



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**FÁRMACOS Y NANOMATERIALES PARA EL
TRATAMIENTO DE INFECCIONES ÓSEAS**

Autor: Marta Arquero Rodríguez

Tutora: Sandra Sánchez Salcedo

Convocatoria: Febrero

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son actualmente la segunda causa principal de muerte a nivel internacional. En este trabajo hablaremos de la osteomielitis (OM), infección del hueso y/o médula ósea la cual se produce principalmente por bacterias. El microorganismo más frecuentemente aislado en todas las formas clínicas de OM es *Staphylococcus aureus*, bacteria gram positiva cada vez más resistente a la terapia antimicrobiana convencional. El hecho de que la resistencia a los antibióticos esté en continuo crecimiento y la necesidad de localizar a los mismos en el sitio de infección, ha impulsado a la búsqueda de nuevas alternativas a través de la nanotecnología. En este trabajo abordaremos los fármacos empleados actualmente en el tratamiento de la osteomielitis, así como la importancia en investigación de los nanomateriales como coadyuvantes en el tratamiento de este tipo de infecciones.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos como las bacterias, los virus, los parásitos o los hongos, y actualmente constituyen la segunda causa principal de muerte en todo el mundo. En este caso, hablaremos de las infecciones óseas.

Estructuralmente, el esqueleto consiste en aproximadamente 200 huesos formados por tejido óseo, cartílagos, médula ósea y periostio (membrana de tejido conjuntivo adherida exteriormente a los huesos). En función de la forma diferenciamos huesos largos, cortos, planos e irregulares. En los huesos largos, como el fémur, se diferencian las siguientes partes: diáfisis (parte alargada), epífisis (extremos) metáfisis (zona de unión de las dos anteriores), cartílago articular (recubriendo la epífisis donde un hueso se articula con otro) y el periostio. Están constituidos por una matriz formada en un 25% por agua, 25% proteínas y 50% sales minerales, en la cual podemos encontrar cuatro tipos de células: células osteoprogenitoras (no especializadas), osteoblastos (segregan colágeno y otros materiales para la construcción del hueso), osteocitos (células maduras derivadas de los osteoblastos que mantienen las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes), y osteoclastos (células responsables de la resorción ósea). Entre las principales funciones de los huesos, destacan la de soporte, protección, movimiento y homeostasis mineral ya que almacenan minerales como el calcio y el fósforo. (9)

El término osteomielitis (OM) hace referencia a la infección del hueso y/o médula ósea. Se caracteriza por una inflamación y destrucción progresiva del mismo pudiendo dañar el periostio, cavidad medular y el hueso cortical. Es una infección generalmente bacteriana, aunque en ocasiones se puede producir por hongos y en mucha menor frecuencia por virus. (1)

Debido al aumento de la esperanza de vida de la población y al empleo cada vez mayor de prótesis articulares y dispositivos de fijación ósea, la prevalencia de este tipo de infecciones está aumentando constantemente. La infección ósea después de un traumatismo es uno de los problemas más desafiantes de la cirugía ortopédica, siendo la incidencia tras la cirugía aproximadamente del 1-5%. (8)

La finalidad principal del tratamiento de la osteomielitis es evitar el avance de las formas agudas a las crónicas mediante el diagnóstico y tratamiento rápidos. Como se afirma anteriormente, la causa más frecuente de esta enfermedad es la infección bacteriana, y gracias al rápido inicio del tratamiento con antibióticos el número de casos agudos que avanzan a crónicos ha disminuido drásticamente desde el 10-20% hasta el 2% en los últimos años. (2,3)

La resistencia a los antibióticos es actualmente una de las mayores amenazas para la salud humana en el siglo XXI. Algunas bacterias son sensibles o no lo son de forma intrínseca a algún antibiótico. Sin embargo, otras adquieren resistencia por dos posibles vías: a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) de manera vertical de generación en generación, o por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias, donde la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir a la acción de los antibióticos: el primero se basa en un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, el segundo en una disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana con la pérdida o modificación de las porinas, y el tercero por producción de enzimas inactivantes de los antibióticos. Para evitar el incremento de cepas o bacterias resistentes es importante hacer un uso racional de los antibióticos mediante la educación y concienciación a los sanitarios y población general, planificar una política de uso restringido y rotación de antibióticos, y definir las dosis y el tiempo de tratamiento. Este problema está en continuo crecimiento por lo que en investigación se ha visto necesario un avance en la búsqueda de nuevas alternativas a la administración convencional de antibióticos, y es ahí donde surge una nueva herramienta: la nanotecnología, ofreciendo la posibilidad de crear y diseñar nanopartículas con unos requisitos específicos. (10)

El análisis directo de los tejidos e implantes de estas infecciones muestra que en muchos casos la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre el tejido o el implante formando comunidades de bacterias a las que se les ha denominado “biofilms”. Estos “biofilms” se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. La capacidad de formación del mismo no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo

condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formarlos. Dentro del biofilm, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos. Aunque la composición es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. (5)

1.1. CAUSAS DE LA OSTEOMIELITIS

Según qué vía utilicen las bacterias para alcanzar el hueso, y atendiendo a su patogénesis, podemos subdividir la osteomielitis en tres tipos: (4)

- Osteomielitis hematógena: la infección alcanza el hueso mediante la corriente sanguínea desde un foco distante.
- Osteomielitis postraumática o postquirúrgica: por inoculación directa del microorganismo durante una cirugía o debido a un traumatismo abierto.
- Osteomielitis por contigüidad o secundaria a un foco contiguo de infección: el microorganismo invade el hueso por extensión de una infección contigua de tejidos.

