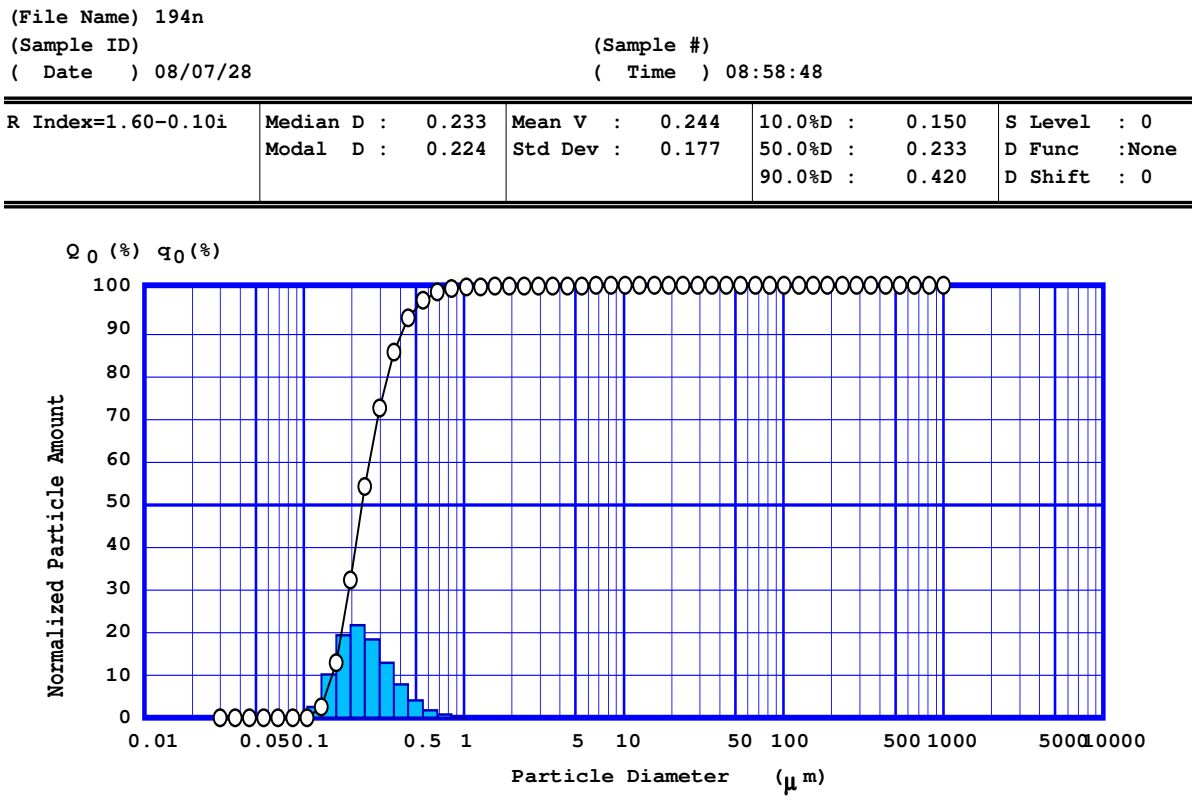
جدول ۲ اندازه ذره ای فرمولاسیون های تهیه شده را نشان می دهد. همانگونه که مشاهده می شود اندازه ذره ای نانوسوسپانسیون تهیه شده بین ۲۰۰ الی ۳۰۰ نانومتر می باشد. با توجه به اندازه ذره ای مناسب فرمولاسیون های نانوذرات ۱، ۲ و ۳ در آزمایشات میکروبی از این نمونه ها استفاده گردید.

جدول ۱. فرمولاسیون نانوذرات استفاده شده

فرمولاسیون	نسبت دارو به پلیمر	فاز داخلی: حلال (ml) استون	فاز داخلی: دارو (mg)	فاز داخلی: پلیمر (mg) PLGA	فاز خارجی: PVA (ml) ٪۲
F1	۱ : ۱	۲	۲۵	۲۵	۳۰
F2	۱ : ۲	۲	۲۵	۵۰	۳۰
F3	۱ : ۳	۲	۲۵	۷۵	۳۰

