

Ana Rita Carneiro Torres Moreira

**ESTABILIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
BACTERIÓFAGOS EM BIOPOLÍMEROS, PARA APLICAÇÃO
EM SISTEMAS DE DETECÇÃO BACTERIANA**

*= Estudo de caso com o bacteriófago DSM JG004, específico para
Pseudomonas aeruginosa DSM 19880 =*



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Ana Rita Carneiro Torres Moreira

**ESTABILIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
BACTERIÓFAGOS EM BIOPOLÍMEROS, PARA APLICAÇÃO
EM SISTEMAS DE DETECÇÃO BACTERIANA**

*= Estudo de caso com o bacteriófago DSM JG004, específico para
Pseudomonas aeruginosa DSM 19880 =*



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor Victor M. Balcão
com co-orientação da
Professora Doutora Carla G. Moutinho

**ESTABILIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
BACTERIÓFAGOS EM BIOPOLÍMEROS, PARA APLICAÇÃO
EM SISTEMAS DE DETECÇÃO BACTERIANA**

*= Estudo de caso com o bacteriófago DSM JG004, específico para
Pseudomonas aeruginosa DSM 19880 =*

Trabalho de Conclusão de Ciclo de Estudos
apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

(Ana Rita Carneiro Torres Moreira)

“Learning never exhausts the mind”

Leonardo da Vinci
(1452-1519)

Resumo

Actualmente, as infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), ou nosocomiais, encontram-se muito difundidas e constituem importantes causas de morbidade e mortalidade. Esta crescente problemática de saúde pública tem ainda um elevado impacto económico, tendo vindo a sofrer uma pressão continuada com o aumento da concentração de pessoas, envelhecimento populacional, maior frequência de alterações da imunidade e prevalência de doenças crónicas. Acresce-se o recurso a procedimentos de diagnóstico e terapêutica mais invasivos e o aparecimento de microrganismos progressivamente mais resistentes aos antibióticos químicos convencionais. Um dos microrganismos mais representativos desta situação é a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, à qual se encontram associadas a nível nacional aproximadamente 13% de todas as IACS. Esta bactéria tem evoluído ao longo dos anos, tendo-se tornado gradualmente mais resistente às opções antibióticas disponíveis e sendo considerada uma das seis bactérias mais perigosas a nível das infecções nosocomiais. O rastreio frequente dos reservatórios comuns associados a esta bactéria, assim como o rápido e direccionado diagnóstico deste microrganismo, constituem medidas de elevada importância epidemiológica para a prevenção e controlo das infecções a ela associadas. A elevada especificidade dos bacteriófagos para com uma determinada espécie bacteriana, associada ao seu curto ciclo de vida, fazem com que estes sejam úteis não só no tratamento (e erradicação) mas também na detecção desses mesmos microrganismos.

Este trabalho de conclusão de ciclo de estudos teve como principal objectivo a estabilização estrutural e funcional do bacteriófago DSM JG004 numa matriz biopolimérica, com acção lítica específica sobre a estirpe bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880, visando uma potencial aplicação futura ao nível de sistemas de detecção bacteriana em ambiente hospitalar. Foram desenvolvidas duas matrizes biopoliméricas (hidrogéis), nomeadamente à base de agar e de alginato de cálcio, incorporando no seu desenvolvimento uma suspensão do referido bacteriófago. A exposição posterior dos hidrogéis a um inóculo bacteriano de *P. aeruginosa* demonstrou a presença de fago viável, comprovada pela ocorrência de zonas de lise no tapete microbiano. As condições experimentais de gelificação/polimerização das matrizes

biopoliméricas revelaram-se inócuas e não interferiram nem com a actividade do fago, nem com a da bactéria, tendo-se alcançado com sucesso a estabilização estrutural e funcional do fago. Ambas as matrizes encontram potencial aplicação tanto na detecção de uma ampla variedade de microrganismos responsáveis por infecções bacterianas, adaptando-se o bacteriófago estabilizado, como em sistemas de libertação controlada de fagos na terapêutica de infecções superficiais, alterando-se adicionalmente a espessura dessas mesmas matrizes.

Abstract

Today, infections associated with health care services (IACS), or nosocomial, are widespread and are major causes of morbidity and mortality. This growing public health problem also has a high economic impact, and has been under continuous pressure by several factors, viz. the increasing concentration of people, generalized aging of the population, more frequent changes in immunity and prevalence of chronic diseases, use of more invasive diagnostic and therapeutic procedures, and progressive emergence of microorganisms resistant to conventional chemical antibiotics. One of the most representative microorganisms in this scenario is the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which alone is responsible for ca. 13% of all IACSs within the Portuguese territory. This bacterium has evolved over the years and has become progressively more resistant to the antibiotherapeutical options available, being considered one of the six most dangerous bacteria at the level of nosocomial infections. Screening of the common reservoirs often associated with this bacterium, as well as its rapid and specific diagnosis, constitute measures of high epidemiological importance for the prevention and control of infections associated therewith. The high specificity of bacteriophages to a particular bacterial species, associated with its short life cycle, makes them not only useful in the treatment (and eradication) but also in the detection of those microorganisms.

This final work of conclusion of cycle of studies had as main objective the structural and functional stabilization of the bacteriophage DSM JG004 in a biopolymeric matrix, with specific lytic action against the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880, aiming at a potential future application at the level of bacterial detection systems in hospital environments. Two biopolymeric matrices (hydrogels) have been developed, namely base agar and sodium alginate, incorporating in its development a suspension of said bacteriophage. Further exposure of hydrogels to a bacterial inoculum (bacterial lawn) of *P. aeruginosa* showed the presence of viable phage, as evidenced by the occurrence of zones of lysis in the microbial lawn. The experimental conditions of gelation / polymerization in the development of the biopolymeric matrices proved to be innocuous and did not interfere neither with the activity of the phage or the bacteria,

thus allowing the successful attainment of structural and functional stabilization of the phage. Both polymeric matrices have a strong potential for application either in the detection of a wide variety of microorganisms responsible for bacterial infections, adapting only the bacteriophage to be stabilized, or in systems for the controlled release of phage in the phage therapy of superficial infections, further altering the thickness of those matrices.

Agradecimentos

Desde já, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Victor M. Balcão e à Professora Doutora Carla G. Moutinho o voto de confiança depositado em mim e a oportunidade concedida de realizar este projecto experimental no âmbito do Trabalho de Conclusão de Ciclo de Estudos. O meu sincero reconhecimento pela orientação, disponibilidade e apoio constantes, pelo exemplo de profissionalismo, rigor científico e dinamismo.

Ao Professor Doutor João Carlos Sousa, por ter permitido que este projecto fosse desenvolvido no seio do laboratório de I&D do Centro de Estudos em Biomedicina da Universidade Fernando Pessoa (CEBIMED-UIP).

À Engenheira Ana Amado do CERLAB, pela disponibilização das instalações e equipamentos, essenciais à realização deste trabalho experimental.

A todos os técnicos de laboratório, em particular ao Técnico Ricardo Silva, pela amizade e apoio constantes ao longo de todo este projecto. Sem dúvida, a vossa permanente disponibilidade permitiu-me desvendar e vencer os desafios que me foram surgindo com maior facilidade.

À Doutora Joana Silva e à Professora Doutora Paula Teixeira da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, pela disponibilização do fago e respectiva estirpe bacteriana hospedeira.

A todos os meus amigos, em particular ao André, Elsa, Catarina, Inês, Estefânia e Lili, que sempre me apoiaram, nos bons e maus momentos. Diz-se que a vida é feita de pequenos momentos, mas com vocês poderia realizar uma longa-metragem. Obrigada pela alegria de todos os momentos vividos em conjunto e capacidade de me fazerem crescer.

Aos meus pais e irmão, que, apesar de todas as dificuldades e vicissitudes, mantiveram pacientemente a confiança em mim e me apoiaram constantemente ao longo destas duas jornadas académicas, permitindo-me a realização de um sonho de longa data. A eles o meu mais sincero obrigada!