En la osteomielitis hematógena la infección suele ser monobacteriana, mientras que en la infección exógena podemos encontrar varios microorganismos implicados en la misma. (2)

1.2. CLASIFICACION DE LA OSTEOMIELITIS

Debido a la presentación heterogénea de la infección ósea, actualmente no existe un sistema universalmente aceptado para la clasificación de la osteomielitis. En términos generales, podemos clasificarla de acuerdo a varios criterios:

1. Duración de la infección
2. Sitio de desarrollo de la infección
3. Presencia o ausencia de implantes

1.2.1. Clasificación acorde a la duración de la infección

Es importante conocer en que fase o etapa de la infección se encuentra el paciente ya que el abordaje terapéutico entre unos y otros varía. Podemos clasificar la osteomielitis en aguda, subaguda o crónica. Actualmente no hay un límite exacto de tiempo de transición entre las formas agudas y crónicas, pero se debe tener en cuenta que la osteomielitis aguda hematógena o contigua evoluciona en un corto período de tiempo de unos cuantos días o semanas, mientras que la osteomielitis en fase crónica puede llegar a durar varias semanas o incluso meses antes de comenzar

el tratamiento. Tanto la incidencia como la prevalencia de la osteomielitis crónica se ven influenciadas en gran medida por el estado socioeconómico, la edad y las comorbilidades de los pacientes. (2)

En términos generales la osteomielitis aguda en adultos es causada en un porcentaje elevado (50-60%) por *Staphylococcus aureus*, siendo éste el microorganismo más frecuentemente aislado en todas las formas clínicas de osteomielitis. Cabe destacar que cada vez se detecta más *S.aureus* resistente a meticilina (SARM). *Staphylococcus epidermidis* es el principal patógeno en las infecciones asociadas a prótesis e implantes metálicos fundamentalmente. (1,3)

También es frecuente aislar diferentes especies de *Streptococcus* y en gran medida también bacilos Gram negativos, en concreto *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aislamiento de ésta última es común en pacientes ADVP (adictos a droga por vía parenteral) y en infecciones de los pies en diabéticos. La osteomielitis subaguda generalmente es causada por *Mycobacterium tuberculosis* o *Brucella spp*, fundamentalmente en regiones endémicas. Normalmente el curso latente de la misma puede retrasar el diagnóstico incluso meses. La osteomielitis crónica suele ser el resultado de una osteomielitis aguda no tratada eficazmente durante los primeros días o semanas tras la infección.

En niños, *S.aureus* es al igual que en los adultos, el patógeno más común asociado a osteomielitis aguda. A diferencia de éstos, *Kigella Kingae* se informa cada vez más en niños, y otros agentes etiológicos a destacar son *Streptococcus agalactiae* (frecuente en bebés), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoiae*, bacilos gram negativos entéricos y bacterias anaerobias. (1,2)

1.2.2. Clasificación acorde al sitio de desarrollo de la infección

Según la localización de la infección, podemos clasificar la osteomielitis en:

- Osteomielitis vertebral, por afectación de la columna vertebral.
- Osteomielitis de huesos largos, como el fémur o la tibia en niños.
- Osteomielitis periarticular
- Sitios inusuales como el esternón, la mandíbula o sitios multifocales

Encontramos diferencias entre niños y adultos cuando la infección se desarrolla vía hematógena, ya que en los niños, los microorganismos en circulación se dirigen más bien hacia huesos largos (fundamentalmente el fémur o la tibia), mientras que en los adultos el sitio más afectado es la columna vertebral. No siempre se consigue llegar a detectar el foco primario de la infección, solamente en aproximadamente la mitad de los pacientes adultos. (2)

La OM vertebral se trata de la manifestación más frecuente en adultos en caso de infección vía hematológica de huesos. Afecta sobre todo a personas mayores de 50 años y con mayor frecuencia a varones que a mujeres. Durante el proceso de infección se da afectación de vértebras vecinas y el disco intervertebral correspondiente. Los gérmenes acceden a través de las arterias segmentarias a las láminas terminales vecinas y posteriormente se propagan al disco. (1) Las fuentes de infección más frecuentes son el tracto genitourinario en personas sobre todo de edad avanzada y las infecciones de partes blandas. (3) A parte de la vía hematológica, también puede darse OM vertebral por inoculación directa durante una cirugía de columna, por un traumatismo, en cirugía de implantes o por una mala cicatrización de la incisión en el periodo postoperatorio temprano.

En el caso de OM de huesos largos, cabe destacar que la infección por vía hematológica hacia huesos largos afecta normalmente a niños (fémur y tibia). La OM hematológica que no fue bien tratada durante la niñez puede llegar a causar complicaciones importantes a nivel crónico. La osteomielitis de huesos largos también puede ser consecuencia de contaminación exógena durante un traumatismo (fractura abierta) o contaminación perioperatoria durante reparaciones ortopédicas. En los adultos, casi todos los casos de OM de huesos largos son postraumáticos o postquirúrgicos (contaminación exógena), destacando la infección exógena relacionada con dispositivos de fijación ósea. (1)

1.2.3. OM vertebral y OM de huesos largos asociada a la presencia de implantes

La osteomielitis asociada a implantes es una de las complicaciones más temidas después de la fijación, siendo la clave de la virulencia la presencia del “biofilm”. Tras la intervención, los dispositivos extraños son recubiertos por proteínas del huésped. Varias proteínas como la fibronectina y la laminina favorecen la unión de las bacterias que posean adhesinas para las mismas (estafilococos en gran medida). Después de la adherencia y acumulación bacteriana, producen polisacáridos formando una especie de comunidad microbiana.

Cuando un implante se contamina con bacterias varios factores influyen en que este “biofilm” se desarrolle sobre el mismo. Inicialmente los microorganismos deben adherirse a la superficie del implante el tiempo suficiente para que la adherencia sea irreversible. Esta adherencia va a depender del flujo de líquido al que está sometido el implante, del número de bacterias que se adhieren y de las características fisicoquímicas del implante.

La presentación de las manifestaciones en este tipo de infecciones dependerá de la duración de la infección, tipo de microorganismo, localización anatómica y el tipo de cirugía llevada a cabo. El diagnóstico y las estrategias de tratamiento se guían por el tiempo que transcurre desde la intervención hasta el inicio de la infección, y frecuentemente se requiere la retirada del implante.