جدول ۲. میانگین اندازه ی ذره ای فرمولاسیون های ۱، ۲ و ۳

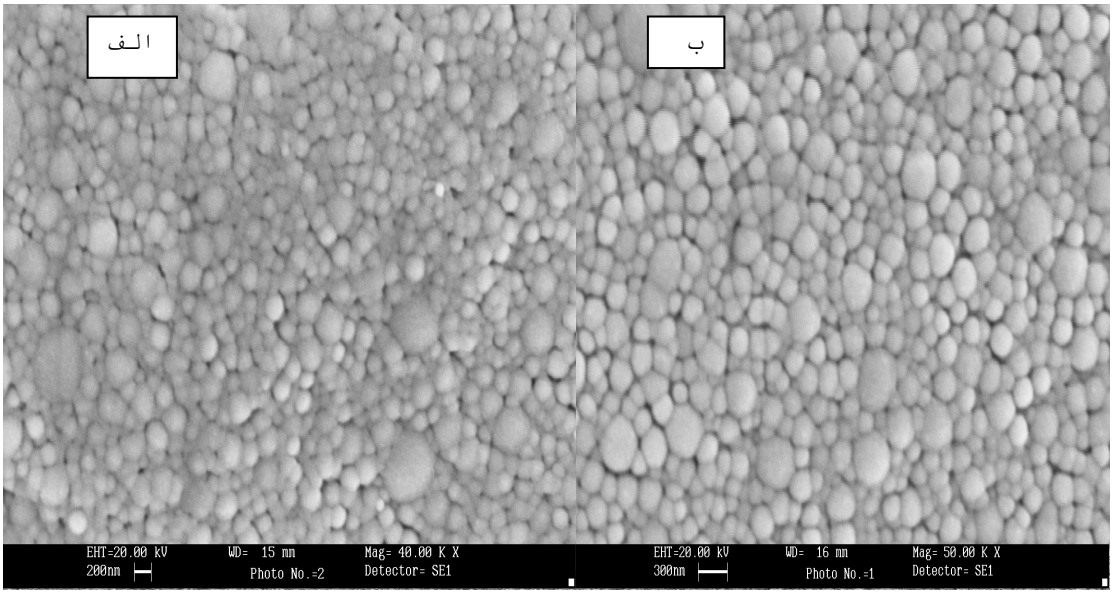
فرمولاسیون	میانگین اندازه ی ذره ای (nm)
(F1)۱:۱ CLR:PLGA	۲۸۰±۱۵
(F2)۱:۲ CLR:PLGA	۲۲۳±۱۲
(F3)۱:۳ CLR:PLGA	۱۸۹±۱۰



شکل ۱. توزیع اندازه ذره ای فرمولاسیون F1 با میانگین اندازه ذره ای ۲٤٤ نانومتر

۲-۳: نتایج بررسی شکل فرمولاسیون های تهیه شده

بـه منظور بررسـی شکل فرمولاسیون هـای تهیه شده، نمونه ها بر روی دیسک های آلومینیومی قرار گرفته و توسط دستگاه Gold Sputtering و در حضور پلاسمای آرگون با لایه نازکی از طلا در حد انگستروم پوشش داده شد و توسط Scanning Electrone Microscope از نانوذرات تصویر گرفته شد. این نتایج در شکل ۲ ملاحظه می گردد کـه نشان دهنده کروی بودن نانوذرات تشکیل شده می باشد.



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات حاوی کلاریترومایسین فرمولاسیون(الف) F1 با بزرگنمایی ۴۰ برابر (ب) F2 با بزرگنمایی ۵۰ برابر

۳-۳: نتایج بررسی حداقل غلظت مهاری رشد نمونه ها

حداقل غلظت مهاری رشد فرمولاسیون های نانوذرات و محلول دارو و مخلوط فیزیکی دارو و پلیمر در جدول ۳ آورده شده است.

با توجه به اینکه نمونه های نانوذرات PLGA فاقد دارو فاقد اثربخشی بودند از اشاره به نتایج این نمونه ها خودداری شده است. با توجه به نتایج حاصله مخلوط فیزیکی کلاریترومایسین و PLGA در نسبت های مختلف اثری برابر با محلول دارو از خود نشان داد که بیانگر بی اثر بودن PLGA در کارایی ضد میکروبی کلاریترومایسین می باشد. با این حال بررسی کمترین غلظت های مهاری کلاریترومایسین در شکل نانوذرات فرموله شده در نسبت های مختلف در مقایسه با محلول دارو نشانگر افزایش قابل توجه در فعالیت ضد میکروبی آن علیه سویه های مورد بررسی می باشد به نحوی که براساس نتایج بدست آمده (جدول ۳) ارزش MIC در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از ۱/۵۶ µg/ml به ۰/۹µg/ml (۸ برابر) و در باکتری سالمونلا تیفی از ۲۰۰µg/ml به ۵۰µg/ml (۴ برابر) کاهش یافته است ($P< ۰/۰۱$).

آزمایشات برای هر کدام از فرمولاسیون ها سه بار تکرار شده است.