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Lista de abreviaturas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
<hr/>	
1. Infecções associadas aos cuidados de saúde	2
i. O que é uma IACS?	2
ii. Magnitude e abrangência da problemática das IACS	3
iii. Factores de risco	4
iv. Agentes infecciosos e sua transmissão	5
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
i. Caracterização microbiológica	7
ii. Importância clínica	9
iii. Importância epidemiológica	10
3. Bacteriófagos	11
i. Caracterização geral	12
ii. Utilização de bacteriófagos na detecção de microrganismos patogénicos	17
iii. Bacteriófago DSM JG004	21
4. Imobilização de entidades biológicas em matrizes biopoliméricas	22
i. Metodologias de imobilização	22
ii. Biopolímeros para imobilização	24
iii. Imobilização de bacteriófagos em (bio)polímeros	29

II. MATERIAIS E MÉTODOS	32
<hr/>	
1. Materiais e reagentes	32
i. Bacteriófago DSM JG004	32
ii. Cultura bacteriana <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 19880	32
iii. Reagentes	33
iv. Equipamento analítico	33
2. Procedimentos experimentais	34
i. Optimização das condições de gelificação / polimerização dos (bio)polímeros	34
ii. Controlo de contaminações microbianas	37
iii. Propagação e purificação do bacteriófago DSM JG004	38
iv. Incorporação do bacteriófago nas formulações (bio)poliméricas seleccionadas	42
v. Avaliação da viabilidade lítica dos bacteriófagos imobilizados	43
vi. Avaliação da capacidade de formação de tapete bacteriano	44
vii. Avaliação da coesão estrutural das matrizes biopoliméricas	44
viii. Avaliação da influência da adição do agente conservante sobre o crescimento bacteriano	45
ix. Avaliação da viabilidade lítica do bacteriófago	45
x. Microanálise estrutural das matrizes polimerizadas através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento	45
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
<hr/>	
1. Optimização das condições de gelificação / polimerização	47
i. Matrizes à base de agar	47
ii. Matrizes à base de alginato de cálcio	49
2. Controlo de contaminações microbianas	54
i. Liofilização e rehidratação das matrizes optimizadas	54
ii. Adição de agente antifúngico	57
iii. Autoclavagem das soluções poliméricas	58

3. Propagação e purificação do bacteriófago DSM JG004	59
4. Avaliação da viabilidade lítica das partículas fágicas imobilizadas	60
i. Avaliação da capacidade de formação de tapete bacteriano	62
ii. Avaliação da coesão estrutural das matrizes	63
iii. Avaliação da influência da adição do agente conservante sobre o crescimento bacteriano	63
iv. Avaliação da manutenção da viabilidade lítica do bacteriófago	64
5. Microanálise estrutural das matrizes através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento	65
IV. CONCLUSÕES	69
<hr/>	
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
<hr/>	
ANEXOS	79
<hr/>	

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cef. 3^aG	Cefalosporina de 3 ^a geração
CEBIMED-UFP	Centro de Biomedicina da Universidade Fernando Pessoa
CEMUP	Centro de Materiais da Universidade do Porto
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CNS	Estafilococos coagulase-negativos
CRIO-SEM	Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento
DSMZ	Colecção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESB-UCP	Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
EUA	Estados Unidos da América
GDL	Glucono- δ -lactona
GIBQB – UFP	Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacêutica da Universidade Fernando Pessoa
I&D	Investigação e Desenvolvimento
IACS	Infecções associadas aos cuidados de saúde
LPS	Lipopolissacarídeos
MR	Multi-resistentes
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
NA	Nutriente Agar

NB	<i>Nutrient Broth</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão de fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGA	Ácido Poligalacturónico
TEM	Microscopia Electrónica de Transmissão
TR	Taxa de Resistência
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UFP	Unidade Formadora de Placas

Índice de figuras

Figura 1. Microrganismos mais frequentemente isolados em IACS em Portugal (Adaptado de Costa <i>et al.</i> (2009)).	6
Figura 2. Taxas de resistência de alguns microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos isolados em IACS de UCIs. Comparação dos dados recolhidos entre 1998-2002 com os dados de 2003 (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2004)).	10
Figura 3. Tipos de morfologia dos bacteriófagos (Retirado de Ackermann (2007)).	13
Figura 4. Ciclo lítico de replicação dos bacteriófagos (Retirado de Roberts (2006)).	14
Figura 5. Duração temporal de um ciclo lítico de replicação dos bacteriófagos (Adaptado de Lin <i>et al.</i> (1984)).	15
Figura 6. Diferença entre ciclo lítico e ciclo lisogénico, na infecção fágica (Retirado de Purves <i>et al.</i> (2007)).	16
Figura 7. Caracterização morfológica do fago JG004 por coloração negativa com 2% de acetato de uranilo, seguida de análise por microscopia electrónica de transmissão (TEM) (Retirado de Garbe <i>et al.</i> (2011)).	21
Figura 8. Cadeia polimérica de um alginato formada por blocos MM, blocos GG e blocos MG (Retirado de Donati e Paoletti (2009)).	27
Figura 9. Modelo "egg-box" para a formação de hidrogéis de alginato na presença de iões cálcio (Adaptado de Donati e Paoletti (2009)).	28
Figura 10. Processo de gelificação interna do alginato (Retirado de Donati e Paoletti (2009)).	29
Figura 11. Microscópio electrónico de varrimento utilizado neste projecto de I&D (JEOL, modelo JSM 6301F, Tóquio, Japão) [Fonte: autor].	34

Figura 12. Representação esquemática da etapa de preparação da suspensão bacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 19880 [Fonte: autor].	39
Figura 13. Representação esquemática do processo de propagação fágica [Fonte: autor].	40
Figura 14. Representação esquemática do processo de preparação da solução <i>stock</i> de bacteriófago [Fonte: autor].	41
Figura 15. Etapas de processamento das amostras para análise por CRIO-SEM [Fonte: autor].	46
Figura 16. Aspecto macroscópico dos hidrogéis de agar obtidos a partir de diferentes concentrações de biopolímero.	48
Figura 17. Aspecto macroscópico das matrizes de alginato de cálcio obtidas através do método de difusão, com variação da concentração tanto de polímero como da solução de cálcio.	50
Figura 18. Aspecto macroscópico das matrizes de alginato de cálcio obtidas através do método de gelificação interna.	52
Figura 19. Aspecto macroscópico das matrizes de agar (1) e alginato de cálcio (2)	55
Figura 20. Aspecto microscópico das amostras de agar (a,b) e de alginato de cálcio (c,d), em corte transversal (Ampliação: 35×).	57
Figura 21. Placas de lise fágicas produzidas nas diluições 10^{-6} a 10^{-8}	59
Figura 22. Aspecto macroscópico do tapete bacteriano (<i>P. aeruginosa</i> DSM 19880) formado sobre as matrizes de agar testadas, após incubação a 37 °C durante 24 h.	61
Figura 23. Aspecto macroscópico do tapete bacteriano (<i>P. aeruginosa</i> DSM 19880) formado sobre as matrizes de alginato testadas, após incubação a 37 °C durante 24 h.	61

Figura 24. Microfotografias de CRIO-SEM das matrizes de agar, com variação das condições experimentais utilizadas em termos de adição de agente conservante, incorporação do bacteriófago e inoculação bacteriana [Fonte: autor].....66

Figura 25. Microfotografias de CRIO-SEM das matrizes de alginato, com variação das condições experimentais utilizadas em termos de adição de agente conservante, incorporação do bacteriófago e inoculação bacteriana [Fonte: autor].....68