Podemos clasificar las osteomielitis asociadas a implantes en tempranas (menos de un mes desde la intervención), retardadas o tardías. (5)

En los últimos años, el número de cirugías de fusión espinal con implantes está aumentando considerablemente. La OM vertebral asociada a implante es una infección difícil de valorar ya que debe haber un equilibrio entre la necesidad de mantener la estabilidad de la columna y la necesidad de tratar la infección de manera segura y efectiva. La OM de huesos largos asociada a implante se trata de una complicación muy temida tras la fijación ósea llevada a cabo tras fracturas de los huesos, donde los dispositivos de fijación incluyen tornillos, clavos, placas, varillas, etc. (2)

Por otro lado, la **Nanotecnología** se define como el estudio de las propiedades de la materia en escala nanométrica, es decir, del orden de 1-100 nm, ofreciendo la posibilidad de diseñar o crear nanopartículas con requisitos específicos en función del objetivo buscado. (10)

Las principales ventajas que los nanomateriales en general tienen en cuanto al tratamiento de las infecciones bacterianas son las siguientes: mayor capacidad de carga de fármaco, mayor solubilidad del fármaco en conjugación con vehículos de administración, estabilidad del fármaco, administración dirigida y liberación correcta tras el desarrollo con grupos funcionales que responden a estímulos, reduciendo los efectos adversos sistémicos en otros tejidos u órganos, y mayor capacidad de transporte a través de las membranas celulares. (14)

El desarrollo de biomateriales como soportes óseos capaces de soportar y liberar de forma lenta y controlada diferentes fármacos ha revolucionado la terapéutica moderna con nuevos y más eficientes métodos de tratamiento de estas infecciones. Una de las formas de hacer un uso racional y efectivo de los antibióticos es precisamente su administración local y controlada y esto se logra cuando están soportados sobre diferentes biomateriales. Uno de los principales problemas es cómo acceder a la zona de hueso infectado para suministrar el antibiótico adecuado, por lo que si se logra agregarlo en el propio implante no cabe duda que actuará mayoritariamente de forma local sin perjudicar a otras partes del organismo. (16) Cualquier biomaterial para poder ser implantado debe cumplir una serie de requisitos: a) ser biocompatible y no provocar que este desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial, b) no ser tóxico ni carcinógeno, c) ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos al menos durante el tiempo programado, ya que hay biomateriales biodegradables y biomateriales permanentes, d) que la resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga y el peso sean los adecuados, y e) su diseño, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados. (18)

2. OBJETIVOS

- a) Conocer las diferentes causas y vías por las que los microorganismos son capaces de llegar al hueso y causar infección en el mismo.
- b) Aportar una visión general sobre las técnicas de diagnóstico empleadas para poder instaurar posteriormente el tratamiento farmacológico más adecuado en función del microorganismo/microorganismos responsables de la infección.
- c) Conocer los fármacos empleados actualmente para combatir las infecciones óseas.
- d) Reflejar los diferentes nanomateriales empleados como coadyuvantes en el tratamiento de las infecciones óseas, así como la importancia de su investigación al conseguir paliar o mejorar las limitaciones de las terapias antibióticas actuales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica rigurosa de artículos publicados en revistas científicas, en castellano y en inglés, a través de las bases de datos PubMed, Google Scholar, Scielo y ScienceDirect.

A su vez, se han consultado libros especializados en reumatología y enfermedades infecciosas acudiendo a las bibliotecas de Medicina y Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, además de acceder a libros electrónicos disponibles a través de la biblioteca virtual de la Universidad Complutense de Madrid. También se han consultado webs institucionales como el SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). La lista completa de las fuentes utilizadas para desarrollar el trabajo se cita en el apartado bibliografía.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

El diagnóstico temprano de la osteomielitis aguda es fundamental para poder comenzar cuanto antes con el tratamiento antibiótico adecuado y evitar así complicaciones graves como la necrosis ósea. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la OM son, como en cualquier otra infección bacteriana, antibióticos. El abordaje terapéutico seguro y efectivo es importante en este tipo de infecciones para evitar complicaciones. La osteomielitis aguda actualmente puede tratarse únicamente con antibioterapia, mientras que la osteomielitis crónica requiere habitualmente desbridamiento quirúrgico adicional asociado al tratamiento con los antibióticos necesarios. Este proceso de desbridamiento quirúrgico asociado a los antibióticos en pacientes con infección en fase crónica es importante ya que la osteomielitis no se podrá curar si el problema o la razón subyacente de la misma no se puede resolver. El tratamiento va a consistir generalmente, a parte de la terapia antimicrobiana, en analgésicos, fisioterapia asociada y reposo del paciente. (2)

Al sospechar de osteomielitis aguda en un paciente, se requiere una actuación empírica inmediata para comenzar a hacer frente a la infección lo antes posible. Antes de comenzar esta terapia, deben recogerse muestras para poder llevar a cabo el diagnóstico microbiológico y saber con certeza y en el menor tiempo posible cuál es el linaje/linajes bacteriano causante de la infección. Una vez completo el diagnóstico, el esquema del tratamiento empírico inicial deberá reevaluarse y adaptar el tratamiento según los microorganismos causantes del problema. (6)

4.1. DIAGNÓSTICO

Pruebas de imagen

Radiografía convencional: está indicada como estudio inicial en todos los pacientes. En la primera semana solo permite detectar alteraciones en las partes blandas, y es a partir de la segunda y tercera semana cuando comienzan a aparecer los cambios radiográficos óseos más significativos.

Gammagrafía ósea: técnica de gran sensibilidad (ya que es positiva en el 95% de los casos dentro de las 24h del inicio de los síntomas), pero no demasiada especificidad. El isótopo más empleado ha sido el ^{99m}Tc MDP (tecnecio 99 metaestable metilén difosfonato), aunque estudios realizados con citrato de ^{67}Ga y leucocitos marcados con ^{111}In están mostrando mayor especificidad.