جدول ۳. حداقل غلظت مهاری رشد نمونه های مختلف علیه باکتری های استافیلوکوکوی اورئوس و سالمونلا تیفی

کمترین غلظت مهاری	PMs	PMs	PMs	CLR	NANO	NANO	NANO
µg/ml	۱:۲	۱:۲	۱:۱	solution	۱:۳	۱:۲	۱:۱
استافیلوکوکوس اورئوس	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۱۹
سالمونلا تیفی	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۵۰	۵۰	۵۰

NANO: فرمولاسیون های نانو با نسبت های مختلف دارو به پلیمر، PMs: مخلوط فیزیکی، CLR solution: محلول دارو

٤- بحث

نانوتکنولوژی اهمیت فوق العاده ای در جنبه های مختلف علوم دارویی خصوصاً در توسعه سیستم های دارو رسانی جدید پیدا کرده است. فرموله کردن داروها به صورت نانو منجر به بهبود خصوصیات فارماکوکینتیک، ایندکس درمانی و محلولیت سرمی دارو می گردد. همچنین نیمه عمر طولانی در جریان خون، رهش کنترل شده و طولانی مدت دارو و هدایت دارو به صورت اختصاصی به بافت یا سلول مورد نظر از دیگر مزایای این سیستم دارورسانی می باشد (١٥، ٤، ٢). از دیگر مزیت های مهم فرموله کردن دارو به صورت نانوذره، ورود حامل به داخل سلول و رهش دارو از حامل و درمان عفونت های داخل سلولی می باشد (١٦، ٣) طبق نتایج بدست آمده اثر بخشی ضد میکروبی نانوذره حاوی کلاریترومایسین در مقایسه با فرم محلول دارویی در غلظت های برابر در باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی به طور معنی داری افزایش یافته بود بطوری که در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ٨ برابر و در باکتری سالمونلا تیفی ٤ برابر حداقل غلظت مهاری رشد کاهش یافته است ($P<0/01$). این افزایش اثربخشی نانوذرات میتواند ناشی از خصوصیات منحصر به فرد نانوذرات باشد که می توان آن را در دو دسته اصلی تقسیم کرد: ١) اتصال نانوذره به دیواره سلولی میکروارگانیسم و ورود دارو از طریق آن به داخل دیواره سلولی. (٢) اتصال دارو به دیواره سلولی باکتری و عملکرد آن به عنوان یک مخزن دارویی که دارو را به صورت پیوسته آزاد می کند (١٧، ١٦، ٣). همچنین انکپسوله کردن دارو در نانوذرات منجر به افزایش پایداری دارو و کاهش تخریب هیدرولیتیک یا آنزیمی دارو می گردد (١٨). همچنین نتایج حاکی از آن است که نانوذرات کلاریترومایسین بـه طـور واضحـی کارایـی کلاریترومایسین را علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی بهبود داده است. این امر احتمالا می تواند مربوط به ساختار چند لایه و مقاوم پوشش خارجی باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت باشد (٢٥).

٥- نتیجه گیری

این مطالعه بیانگر این بود که PLGA می تواند به عنوان یک پلیمر مناسب در طراحی حامل دارویی نانو مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات فراوان انجام شده بیانگر افزایش اثر ضد باکتریایی نانوذرات حاوی آنتی بیوتیک در مقایسه با فرم آزاد آنتی بیوتیک می باشد (٢٩، ١٩). خصوصیات سطحی بهینه شده نانوذرات آنها را قادر می سازد که به دیواره سلولی میکروارگانیسم چسبیده و محتویات خود را آزاد کنند. این پدیده اثر ضد میکروبی پیوسته را بـر علیه میکـروارگانیسم ایجاد کرده و منجـر بـه بهبـود اثـر دارو می گردد (٢٦).

بنابراین نانوذرات PLGA حاوی کلاریترومایسین در مقایسه با فرم راج دارویی آن برعلیه استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موثرتر می باشد و در صورت مناسب بودن مطالعات حیوانی و انسانی می تواند به عنوان یک فرم دارویی جدید مورد استفاده قرار گیرد.

Refrences:

1. Hirn S., Semmler-Behnke M., Schleh C., Wenk A., Lipka J., Schäffler M., Takenaka S., Möller W., Schmid G., Simon U., and Kreyling W. G., *Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. **77**(3): p. 407-416.

2. Heller J., *Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers.* Biomaterials, 1980. **1**(1): p. 51-57.

3. Barrera D. A., Zylstra E., Lansbury Jr P. T., and Langer R., *Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: Poly(lactic acid-co-lysine).* Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(23): p. 11010-11011.