Índice de tabelas

Tabela 1. Condições experimentais testadas no método de difusão, com variação da concentração de polímero, solução de cálcio e respectiva concentração/volume.	36
Tabela 2. Condições experimentais testadas no método de gelificação interna, com variação das concentrações de polímero, solução de cálcio e GDL.	37
Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa das matrizes de alginato de cálcio otimizadas.	42
Tabela 4. Composição qualitativa e quantitativa das matrizes de agar otimizadas.	43
Tabela 5. Condições experimentais testadas na avaliação da estrutura das matrizes, crescimento bacteriano e viabilidade do fago estabilizado.	43
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação do grau de sinerese das matrizes de alginato reticuladas com CaCO ₃ e GDL.	53
Tabela 7. Resultados obtidos para a variação de massa das matrizes, após liofilização e rehidratação das mesmas.	56
Tabela 8. Título de fago nas diluições preparadas a partir da solução- <i>stock</i> concentrada de fago.	60

I. Introdução

Actualmente, as infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), ou nosocomiais, encontram-se muito difundidas e constituem importantes causas de morbidade e mortalidade. Esta crescente problemática de saúde pública tem ainda um elevado impacto económico, tendo vindo a sofrer uma pressão continuada com o aumento da concentração de pessoas, envelhecimento populacional, maior frequência de alterações da imunidade e prevalência de doenças crónicas. Acresce a aplicação de procedimentos de diagnóstico e terapêutica mais invasivos e aparecimento de microrganismos progressivamente mais resistentes aos antibióticos químicos convencionais. Assim, torna-se urgente o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico microbiológico em ambiente hospitalar que permitam simultaneamente uma rápida e direccionada detecção dos microrganismos, de forma a possibilitar a implementação atempada de medidas de prevenção e controlo das infecções a ela associadas. Recentemente, a utilização de bacteriófagos como adjuvantes no diagnóstico e/ou detecção de patógenos tem vindo a ser alvo de alguns trabalhos científicos (Ripp, S., 2010; Smietana, M. *et al.*, 2011).

Neste sentido, este trabalho de I&D desenvolvido no âmbito do trabalho de conclusão de ciclo de estudo, teve os seguintes objectivos:

- Propagação do bacteriófago DSM JG004 numa cultura de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880 e subsequente purificação do mesmo;
- Desenvolvimento de hidrogéis (bio)poliméricos obtidos através de metodologias físicas virtualmente inócuas, capazes de estabilizar estrutural e funcionalmente o bacteriófago neles incorporado antes da gelificação/polimerização das matrizes;
- Avaliação da viabilidade lítica do bacteriófago DMS JG004 imobilizado nas matrizes, através do contacto com uma cultura bacteriana de *P. aeruginosa* DSM 19880;
- Microanálise estrutural das matrizes (bio)poliméricas contendo o bacteriófago imobilizado, através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento (CRIO-SEM).

1. Infecções associadas aos cuidados de saúde

A evolução dos cuidados médicos permitiu uma melhoria da qualidade de vida dos pacientes e um aumento da sua esperança de vida. Ao longo dos anos, têm vindo a ser desenvolvidos métodos avançados de diagnóstico que possibilitam a detecção precoce de certas patologias, tendo sido igualmente desenvolvidos tratamentos para patologias até então consideradas incuráveis (Pina, E. *et al.*, 2010). No entanto, e apesar dos progressos observados em termos de saúde pública e de cuidados hospitalares, assiste-se a uma contínua emergência de infecções hospitalares, constituindo muitas vezes um risco associado aos avanços da medicina (WHO, 2002; Centers for Disease Control and Prevention, 2010). As IACS, em particular, são consequência directa desses avanços, sendo hoje em dia consideradas uma das complicações mais frequentes da hospitalização (Pina, E. *et al.*, 2010).

i. O que é uma IACS?

As IACS correspondem a um conceito alargado de “infecção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados ou procedimentos de saúde prestados e que pode, também, afectar os profissionais de saúde no decorrer do exercício da sua actividade” (Direcção-Geral da Saúde, 2007).

Durante muitos anos, estas infecções foram designadas de infecções nosocomiais ou hospitalares (do latim *nosocomium*, que significa “hospital”). No entanto, face à progressiva alteração das políticas relacionadas com a prestação de cuidados de saúde, com tendência para a diminuição do tempo de internamento e aumento dos cuidados em ambulatório, e tendo em consideração a ampla diversidade de unidades prestadoras de cuidados de saúde actuais, esta designação não é suficientemente abrangente ao incluir apenas o ambiente hospitalar (WHO, 2002; Direcção-Geral da Saúde, 2007; Mirza, A., 2011). Assim, contrariamente às infecções nosocomiais, o conceito de IACS não depende do nível dos cuidados prestados, incluindo infecções adquiridas em unidades de saúde, desde clínicas altamente equipadas e hospitais com tecnologias avançadas, até unidades apenas com estruturas básicas, como as enquadradas nos cuidados de saúde primários e terciários (WHO, 2002; Direcção-Geral da Saúde, 2007).

As IACS são, geralmente, definidas como aquelas infecções identificadas entre 48h a 72h após a recepção de cuidados médicos em unidades de saúde, sendo excluídas infecções clinicamente aparentes ou que se encontrem em fase de incubação no momento da admissão (Costa, A.C. *et al.*, 2009). De acordo com os critérios definidos pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta GA, EUA), é ainda acrescentado que as IACS poderão apresentar-se de forma localizada ou sistémica, traduzindo uma reacção adversa à presença de um ou mais agentes infecciosos ou suas toxinas (Horan, T.C. *et al.*, 2008; Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

ii. Magnitude e abrangência da problemática das IACS

A preocupação global com as IACS é uma importante questão de saúde pública da actualidade, afectando um elevado número de indivíduos, tanto de países desenvolvidos como de países em desenvolvimento. Estima-se que ocorram por ano aproximadamente 5 milhões de casos de IACS na Europa e nos EUA, representando 1 em cada 10 hospitalizações, com cerca de 140000 mortes associadas anualmente (Klevens, R.M. *et al.*, 2007; European Centre for Disease Prevention and Control, 2010).

De acordo com um estudo realizado em 2002 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no qual foi avaliada a taxa de prevalência de IACS em 55 hospitais de 14 países (representando 4 regiões da OMS, nomeadamente Europa, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental), registou-se em média a ocorrência de IACS em aproximadamente 8,7% dos doentes hospitalizados, observando-se uma prevalência de 7,7% ao nível dos hospitais Europeus.

Em Portugal, foi realizado o Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção, através do qual foram analisados 21459 doentes em regime de internamento em 114 hospitais nacionais (80% do sector público e 20% do sector privado). Os resultados deste estudo revelaram uma taxa de prevalência de 9,8%, aproximando-se a realidade nacional à de outros países da Europa (Costa, A.C. *et al.*, 2009).

Com o aumento do recurso a procedimentos invasivos, tanto para diagnóstico como para terapêutica, pensa-se que a taxa de prevalência de IACS tenha tendência a aumentar ligeiramente ao longo dos anos (Nicolle, L.E., 2002).

Estas infecções estão entre as mais importantes causas de morte e aumento da morbidade de doentes hospitalizados, representando um peso significativo não só sobre os doentes e suas famílias, mas também sobre os próprios sistemas de saúde (Nicolle, L.E., 2002; Klevens, R.M. *et al.*, 2007).

Outro aspecto relevante é o facto de estas infecções contribuírem para a emergência e disseminação de microrganismos multi-resistentes, pela utilização profiláctica ou terapêutica de agentes antimicrobianos, reduzindo desta forma o arsenal de opções medicamentosas a médio e longo prazo (Nicolle, L.E., 2002).

iii. Factores de risco

As unidades de saúde são locais onde pessoas sãs e infectadas convivem entre si e onde são expostas a microrganismos oportunistas e patogénicos. No entanto, o contacto entre indivíduos e agentes infecciosos não determina, por si só, o desenvolvimento de uma patologia infecciosa. Na realidade, existe uma multiplicidade de factores que influenciam a frequência e natureza das IACS. Estes factores podem ser divididos entre intrínsecos e extrínsecos.