Tomografía computadorizada y/o Resonancia magnética: permiten localizar con precisión el foco de infección y su extensión, pero tienen como inconveniente el elevado coste económico. (7)

Diagnóstico de laboratorio

Cuando a nivel clínico se sospecha de OM, es necesario realizar un hemograma completo. Se observará leucocitosis, así como valores de PCR y VSG elevados. (3) El diagnóstico microbiológico es decisivo para instaurar el fármaco antibiótico más adecuado, por lo que se realizan tomas de muestras obtenidas por biopsia percutánea, punción ósea de la zona afectada, y hemocultivos con el fin de identificar el microorganismo responsable de la infección. Posteriormente se solicitará un antibiograma y se instaurará el tratamiento antibiótico específico, aunque el paciente ya haya comenzado con el tratamiento empírico guiado por la sospecha clínica.

En el caso de estar ante un caso de osteomielitis aguda, una vez recogidas las muestras necesarias se requiere una actuación empírica inmediata. En cambio, cuando la osteomielitis se considere crónica es preferible esperar a conocer el diagnóstico etiológico antes de comenzar la antibioterapia. (7)

4.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EMPÍRICO DE OM EN ADULTOS

El régimen debe cubrir los microorganismos más frecuentes según la experiencia clínica. Entre los fármacos empleados, se encuentra la cloxacilina, que es un antibiótico tipo β -lactámico del grupo de las penicilinas (es una meticilina), empleado para infecciones por estafilococos penicilín resistentes.

S.aureus, microorganismo más habitual causante de osteomielitis en todas sus formas clínicas, presenta elevada resistencia a los antibióticos β -lactámicos, en concreto a la penicilina debido que utiliza una hidrólisis química enzimática gracias a enzimas β lactamasas o penicilinasas. Se trata de una resistencia adquirida, por lo que se han desarrollado nuevas penicilinas como la cloxacilina con otros sustituyentes en el anillo β lactámico con la finalidad de hacer frente a las resistencias generadas. Por otro lado, también se emplean cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima, que son antibióticos tipo β -lactámicos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas de 3º generación. También se utilizan las combinaciones de Amoxicilina/clavulánico y Piperacilina/tazobactam, que son combinaciones de antibióticos tipo β -lactámicos con inhibidores suicidas de las β -lactamasas (ácido clavulánico y tazobactam) para hacer frente a las resistencias. Por otro lado, también se utilizan fármacos como vancomicina y teicoplanina, glucopeptidos de espectro de acción similar, siendo fármacos utilizados habitualmente en casos de infecciones graves causadas por bacterias gram+ sensibles que no puedan tratarse, no respondan o sean resistentes a otros antibióticos, como penicilinas o cefalosporinas. Para finalizar, también puede emplearse imipenem, antibiótico tipo β -lactámico del grupo de los carbapenemas (amplio espectro de actividad bactericida).

TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO EMPÍRICO		
Tipo de osteomielitis (OM)	Tratamiento inicial	Tratamiento alternativo
OM hematogena	Cloxacilina 2g/4h iv + Cefotaxima 2g/8h iv o Ceftriaxona 2g/24h iv	Vancomicina 1g/12h iv Teicoplanina 600-800 mg/24h
OM por inoculación Prótesis o material de osteosíntesis	Vancomicina o Teicoplanina + Cefepima 2g/12h iv o Ceftazidima 2g/8h iv	Fluoroquinolonas iv/vo Ofloxacino 200-400 mg/12h iv/vo Pefloxacino 200-400 mg/12h iv/vo Ciprofloxacino 200-400 mg/12h iv, 750 mg/12h vo + Rifampicina 600- 900 mg/24h vo
OM por contigüidad	Amoxicilina-clavulánico 2g-200mg/8h iv o Imipenem 1g/6h iv o Piperacilina-Tazobactan 4g-500 mg/6-8h iv	Cefotaxima, Ceftriaxona o Fluoroquinolonas + Clindamicina 600 mg/8h iv
OM en pacientes ADVP	Cloxacilina + Ceftazidima o Cefepima	Vancomicina + Ciprofloxacino
En OM crónica no está indicado el tratamiento empírico. La terapia antimicrobiana se establecerá según el diagnóstico microbiológico.		

Tabla 1. Tratamiento farmacológico empírico de OM en adultos. (3)

Una vez que se obtienen los resultados del laboratorio y se conoce el agente etiológico responsable de la infección, el tratamiento debe reevaluarse para seleccionar el antibiótico más eficaz frente al microorganismo causante de la infección. Éste debe alcanzar concentraciones superiores a la CMI en el foco de infección, mantenerlas en los intervalos entre las distintas dosis y cumplir condiciones de estabilidad. (7)

4.3. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO CONTRA LA OM EN ADULTOS

A continuación se describen los regímenes antimicrobianos atribuibles a los agentes etiológicos más comunes causantes de osteomielitis:

a) *Staphylococcus spp*: *Staphylococcus aureus* es el microorganismo responsable de la mayor parte de casos de osteomielitis en todas sus formas clínicas, es un coco gram positivo, catalasa y coagulasa positivo. Como se ha afirmado anteriormente, actualmente presenta elevada resistencia a los antibióticos β -lactámicos, en concreto a la penicilina, por lo que se han desarrollado nuevas penicilinas con otros sustituyentes en el anillo β -lactámico, como la cloxaciclina (que es una meticilina) o nafcilina. *S.aureus* consigue generar cepas SARM (resistentes a meticilina). Estas SARM tienen una PBP alternativa, nueva, que no es reconocida por las penicilinas de primera generación. Debido a esta resistencia por cambios en las PBPs se empezó a utilizar vancomicina, sobre la cual todavía no se han desarrollado casi resistencias. Las dosis y vía de administración serían las siguientes:

- Susceptibles a meticilina: nafcilina u oxacilina 2g cada 6h iv, seguida de rifampicina 300-450 mg cada 12h vo + Levofloxacino 750 mg cada 24 vo o 500 mg cada 12h vo.
- Resistentes a meticilina (SARM): Vancomicina 15 mg/Kg cada 12h iv, o daptomicina 6-8 mg/Kg cada 24h iv, seguida de rifampicina 300-450 mg cada 12h vo + levofloxacino 750 mg cada 24h vo o 500 mg cada 12h vo.