4. Jain R. A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices.* Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2475-2490.
5. Mohammadi G., Valizadeh H., Barzegar-Jalali M., Lotfipour F., Adibkia K., Milani M., Azhdarzadeh M., Kiafar F., and A. N., *Development of azithromycin-PLGA nanoparticles: Physicochemical characterization and antibacterial effect against Salmonella typhi.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **80**(1): p. 34-39.
6. Azhdarzadeh M, Valizadeh H, Lotfipour F, G M., and P Z.-M., *Study of anti-microbial effects of Azithromycin nanosuspensions in comparison with drug solution.* Pharmaceutical Sciences, 2011. **16**(4): p. 211-220.
7. Gu H., Ho P. L., Tong E., Wang L., and Xu B., *Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities.* Nano Letters, 2003. **3**(9): p. 1261–1263.
8. Kell A. J., Stewart G., Ryan S., Peytavi R., Boissinot M., Huletsky A., Bergeron M. G., and Simard B., *Vancomycin-Modified Nanoparticles for Efficient Targeting and Preconcentration of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.* ACS Nano, 2008. **2**(9): p. 1777–1788.
9. Fawaz F., Bonini F., Maugein J., and Lagueny A. M., *Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: Pharmacokinetics and in vitro antimicrobial activity.* International Journal of Pharmaceutics, 1998. **168**(2): p. 255-259.
10. Fattal E., Rojas J., Youssef M., Couvreur P., and Andremont A., *Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991. **35**(4): p. 770-772.
11. USP, *The United State Pharmacopeia* 31 ed. Vol. 2. 2008, Rockville: United State Pharmacopeia Convention Inc.
12. *Clark´s Analysis of Drug and Poisons*, ed. 3rd. Vol. 2. 2004, London: The Pharmaceutical press.
13. PDR, *Physician´s Desk reference* 61 ed. Vol. 1. 2007, Mont Vale NJ: Thompson PDR.
14. Wikipedia, *Serial dilution* in *Wikipedia*. 2006, http://en.wikipedia.org/wiki/Serial_dilution.
15. Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H., and Kawashima Y., *Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles.* Powder Technology, 2000. **107**(1-2): p. 137-143.
16. Zhang L., Pornpattananangkul D., Hu C. M. J., and Huang C. M., *Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery.* Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**: p. 585-594
17. Esmaeili F., Hosseini-Nasr M., Rad-Malekshahi M., Samadi N., Atyabi F., and Dinarvand R., *Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2007. **3**(2): p. 161-167.
18. Panyam J. and Labhasetwar V., *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(3): p. 329-347.
19. Henry-Michelland S., Alonso M. J., and Andremont A., *Attachment of antibiotics to nanoparticles: Preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro.* International Journal of Pharmaceutics, 1987. **35**(1-2): p.121-127.
20. Cavallaro G., Fresta M., Giammona G., Puglisi G., and Villari A., *Entrapment of Î²-lactams antibiotics in polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system.* International Journal of Pharmaceutics, 1994. **111**(1): p. 31-41.
21. Pinto-Alphandary H., Andremont A., and Couvreur P., *Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications.* International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **13**(3): p. 155-168.
22. Dillen K., Vandervoort J., Van Den Mooter G., Verheyden L., and Ludwig A., *Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2004. **275**(1-2): p. 171-187.
23. Turos E., Reddy G. S. K., Greenhalgh K., Ramaraju P., Abeylath S. C., Jang S., Dickey S., and Lim D. V., *Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of Î²-lactam antibiotics against MRSA.* Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(12): p. 3468-3472.
24. Turos E., Shim J. Y., Wang Y., Greenhalgh K., Reddy G. S. K., Dickey S., and Lim D. V., *Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: New opportunities for development of anti-MRSA agents.* Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(1): p. 53-56.
25. Abeylath S. C., Turos E., Dickey S., and Lim D. V., *Glyconanobiotics: Novel carbohydrated nanoparticle antibiotics for MRSA and Bacillus anthracis.* Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008. **16**(5): p. 2412-2418.
26. Dillen K., Bridts C., Van der Veken P., Cos P., Vandervoort J., Augustyns K., Stevens W., and Ludwig A., *Adhesion of PLGA or EudragitÂ®/PLGA nanoparticles to Staphylococcus and Pseudomonas.* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **349**(1-2): p. 234-240.
27. Jeong Y. I., Na H. S., Seo D. H., Kim D. G., Lee H. C., Jang M. K., Na S. K., Roh S. H., Kim S. I., and Nah J. W., *Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity.* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **352**(1-2): p. 317-323.
28. Cheow W. S. and Hadinoto K., *Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic*

in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **370**(1-3): p. 79-86.

29. Valizadeh H, Mohammadi G, Ehyaei N, Milani M, Azhdarzadeh M, Zakeri-Milani P, and Lotfipour F., *Antibacterial activity of Clarithromycin loaded PLGA nanoparticles.* Die Pharmazie, In press.