Os primeiros dizem respeito a factores de risco relacionados com o doente, que irão favorecer a aquisição e desenvolvimento de infecção. Estão incluídos factores como a idade, a pré-existência de doença, a depressão do sistema imunitário, o tipo e duração de procedimentos de diagnósticos e terapêuticos a que o indivíduo é sujeito e o tempo de permanência do mesmo nas unidades de saúde (WHO, 2002; Mirza, A., 2011). Em termos de idade, à semelhança de outras patologias, indivíduos pertencentes a grupos etários opostos, como sendo a infância e a terceira idade, são reconhecidamente alvos mais fáceis por parte de agentes infecciosos. Por outro lado, indivíduos com doença de carácter crónico apresentam uma maior susceptibilidade a infecções por microrganismos oportunistas, uma vez que o seu sistema imunitário se encontra alterado, tanto pela própria doença, como pela administração crónica de fármacos, terapêutica imunossupressora, quimio- ou radioterapias (Nicolle, L.E., 2002; WHO, 2002).

Actualmente, a utilização de procedimentos médicos progressivamente mais invasivos, tais como exames endoscópicos, biópsias, cateterizações venosas e urinárias, intubação endotraqueal, ventilação mecânica e os próprios procedimentos cirúrgicos, interfere com a barreira de protecção natural do organismo, possibilitando a introdução de microrganismos directamente nos tecidos ou em locais habitualmente estéreis (Nicolle, L.E., 2002; WHO, 2002). Este é, na realidade, um factor de risco com impacto bastante significativo, se tivermos em consideração que os tipos de IACS mais frequentes a nível global são a infecção do tracto urinário, pneumonia associada a ventilação mecânica, infecção do local cirúrgico e infecções hematogénicas (Costa, A.C. *et al.*, 2009; European Centre for Disease Prevention and Control, 2010).

Os factores extrínsecos estão relacionados, por um lado, com o agente infeccioso e, por outro, com o ambiente das unidades de saúde. A capacidade infecciosa de um determinado microrganismo dependerá parcialmente de características tais como a sua resistência à terapêutica antimicrobiana, a sua virulência intrínseca e a quantidade de inóculo infeccioso (WHO, 2002). A emergência de estirpes multi-resistentes está intimamente relacionada com a utilização profiláctica e empírica de fármacos antimicrobianos. Através de mecanismos de selecção e de troca de elementos genéticos de resistência, algumas estirpes microbianas resistem à terapêutica e persistem, podendo mesmo ocorrer a sua disseminação e tornarem-se endémicas numa determinada unidade prestadora de cuidados de saúde (Cezário, R.C., 2008; Costa, A.C. *et al.*, 2009).

O ambiente das unidades de saúde poderá igualmente contribuir para a aquisição de IACS e facilitar a transmissão de agentes patogénicos, ao proporcionar uma elevada concentração de doentes infectados e/ou altamente susceptíveis à infecção num mesmo local, mas também pela frequente transferência de doentes entre serviços e instituições de saúde (Nicolle, L.E., 2002; WHO, 2002; Pina, E. *et al.*, 2010).

iv. Agentes infecciosos e sua transmissão

As IACS podem ser originadas por uma ampla diversidade de agentes patogénicos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas. Os microrganismos infecciosos variam entre as diferentes populações de pacientes, diferentes unidades de saúde e diferentes países.

No entanto, um aspecto comum a todos é a maior frequência de infecções de origem bacteriana (ver Figura 1) (WHO, 2002; European Centre for Disease Prevention and Control, 2010).

De acordo com o Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção, realizado em Portugal no ano de 2009, os microrganismos mais frequentemente isolados neste tipo de infecções (ver Figura 1) foram o *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa* (Costa, A.C. *et al.*, 2009).

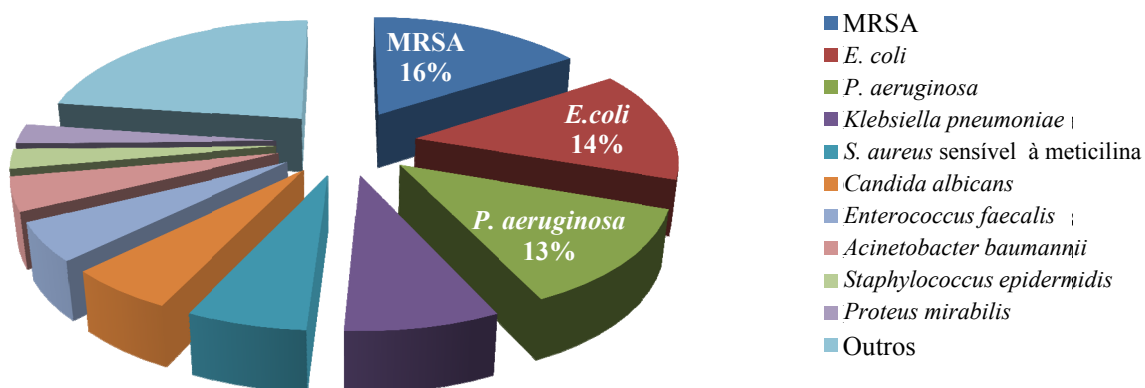


Figura 1. Microrganismos mais frequentemente isolados em IACS em Portugal (Adaptado de Costa *et al.* (2009)).

A transmissão destes microrganismos constitui um risco presente em qualquer etapa da prestação dos cuidados de saúde, principalmente no caso de pacientes imunocomprometidos e/ou aquando do recurso a procedimentos invasivos, tal como referido na secção anterior.

O contacto com os microrganismos responsáveis pela IACS pode ter origem em reservatórios endógenos ou exógenos. As infecções endógenas são originadas por microrganismos da flora permanente ou transitória do paciente, presentes por exemplo ao nível da pele, nasofaringe e tractos gastrointestinal e genital. Pelo contrário, as infecções exógenas têm origem em microrganismos existentes em reservatórios externos ao paciente, adquiridos a partir da flora de outro paciente ou profissional de saúde (infecção cruzada) ou a partir de substâncias ou objectos contaminados, como

equipamentos e dispositivos médicos, água, ar e alimentos (infecção ambiental) (WHO, 2002; Horan, T.C. *et al.*, 2008; Pina, E. *et al.*, 2010; Mirza, A., 2011).

Estes microrganismos podem também ser transmitidos à comunidade através de pacientes, profissionais de saúde e visitantes que tenham sido entretanto colonizados ao permanecerem nas unidades de saúde. Apesar de, na maioria dos casos, não ser desenvolvida infecção, ou provocarem um quadro clínico mais ligeiro, estes microrganismos poderão eventualmente ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma patologia com significado clínico em termos de saúde pública (WHO, 2002).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

A importância epidemiológica e clínica da *Pseudomonas aeruginosa* foi-se alterando ao longo dos anos. Até aos anos 50, raramente se considerava a *P. aeruginosa* como um agente patogénico. Já nos anos 70, começou a ser associada a bacteriémia em doentes neutropénicos. Actualmente, esta é uma das bactérias mais frequentemente envolvidas em infecções associadas à prestação de cuidados de saúde (Giamarellou, H., 2002).

i. Caracterização microbiológica

A bactéria *P. aeruginosa* constitui a espécie-tipo do género *Pseudomonas*, pertencente à família *Pseudomonadaceae* (Sá-Correia, I., 2000). Esta espécie bacteriana apresenta uma morfologia baciliforme recta ou ligeiramente curva, de dimensões entre 0,5 a 1,0 µm de largura e 1,5 a 4,0 µm de comprimento. Quando observada ao microscópio, apresenta-se sob a forma de unidades isoladas, emparelhadas ou em cadeia curta e, devido à existência de um flagelo polar simples, apresentam mobilidade (Pier, G.B. e Ramphal, R., 2010). São microrganismos Gram negativo não formadores de endosporos, classificados tipicamente como aeróbios estritos não fermentadores. No entanto, em situações de microaerofilia ou anaerobiose, são capazes de realizar respiração anaeróbia utilizando nitrato como receptor alternativo de electrões (Sá-Correia, I., 2000).