b) *Streptococcus spp*.: cocos gram positivos, catalasa negativos. Por suerte, los estreptococos beta hemotílicos (como *S.pyogenes* y *S.agalactiae*) son sensibles a las penicilinas de primera generación, siendo uno de los pocos que no han desarrollado resistencias. Por tanto se administraría Penicilina G 5×10^6 unidades cada 6h iv (o en una sola dosis de 20×10^6 unidades cada 24h iv), o ceftriaxona 2g cada 24h iv.

c) Las enterobacterias son microorganismos gram negativos. En el caso de los bacilos gram negativos aerobios o facultativos, son muy útiles las cefalosporinas de 3º generación (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) de 4º generación (cefepima), y las fluoroquinolonas (como el ciprofloxacino). Otras alternativas sería la administración de penicilinas asociadas a inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam y

piperaciclina/tazobactam), o carbapenémicos (imipenem y meropenem). Las dosis y vías de administración generalmente empleadas serían las siguientes:

- Susceptibles quinolonas: ciprofloxacino 750 mg cada 24h vo.
- Resistentes a quinolonas: imipenem 500 mg cada 6h iv.

- d) En el caso de estar ante *Pseudomonas aeruginosa* (bacilo gram negativo), ceftazidima, cefepima y piperaciclina/tazobactam son efectivas contra la misma, por lo que estarían indicadas en los pacientes ADVP y en infecciones localizadas en los pies de los diabéticos. En estos casos el tratamiento de elección sería por tanto cefepima o ceftazidima 2g cada 8h iv o piperaciclina/tazobactam 4,5 cada 8h iv seguida de ciprofloxacino 750 mg cada 12h vo. En ocasiones puede incluirse en el tratamiento un aminoglucósido para disminuir el riesgo de resistencias.
- e) Por último, en el caso de aislar microorganismos anaerobios, el tratamiento de elección será clindamicina 600 mg cada 6 u 8 h. (2)

Los diferentes tipos de osteomielitis han sido tratados tradicionalmente por vía intravenosa para asegurar una adecuada concentración del antibiótico en el hueso. En algunos casos, una terapéutica secuencial parenteral-oral es aceptable una vez controlado el cuadro agudo siempre que se demuestre una excelente biodisponibilidad oral del fármaco y que haya ausencia de vómitos. Actualmente no se cuenta con suficientes datos para establecer la duración óptima del tratamiento, pero para obtener una tasa aceptable de curación se requiere la administración de los antibióticos durante un período de cuatro a seis semanas. (1,2)

4.4. NANOMATERIALES EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES ÓSEAS

Los tratamientos con antibióticos (AB) por vías tradicionales de las infecciones óseas son muy largos y pueden llegar a ser tóxicos en otras partes del cuerpo cuando se encuentran en las concentraciones necesarias para que la erradicación de la infección sea exitosa, ya que solo una pequeña dosis del mismo alcanza la zona de infección. Teniendo en cuenta las desventajas que presenta la administración vía sistémica de AB en este tipo de infecciones, uno de los principales logros sería la administración directa del AB en la zona infectada de manera que se libere en el sitio de la infección alcanzándose concentraciones locales mayores que la concentración mínima inhibitoria (CMI) sin que se alcancen niveles sistémicos peligrosos. En este sentido, resulta de gran interés la utilización de un material implantable que contenga el antibiótico y se libere localmente en la zona de infección una vez implantado. El empleo de sistemas de liberación controlada de AB

directamente en el tejido óseo resulta particularmente importante tanto para la prevención de la infección local como en el tratamiento de la osteomielitis crónica:

Las infecciones óseas asociadas a implantes son una de las complicaciones más temidas después de la fijación, por lo que uno de los objetivos de la nanotecnología ha sido avanzar hacia el diseño de biomateriales de soporte 3D o implantes que permitan incluir antibióticos para ser liberados en la zona infectada una vez implantados, sirviendo así como medida profiláctica ya que en cualquier tipo de intervención quirúrgica el riesgo de infección es elevado.

En el tratamiento de la OM crónica es fundamental la limpieza y retirada del tejido infectado, por lo que estos biomateriales implantables ejercerían una doble función, primero como soportes óseos rellenando los espacios muertos y segundo como sistemas de liberación de antibióticos de forma local en la zona infectada. (11)

Por otro lado, las grandes resistencias por parte de las bacterias hacia los antibióticos han llevado a la investigación de nuevas alternativas antimicrobianas, donde encontramos varias clases de nanopartículas con acción antimicrobiana de las que se hablará posteriormente, ya que han demostrado su eficacia para prevenir y tratar enfermedades infecciosas.

4.4.1. BIOMATERIALES COMO SOPORTES ÓSEOS

Atendiendo a la naturaleza química del biomaterial sintético con el que se fabrica un implante, se pueden establecer tres grandes grupos: metales, cerámicas y polímeros (nanoestructurados). A los biomateriales, materiales implantables intracorporalmente, se les exige que lleven a cabo una función adecuada y no ocasionen ningún daño al organismo. (12)

Polímeros

El empleo de biomateriales poliméricos con la incorporación de antibióticos en cementos fue reportado por primera vez en 1970 para profilaxis de infecciones postoperatorias en cirugía ortopédica y posteriormente en el tratamiento de osteomielitis crónica. Deben su éxito a las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos como en ofrecer la posibilidad de fabricarlos de distintas formas. Pueden ser:

- Bioestables: polietileno, polimetilmetacrilato (PMMA), polipropileno...
- Biodegradables: poli (α -hidroxi ésteres) saturados, que incluyen poli (ácido L-láctico) (PLLA) y poli (ácido glicólico) (PGA), así como copolímeros de poli (ácido láctico-glicólico) (PLGA). (12,13)