Em termos de homologia do ARN ribossómico, dentro do género *Pseudomonas* integra o grupo I, mais especificamente o grupo das pseudomonas fluorescentes. Esta classificação deve-se à produção bacteriana de pigmentos fenazínicos hidrossolúveis, de características fluorescentes quando expostos a radiação ultravioleta. A *P. aeruginosa*, em particular, caracteriza-se pela produção de piocianina, responsável pela coloração azulada das colónias, sendo por vezes produzida também a pioverdina, de coloração amarelo esverdeado, o que no conjunto confere aos meios de cultura a coloração verde fluorescente típica desta bactéria (Sá-Correia, I., 2000). Apesar da produção de pigmento fluorescente ser bastante frequente, algumas estirpes não o fazem de forma visível, enquanto que outras produzem pigmentos de colorações distintas, como a piorrubina (pigmento de cor vermelha) e a piomelanina (pigmento de cor castanha) (Pier, G.B. e Ramphal, R., 2010).

Este microrganismo de carácter mesofílico, apresenta temperaturas óptimas de crescimento entre 30 e 37 °C, podendo, no entanto, desenvolver-se ou manter-se viável a temperaturas fora dessa gama. Na verdade, a capacidade da *P. aeruginosa* crescer a 42 °C mas não a 4 °C, permite diferenciá-la de outras pseudomonas fluorescentes clinicamente importantes, tais como *P. fluorescens* e *P. putida* (Sá-Correia, I., 2000; Pier, G.B. e Ramphal, R., 2010).

A morfologia das colónias de *P. aeruginosa* é altamente variável mas, em geral, apresentam-se espalhadas pela placa de cultura, com aspecto achatado e brilho metálico e, por vezes, com aparência mucóide devido à grande produção de um polissacarídeo extracelular (o alginato) principalmente em zonas de crescimento acentuado e amostras provenientes de pacientes com fibrose quística (Pier, G.B. e Ramphal, R., 2010). Outra característica muito comum, quando cultivadas em laboratório, apesar de nem sempre estar presente, diz respeito ao seu odor frutado e fresco típico que permite rapidamente a sua identificação (Pitt, T.L. e Simpson, A.J.H., 2006).

Esta bactéria ambiental apresenta uma distribuição praticamente ubiqüitária, podendo ser isolada do solo, água (doce ou salgada), alimentos, plantas, animais e amostras biológicas, onde se mantém viável por longos períodos de tempo como saprófita, desde que o valor de pH se encontre próximo da neutralidade (Sá-Correia, I., 2000). A sua resistência ambiental é de facto notável, podendo persistir até 16 meses sobre objectos

inanimados (Kramer, A. *et al.*, 2006). São encontradas preferencialmente em ambientes húmidos, podendo colonizar uma enorme variedade de superfícies e meios líquidos, ao nível das unidades de saúde, que virão a constituir reservatórios bacterianos com elevada importância para a saúde pública. São exemplos, os sistemas de distribuição de água, equipamentos endoscópicos e de ventilação mecânica, piscinas de fisio- e hidroterapia, anti-sépticos aquosos, desinfectantes e soro fisiológico (Giamarellou, H., 2002; Kerr, K.G. e Snelling, A.M., 2009).

ii. Importância clínica

A *P. aeruginosa* é reconhecida como um microrganismo oportunista de grande importância clínica, que aproveita eventuais alterações do sistema imunitário do hospedeiro para iniciar o ciclo infeccioso (Lyczak, J.B. *et al.*, 2000). Esta bactéria destaca-se sobretudo pelo seu carácter oportunista, sendo que as infecções mais frequentemente originadas se encontram associadas aos cuidados de saúde, principalmente em ambiente hospitalar. A sua importância clínica baseia-se na crescente frequência deste microrganismo a nível de IACS, onde origina quadros infecciosos severos e de difícil erradicação, consequência de uma ampla expressão de factores de virulência, assim como de uma sensibilidade limitada aos agentes antimicrobianos. A diminuição da susceptibilidade poderá ser explicada pela presença de resistências naturais e/ou adquiridas a muitos antibióticos e desinfectantes químicos e anti-sépticos, como compostos de amónio quaternário, fenol e hexaclorofeno (Pires, E.J.V.C. *et al.*, 2009).

Este agente patogénico apresenta-se como uma das bactérias mais frequentemente isoladas em ambiente hospitalar, pois é preferencialmente nestes locais que se encontram concentrados indivíduos susceptíveis à infecção, como por exemplo indivíduos com fibrose cística, queimados, neutropénicos ou internados em unidades de cuidados intensivos (UCIs), que têm em comum o facto de apresentarem as suas defesas imunitárias comprometidas em virtude de terapêuticas prolongadas e/ou agressivas (Kerr, K.G. e Snelling, A.M., 2009).

iii. Importância epidemiológica

De acordo com o referido anteriormente, um aspecto relevante deste microrganismo é o facto de apresentar variados factores de virulência, assim como múltiplos mecanismos de resistência aos agentes anti-infecciosos convencionais que, no conjunto, têm contribuído para o incremento das taxas de resistência a antibióticos em isolados clínicos ao longo dos anos. De acordo com os sistemas de vigilância, tem-se observado uma tendência preocupante para o aumento da resistência deste agente patogénico aos fármacos anti-pseudomonas (ver Figura 2).

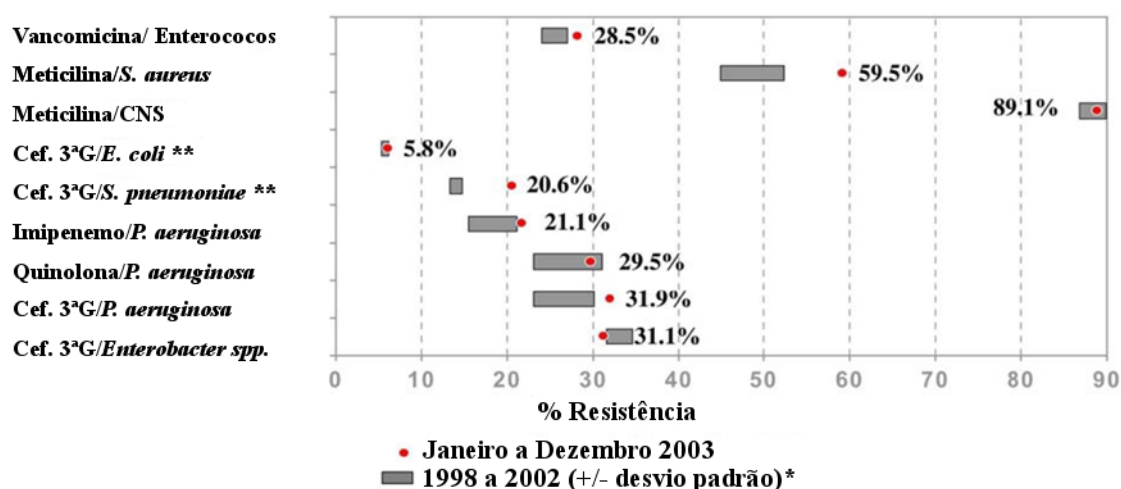


Figura 2. Taxas de resistência de alguns microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos isolados em IACS de UCIs. Comparação dos dados recolhidos entre 1998-2002 com os dados de 2003 (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2004)).