Los cementos óseos acrílicos constituyen un buen vehículo para la liberación local de antibióticos en su aplicación en infecciones óseas, siendo los AB más utilizados por su accesibilidad,

biodisponibilidad y espectro de acción los aminoglucósidos y la vancomicina. El sistema biomaterial/fármaco que más se ha utilizado e investigado para el tratamiento de este tipo de infecciones es el cemento óseo acrílico de polimetilmetacrilato (PMMA), empleándose como profiláctico en artroplasias de cadera y en el tratamiento de OM crónica (11), ya que ha demostrado tener características ideales de liberación de antibióticos en su aplicación en infecciones óseas, junto con buenas características de compatibilidad sobre el hueso. (14)

Los antibióticos que se incluyen deben ser termoestables (el proceso de polimerización del cemento es una reacción exotérmica), hidrosolubles, producir reacción inflamatoria/alérgica mínima y alcanzar mínimamente la circulación sistémica. Los inconvenientes son la naturaleza no biodegradable y la necesidad de un procedimiento quirúrgico secundario para garantizar la extracción del sistema una vez finalizada su función. Actualmente están en investigación biomateriales biodegradables capaces de administrar antibióticos de manera eficiente, eliminando así la necesidad de una segunda cirugía reduciendo el riesgo de exposición. (14,15)

Cerámicas

Las cerámicas con aplicaciones médicas son un interesante campo de investigación y desarrollo para la obtención de biomateriales útiles en la fabricación y/o fijación de implantes. Los materiales cerámicos se clasifican en dos grupos: bioinertes y bioactivos. Los bioinertes tienen una influencia muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean y su principal representante es la alumina y la zirconita, mientras que los bioactivos pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos. Las matrices cerámicas pueden ser de naturaleza química muy variada, destacando los fosfatos de calcio en general y la hidroxiapatita (HA) como los representantes más significativos de las biocerámicas cristalinas, los vidrios bioactivos representantes de las cerámicas amorfas, los cementos de sales de calcio, etc.

Vidrios bioactivos: son buenos candidatos para fabricar biomateriales debido a su excelente biocompatibilidad, bioactividad, elevada porosidad en función del método de síntesis utilizado y su capacidad de reabsorción parcial degradándose en productos también biocompatibles, siendo tanto osteoconductivos como osteoinductivos. Se pueden considerar estos implantes como un nuevo sistema para la liberación local de antibióticos y a su vez, como un material capaz de promover la formación de hueso nuevo.

Cementos de fosfato de calcio: el fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos. La posibilidad de utilizar cementos de fosfato de calcio, que ya de por sí son sustitutos

óseos, como vehículo para el suministro de AB representa una alternativa en el tratamiento de la OM.

Cementos de sulfato de calcio: en comparación con la velocidad de reabsorción de otros sustitutivos óseos, los implantes de sulfato de calcio son los que se reabsorben más rápidamente. Destaca la facilidad de incorporación del fármaco durante su elaboración, presentando excelentes propiedades como matrices portadoras de sustancias terapéuticamente activas. La incorporación de otras sustancias como el polímero PLLA o partículas de cerámica de HA a la matriz de sulfato de calcio disminuyen la rápida reabsorción de estos implantes óseos, por lo que la presencia de estos componentes podría modificar la cinética de liberación del AB de la matriz ósea implantable, consiguiendo de esta manera implantes reabsorbibles que condujeran a una liberación sostenida del AB más larga que la que presentan los sistemas constituidos solo por sulfato de calcio. (11)

Una de las ventajas de este tipo de biomaterial (cerámicas) con respecto a los polímeros es que la liberación puede ser controlada teniendo en cuenta el tamaño del poro de la cerámica (16), por lo que el primer paso será diseñar los poros del material cerámico, controlando su número, tamaño, forma, distribución y conectividad. Una vez seleccionado el fármaco a introducir, hay que calcular la relación entre el tamaño del poro de la matriz y el tamaño de la molécula del fármaco y estudiar tanto su solubilidad como la interacción de la pared del poro con la molécula del fármaco. Este último punto es esencial para ajustar los valores de liberación del fármaco a una cinética adecuada. Las paredes de las matrices cerámicas se pueden funcionalizar con una amplia variedad de especies químicas logrando modificar sus propiedades de absorción. Estas características las convierte en matrices susceptibles de alojar distintos fármacos y cederlos de manera sostenida durante períodos de tiempo prolongados a un medio adecuado. (17)

Metales

Los metales han sido muy utilizados como biomateriales con dos propósitos: fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo o implantes utilizados en la estabilización y ayuda al proceso normal de reparación de un tejido (por ejemplo fusión de huesos rotos). Entre los metales más utilizados con estos fines, cabe destacar diferentes clases de aceros inoxidables, aleaciones tales como Co-Cr, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Ni, así como titanio y distintas aleaciones a base de titanio, aluminio y vanadio. Los implantes metálicos pueden sufrir un proceso de corrosión, liberando productos al medio y produciendo reacción tisular, por lo que la resistencia a la corrosión es el primer requerimiento que debe cumplir un implante de esta naturaleza. (18) En la actualidad, para todas aquellas aplicaciones clínicas que requieran soportar carga se están utilizando implantes en su mayoría metálicos lo que origina problemas debido a la gran diferencia de propiedades mecánicas

entre el implante artificial y el hueso natural (dando lugar a rupturas) y la presencia de iones procedentes del implante que pueden ser tóxicos. Para paliar estos problemas, una alternativa es recubrir el implante metálico con cerámicas, ya que constituye una eficaz barrera que ralentiza la cinética de difusión de iones metálicos al organismo vivo. Estos recubrimientos biocerámicos sobre metales también permitirían la liberación de fármacos a partir de los mismos. Particularmente, se está usando la hidroxiapatita dadas sus excelentes propiedades biológicas. (12)

Matrices biocerámica - polímero

Es difícil que un único material cumpla las condiciones ideales. Un material cerámico bioactivo puede facilitar la integración ósea del material con el organismo, pero en menor manera podrá aportar una matriz adecuada para la liberación controlada y diferida en el tiempo de un fármaco. Por otra parte, los materiales poliméricos presentan buenas características que aseguran la biocompatibilidad y que pueden ser utilizados como matrices portadoras de fármacos, pero que sin embargo no facilitan la osteointegración y requieren en ocasiones una segunda intervención para retirarlos del organismo. Estas matrices combinadas son, en definitiva, materiales que presentan las características positivas de los que se venían utilizando, obtenidos a partir de la combinación de los mismos. De los sistemas compuestos de cerámica bioactiva con polímeros como sistemas portadores de AB para su liberación local en el hueso, caben destacar los siguientes: vidrio bioactivo-PMMA, sistemas compuestos HA-PMMA-PEMA, y los sistemas compuestos fosfato tricálcico-PMMA-PEMA. (11)

4.4.2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO TERAPIA ANTIBACTERIANA ALTERNATIVA

En los últimos años, se ha intentado abordar el problema de las resistencias mediante la exploración de nanomateriales antimicrobianos, frente a los cuales parece que no se crean resistencias. El término NP se refiere a partículas en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nanómetros. Varias clases de nanopartículas con actividad antimicrobiana y nanocompuestos han demostrado su eficacia para tratar enfermedades infecciosas. Destacan las **nanopartículas a base de metales y óxidos de metales**, que han demostrado poseer propiedades bacteriostáticas y bactericidas mediante diferentes mecanismos contra los cuales los patógenos no desarrollan resistencias, siendo consideradas como los posibles nuevos agentes antimicrobianos de nueva generación. Es por ello que actualmente se está investigando sobre el uso de nanomoléculas como alternativa a los agentes antimicrobianos convencionales, pudiendo actuar también como portadores de antibióticos para que lleguen de manera rápida y eficaz al sitio de acción. (10,19)

Las nanopartículas a base de metales y óxidos de metales son de gran interés para su uso como posibles agentes antimicrobianos debido a sus propiedades únicas. La estructura física de la NP y la forma de interactuar con la bacteria parece proporcionar mecanismos bactericidas únicos. Las NPs de Ag son las más empleadas, aunque en los últimos años está aumentando el uso de NPs de Cu debido a su alta capacidad antimicrobiana y a su menor coste. Se utilizan tanto para el tratamiento de la infección bacteriana directamente como para administrar antibióticos a modo de nanovehículos. (10)

En términos generales, las NPs metálicas inician el proceso antibacteriano mediante el contacto con la superficie de las mismas a través de interacciones electrostáticas. La liberación de iones por parte de las NPs puede alterar la permeabilidad de las bacterias, favoreciendo su penetración en la membrana y posterior interacción con componentes intracelulares. Estudios recientes han demostrado que las NPs metálicas, además de causar daños a nivel de la membrana celular, son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) pudiendo dañar al material genético de los microorganismos afectando al proceso de replicación y división celular. Las NPs metálicas también pueden producir la peroxidación de lípidos dañando así la integridad de la membrana celular por estrés oxidativo. (10,19)

El efecto antibacteriano será la suma de diferentes factores que finalmente pueden provocar la lisis de las células bacterianas. Se desencadena la liberación de iones de metales pesados que pueden dañar proteínas celulares, interrumpir la señalización celular, generar radicales libres y prevenir la formación de biopelículas. (20)

La probabilidad del desarrollo de resistencias es despreciable, ya que conllevaría múltiples mutaciones genéticas concurrentes en el mismo microorganismo.

❖ **Nanopartículas de Ag (NPs Ag):** el efecto antibacteriano de las NPs de Ag se atribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica, aumento de la permeabilidad de la membrana bacteriana y capacidad de desintegración de la misma, inhibición de la síntesis de la pared celular y disipación del gradiente de protones que resulta en

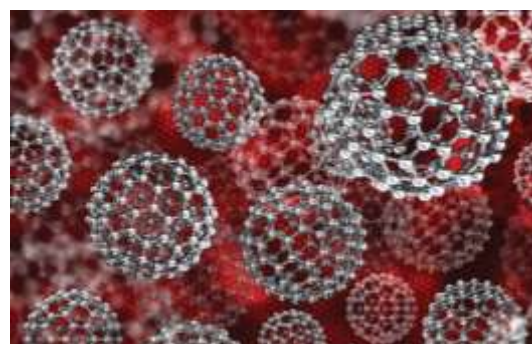


Figura 1. NPs de Ag

lisis. También se ha informado que Ag^+ liberado de las nanopartículas puede interactuar con el ADN de las bacterias, inhibiendo la replicación y la división celular bacteriana. La inhibición de la replicación del ADN y la degradación también se ha informado con Cu. (20)

Las NPs de Ag y Cu han mostrado gran actividad antibacteriana frente cepas de *S.aureus* y *P.aeruginosa* sensibles o multirresistentes a AB convencionales. (10) Sin embargo, como inconveniente se ha demostrado que una exposición prolongada a compuestos de plata puede producir una pigmentación irreversible en la piel además de otros efectos tóxicos en órganos como el hígado o el riñón. (20)

❖ **Nanopartículas de Au (NPs Au):** estas NPs provocan la pérdida del potencial de membrana de las bacterias, ruptura de la membrana bacteriana, ruptura o interrupción de la cadena respiratoria y disminución de la actividad de la ATPasa. Cabe destacar que el uso combinado de NPs Au con agentes antimicrobianos y anticuerpos permiten obtener efectos más selectivos. Por ejemplo, la conjugación de éstas con anticuerpos anti-proteína de *Staphylococcus aureus* permite que estas lleguen más fácilmente a la superficie bacteriana de *S.aureus*, resultando en la muerte de las células bacterianas. (20)



Figura 2. NPs de Au

❖ **Nanopartículas de Cu (NPs Cu):** el cobre es un elemento importante de muchas enzimas estructurales en muchos microorganismos vivos. Sin embargo, el efecto antibacteriano se atribuye a la generación de ROS, alteración de la síntesis de aminoácidos y del DNA bacteriano, así como procesos de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas. Aunque la actividad antibacteriana de las NPs de Cu está bien establecida y ha demostrado eficacia, la actividad varía dependiendo de la especie microbiana. En un estudio se demostró que las bacterias Gram positivas como *S.aureus* resultaron ser más sensibles a NPs de cobre que las especies Gram negativas. (20)

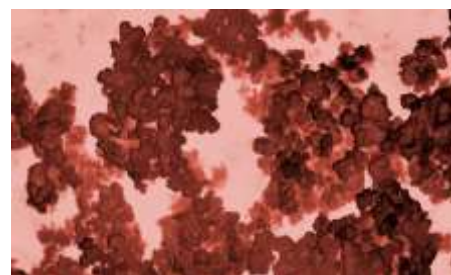


Figura 3. NPs de Cu

También es importante mencionar las nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) y las nanopartículas de TiO₂ (NPs TiO₂), donde el efecto antibacteriano se atribuye principalmente a la generación de ROS (peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con ZnO, y tanto radicales hidroxilo como peróxido de hidrógeno en el caso de TiO₂), y a la inhibición del “biofilm” bacteriano.