[**Legenda:** CNS, Estafilococos coagulase-negativo; **Cef 3^aG**, resistência a cefalosporinas de 3^a geração (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima); **Quinolona**, resistência tanto a ciprofloxacina como a ofloxacina. * Percentagem (%) de aumento na taxa de resistência (TR) do corrente ano (Janeiro a Dezembro 2003) em comparação com a TR média nos 5 anos anteriores (1998-2002): $[(TR_{2003} - TR_{média(1998-2002)}) / TR_{média(1998-2002)}] \times 100$. ** Taxa de resistência para *E. coli* ou *K. pneumoniae* corresponde à taxa de não susceptibilidade destes tanto ao grupo das cefalosporinas de 3^a geração como ao aztreonamo.]

Em 2004, dados publicados no sistema NNIS (*National Nosocomial Infections Surveillance*) revelaram que estirpes de *P. aeruginosa* isoladas de UCIs apresentavam

taxas de resistência ao imipenemo, fluoroquinolonas e cefalosporinas de 3^a geração de 21,1%, 29,5% e 31,9%, respectivamente. Estas taxas de resistência apresentam-se aumentadas quando em comparação com as taxas de resistência média observadas entre 1998 e 2002 (Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

Ainda neste contexto, a emergência de estirpes multi-resistentes (MR) de *P. aeruginosa* (definida como resistência à ceftazidima, piperacilina, imipenemo e gentamicina) tem-se tornado relativamente comum nas UCIs, havendo uma tendência para o aumento destas. Ainda mais preocupante é a recente tendência para a emergência de estirpes “pan-resistentes”, virtualmente resistentes a todas as classes antimicrobianas correntemente utilizadas na terapêutica, obrigando ao recurso às polimixinas (apesar da sua elevada toxicidade) e à procura de outros fármacos com actividade anti-pseudomonas com mecanismos de acção alternativos (Rossolini, G.M. e Mantengoli, E., 2005).

3. Bacteriófagos

Os bacteriófagos constituem as entidades mais abundantes na superfície terrestre, com um valor estimado de 10^{30} a 10^{32} partículas, apresentando uma distribuição ubiqüitária ao nível dos oceanos, solo, alimentos e águas de consumo. Pela sua elevada especificidade, capacidade de sobrevivência a longo prazo e rápida capacidade de replicação em hospedeiros bacterianos adequados, contribuem para a manutenção do equilíbrio microbiano dos ecossistemas (Kutter, E. e Sulakvelidze, A., 2005; Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005).

Actualmente, tem-se observado um renascido interesse na investigação aplicada aos bacteriófagos, pelo (renovado) reconhecimento do seu interesse público e científico em potenciais aplicações contra bactérias resistentes aos antibióticos químicos convencionais (Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005; Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006; Hagens, S. e Loessner, M.J., 2007; Hanlon, G.W., 2007; Schmelcher, M. e Loessner, M.J., 2008; Ripp, S., 2010). Estas entidades biológicas são potenciais adjuvantes/complementos à antibioterapia convencional pelo facto de: (i) apresentarem baixa toxicidade inerente devido à sua elevada especificidade para uma determinada

bactéria hospedeira sobre a qual têm uma acção bactericida; (ii) pela mínima interferência com a flora biológica; (iii) existir uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistências bacterianas; (iv) potencial administração única e em baixas concentrações pelo facto destes se reproduzirem exponencialmente enquanto existir o hospedeiro bacteriano; (v) auto-eliminação dos bacteriófagos com o desaparecimento dos agentes patogénicos que constituem o seu alvo de acção; (vi) baixo custo para o seu isolamento e propagação e (vii) pela rara existência de efeitos adversos (Carlton, R.M., 1999; Inal, J.M., 2003; Loc-Carrillo, C. e Abedon, S.T., 2011).

i. Caracterização geral

Os bacteriófagos, frequentemente referidos como fagos, são vírus que infectam única e exclusivamente células bacterianas. Cada partícula fágica (virião) contém o seu próprio material genético (ADN ou ARN) encapsulado num invólucro proteico ou lipoproteico (cápside), sendo que o conjunto formado por ambos constitui a nucleocápside (Guttman, B. *et al.*, 2005; Garbe, J., 2010). A cápside confere protecção à informação genética, estando envolvida na adsorção a epítomos específicos à superfície do hospedeiro. O alvo de cada fago é um grupo específico de bactérias, constituído por estirpes de uma mesma espécie ou mesmo espécies diferentes mas relacionadas entre si (Guttman, B. *et al.*, 2005).

À semelhança dos outros vírus, os fagos são parasitas obrigatórios, necessitando de um organismo hospedeiro para se multiplicarem e disseminarem. Apesar de transportarem toda a informação genética para o direccionamento da sua reprodução no seio de bactérias permissivas, não possuem a maquinaria metabólica necessária à produção de energia, nem ribossomas para a síntese proteica (Guttman, B. *et al.*, 2005).

Oficialmente, existem 13 famílias de fagos procariotas aceites, sendo a classificação destes baseada na sua morfologia e natureza dos seus ácidos nucleicos (Ackermann, H.W., 2005; Ackermann, H.W., 2007). Estes podem apresentar ARN ou ADN, tanto de cadeia simples como dupla, sendo que apenas 2 famílias de vírus apresentam ARN como material genético. Até à data, cerca de 95% de todos os fagos descritos na literatura pertencem à ordem *Caudovirales*, apresentando ADN de cadeia dupla e uma

cápside icosaédrica. De entre estes fagos, são diferenciadas 3 famílias principais de acordo com as distintas morfologias da cauda, sendo 65% *Siphoviridae*, com caudas longas e flexíveis, 25% *Myoviridae*, com caudas contrácteis de camada dupla e 15% *Podoviridae*, com caudas curtas (ver Figura 3). As restantes 10 famílias de fagos, que não apresentam cauda, possuem poucos membros descritos até à data, sendo diferenciados pela forma e dimensões da cápside, presença ou ausência de invólucro lipídico, tipo e apresentação do material genético e forma de libertação da progenia.

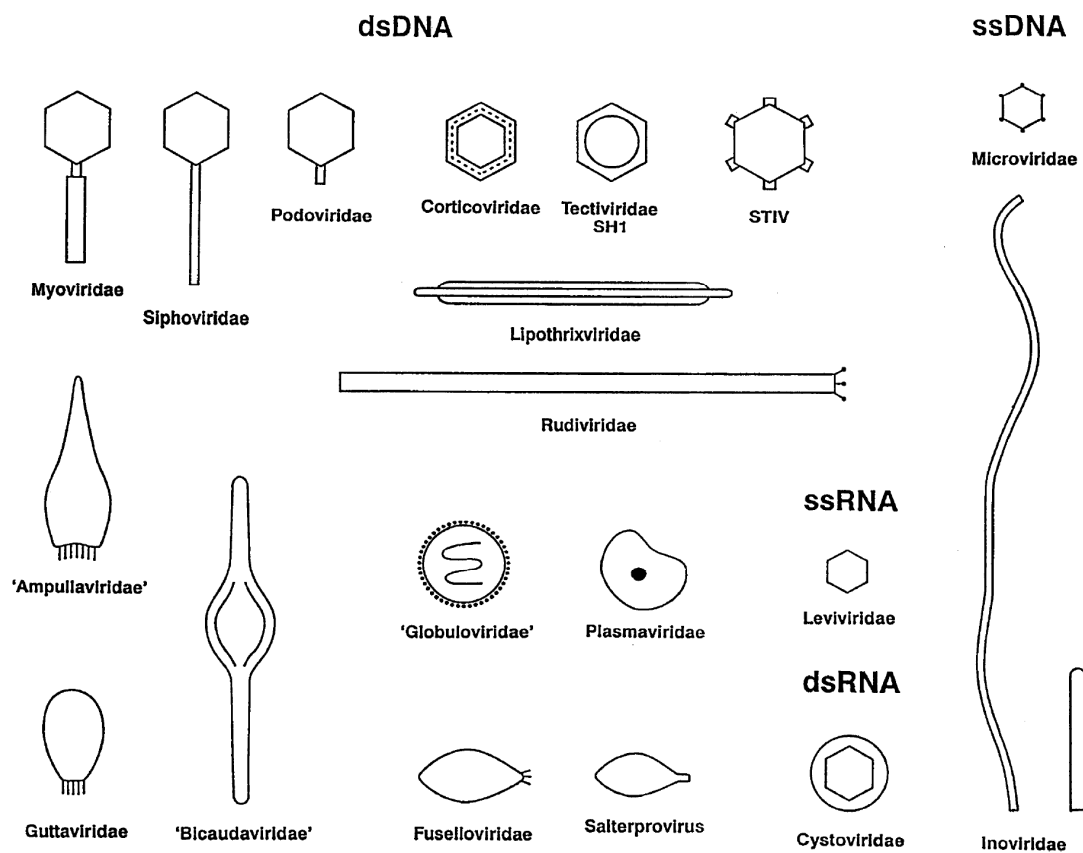


Figura 3. Tipos de morfologia dos bacteriófagos (Retirado de Ackermann (2007)).