La literatura disponible apoya la idea de que estas nanopartículas son posibles candidatos para ser empleados como agentes antimicrobianos. A pesar de que las nanopartículas metálicas son biocompatibles, una fracción de las mismas pueden ser retenidas en el organismo causando una posible toxicidad, por lo que el uso de nanopartículas como nanovehículos ha generado mucha controversia en el ámbito sanitario. (20)

5. CONCLUSIONES

La finalidad principal del tratamiento de la OM es evitar el avance de las formas agudas a las crónicas, por lo que al sospechar de OM en un paciente, se requiere una actuación empírica inmediata para comenzar a hacer frente a la infección lo antes posible. Una vez conocido el agente etiológico responsable, el tratamiento deberá ser reevaluado. Aunque actualmente no se cuenta con suficientes datos, los expertos afirman que para obtener una tasa aceptable de curación se requiere la administración de los antibióticos durante un período de cuatro a seis semanas. Esto, junto con las elevadas dosis requeridas para alcanzar niveles eficaces de fármaco en el hueso hacen que se consideren infecciones difíciles de tratar, y que resulte de gran interés el empleo de biomateriales como soportes óseos que permitan contener el antibiótico y puedan liberarlo localmente en la zona de infección una vez implantado, promoviendo a su vez la regeneración ósea, de manera que se disminuye la toxicidad secundaria del tratamiento aumentando la efectividad del mismo. Tanto los cambios en la etiología de la osteomielitis como el avance en el desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos, hacen necesaria la revisión periódica de la idoneidad del tratamiento. Las grandes resistencias por parte de las bacterias a los antibióticos han llevado a los investigadores a la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas, donde destacan las nanopartículas a base de metales y óxidos de metales al haber demostrado tener propiedades antimicrobianas y sobre las que no parecen crearse resistencias, por lo que los nanomateriales son sin duda un campo emergente y prometedor en el tratamiento de este tipo de infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fauci A, Hauser S, Jameson J.L, Kasper D, Longo D, Loscalzo J. "Osteomielitis". *Harrison; Principios de medicina interna*. (19a. ed.) Mexico D.F.: McGraw-Hill; (2016).
- (2) Zimmerli W. *Bone and joint infections; From Microbiology to Diagnostics and Treatment*. (2014) 5-7, 197-200, 221-236, 257-269, 303-307, 325-332.
- (3) Blanco García FJ. *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. (4a. ed.) Editorial Médica Panamericana. (2004) 366-370.
- (4) Love C, Palestro C.J. *Nuclear medicine imaging of bone infections*. *Clinical Radiology*. 71, (2016) 632-646.
- (5) Lasa I, del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. *Biofilms bacterianos e infección*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28, (2005) 163-175
- (6) Ramos Jiménez J. *Infectología clínica* (2a. ed.). México, D.F.: Editorial El Manual Moderno; (2012) 219-229.

- (7) Ariza J, Gomis M, Barberán J, Sánchez C, Barros C. *Infecciones osteoarticulares y de partes blandas*. Protocolos clínicos SEIMC. (2000) 17-20
- (8) Wagner J.M, Zöllner H, Wallner C, Ismer B, Schira J, Abraham S, Harati K, Lehnhardt M, Behr B. *Surgical Debridement Is Superior to Sole Antibiotic Therapy in a Novel Murine Posttraumatic Osteomyelitis Model*. PLOS ONE. 11, (2016)
- (9) Torres Ríos JJ. *Anatomía del sistema óseo*. Córdoba: El Cid Editor (2012) 3-5.
- (10) Padilla-Vaca F, Mendoza-Macías C. L, Franco B, Anaya-Velázquez F, Ponce-Noyola P, Flores-Martínez A; *El mundo micro en el mundo nano: importancia y desarrollo de nanomateriales para el combate de las enfermedades causadas por bacterias, protozoarios y hongos*. Mundo Nano. 11, (2018) 15-28.
- (11) Vallet-Regí M, Doadrio Villarejo A.L. *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. 19, (2006) 1-254.
- (12) Vallet-Regí M. *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos*
- (13) Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P.V. *An overview of poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering*. International Journal of Molecular Sciences. 15, (2014) 3640-3659.
- (14) Snoddy B, Jayasuriya A.C. *The Use of Nanomaterials to Treat Bone Infections*. HHS. 67, (2016) 822-833
- (15) Caro Aragonés I. *Cementos óseos con antibióticos*. Panorama actual del medicamento (PAM). 40, (2016) 634-638
- (16) Grenier L, Gozalez R. *Sistemas biomaterial-droga para la liberación controlada de antibióticos*. Revista Biomédica. 14, (1994) 30-35
- (17) Vallet-Regí M. *Biocerámicas: regeneradoras de hueso y portadoras de sustancias biológicamente activas*. Transatlántica de educación. 3, (2007) 60-72
- (18) Lizarbe M.A. *Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular*. Real Academia de Ciencias exactas, físicas y naturales. 101, (2007) 227-249
- (19) Kandi V, Kandi S. *Antimicrobial properties of nanomolecules: potential candidates as antibiotics in the era of multi-drug resistance*. EpiH (Epidemiology and health). 37, (2015).
- (20) Hassan A Hemeg. *Nanomaterials for alternative antibacterial therapy*. Dovepress. 12, (2017) 8211-8225.