Os bacteriófagos podem igualmente ser divididos em duas classes baseadas no tipo de interacção com a célula hospedeira: fagos virulentos ou líticos e fagos temperados (Guttman, B. *et al.*, 2005; Garbe, J., 2010). Os primeiros apenas se podem multiplicar através de um ciclo lítico; o virião adsorve à superfície da célula hospedeira onde injecta o seu material genético que irá manipular o metabolismo bacteriano no sentido da produção de mais fagos. A célula hospedeira acaba por lisar ao final de alguns minutos ou horas, libertando a progenia fágica (ver Figura 4).

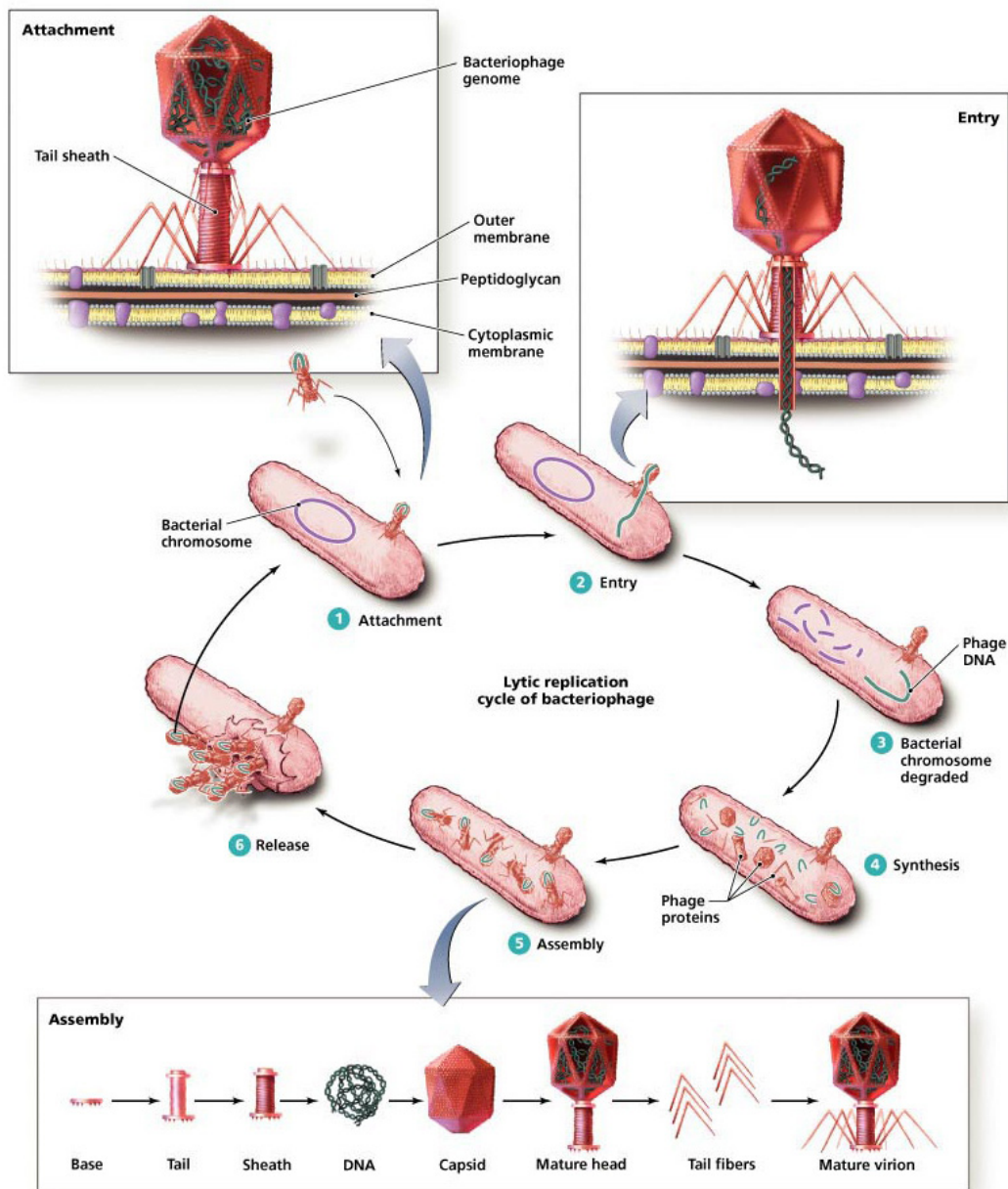


Figura 4. Ciclo lítico de replicação dos bacteriófagos (Retirado de Roberts (2006)).

Na Figura 5 pode ver-se em detalhe o processo de replicação fágica ao longo do tempo, após ocorrer a infecção, que culmina com a lise da célula bacteriana hospedeira.

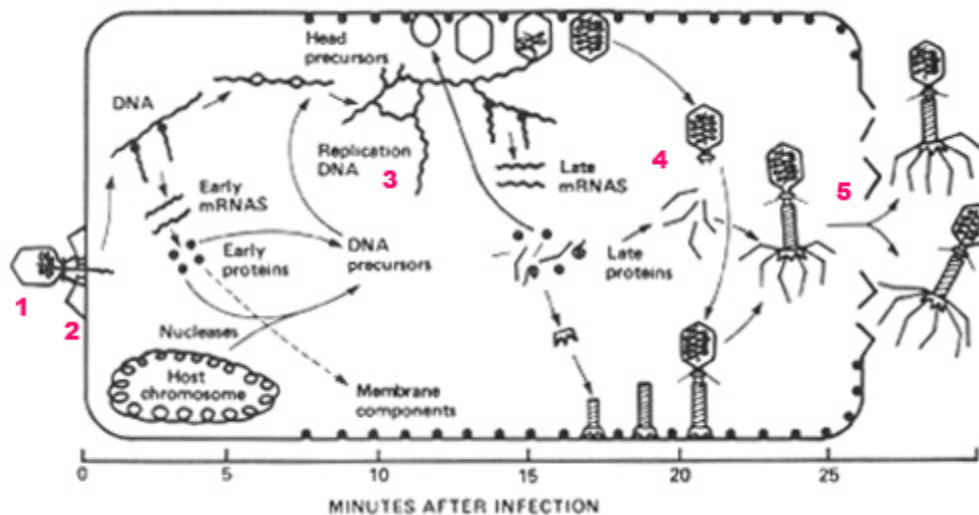


Figura 5. Duração temporal de um ciclo lítico de replicação dos bacteriófagos (Adaptado de Lin *et al.* (1984)).

[Legenda: 1. **Adsorção** (o bacteriófago adere com as suas fibras da cauda a receptores de lipopolissacárido e triptofano à superfície do hospedeiro bacteriano); 2. **Penetração** (o bacteriófago penetra a parede da célula bacteriana aproximando e contactando a placa da base com a superfície da célula, o que permite uma alteração conformacional que faz com que a bainha se contraia e perfure a membrana celular, permitindo que o núcleo viral entre na célula e liberte o genoma viral (dsDNA, ADN de cadeia dupla). Assim começa o complexo comportamento deste genoma viral. Alguns dos primeiros genes que são transcritos, chamados precoces, codificam enzimas que hidrolizam (em apenas alguns minutos após a infecção) o ADN do hospedeiro. O ADN do hospedeiro é hidrolizado por forma a utilizar os nucleotídeos do hospedeiro para produzir mais ADN viral); 3. **Replicação** (genes iniciais, atrasados, codificam as cerca de 20 proteínas que estão envolvidas na replicação viral. Numa primeira fase, a replicação ocorre de forma bidireccional com multiplas origens de replicação no genoma. Os primeiros ciclos de replicação são iniciados por *primers* de ARN sintetizados pela ARN-polimerase do hospedeiro. Numa segunda fase, o fago usa a sua própria maquinaria replicativa para transcrever os seus genes tardios); 4. **Montagem** (uma vez expressos os genes tardios, (i) a placa da base viral é primeiro montada, que depois se liga (ii) à cauda e (iii) às proteínas das fibras da cauda. Estas três diferentes vias proteicas combinam-se para formar uma cápside fágica madura. O ADN é empacotado na cápside proteica madura. A cápside também encerra enzimas necessárias para futuras infecções, tais como a ADN-polimerase codificada viralmente); 5. **Libertação** (a enzima holina, codificada viralmente, produz buracos na membrana interior da célula hospedeira bacteriana para permitir que as lisozimas saiam e degradem a parede celular de peptidoglicano. À lise celular segue-se a libertação de uma chuva de progenia bacteriofágica para o espaço extracelular)].

Em contraste, os fagos temperados podem apresentar duas vias replicativas alternativas quando infectam uma nova célula hospedeira (ver Figura 6). Por vezes, tal como nos fagos líticos, a infecção fágica dá início a um ciclo lítico, resultando consequentemente na lise da célula bacteriana e libertação da progenia fágica. Em alternativa, as partículas fágicas podem desencadear um ciclo lisogénico, no qual o genoma fágico assume um estado quiescente designado por pró-fago, sendo integrado no genoma hospedeiro ou mantendo-se no interior deste sob a forma de plasmídeos. Essa condição mantém-se com a reprodução do hospedeiro, originando clones bacterianos contendo os pró-fagos, sendo as células designadas por lisogénicas. Eventualmente um destes pró-fagos abandona o estado quiescente e desencadeia um ciclo lítico.

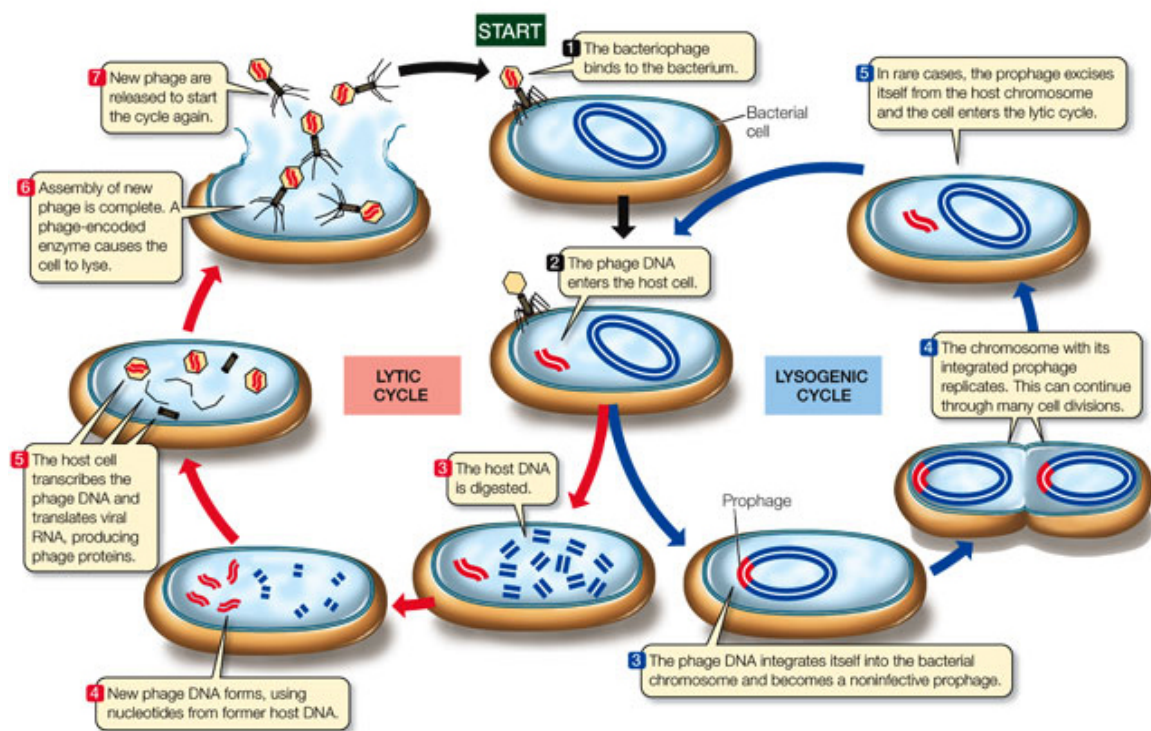


Figura 6. Diferença entre ciclo lítico e ciclo lisogénico, na infecção fágica (Retirado de Purves *et al.* (2007)).

A sensibilidade dos fagos relativamente a agentes químicos e físicos é altamente variável e imprevisível, sendo necessário proceder individualmente à sua determinação experimental (Carlson, K., 2005). No entanto, é possível generalizar alguns princípios, nomeadamente em relação à susceptibilidade dos fagos à radiação ultravioleta, luz natural directa, assim como iluminação fluorescente. Para além destas condições, outros

factores que afectam potencialmente a viabilidade fágica dizem respeito ao valor de pH (sendo os fagos geralmente estáveis entre valores de pH compreendidos entre 5 e 8), presença de ácido ascórbico, agentes de desnaturação proteica (como a ureia, o uretano e detergentes), agentes quelantes, agentes mutagénicos (como o óxido nítrico) e a aplicação de temperaturas elevadas (Adams, M.H., 1959; Carlson, K., 2005). Deve igualmente ser evitada a exposição dos fagos a choques osmóticos e agitação vigorosa das soluções com pipetas ou vórtex. Dependendo do tipo particular de fago e das condições utilizadas na preparação e conservação das soluções *stock* de fago, o período durante o qual manterão totalmente a sua viabilidade será muito variável, sendo aconselhável proceder à determinação do título fágico das soluções aquando da sua preparação e antes da sua utilização.

De uma forma geral, em termos microbiológicos, estes podem ser replicados (ou propagados) em qualquer meio de cultura, e sob as condições necessárias ao crescimento do seu hospedeiro (Carlson, K., 2005).

ii. Utilização de bacteriófagos na detecção de microrganismos patogénicos

No desenvolvimento de metodologias para a detecção de patógenos bacterianos em alimentos, amostras clínicas e ambientais, os principais requisitos procurados são a rapidez, sensibilidade e especificidade. Estes testes deverão igualmente apresentar um baixo custo e serem de fácil execução e robustez, ou seja, deverão ser de aplicação exequível para variadas condições e tipos de amostras (Schmelcher, M. e Loessner, M.J., 2008; Smartt, A. e Ripp, S., 2011). Estes requisitos são de particular importância quando se pretende proceder à aplicação de tais testes em países em desenvolvimento, onde os recursos económicos escasseiam e as patologias microbianas são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade a elas associadas (Smietana, M. *et al.*, 2011).

As metodologias convencionais de cultivo em microbiologia fazem uso de meios de cultura selectivos, assim como de técnicas específicas de caracterização bioquímica e serológica, sendo consideradas o *gold standard* no que se refere à detecção bacteriana e contagem de células bacterianas (Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006; Smietana, M. *et al.*,

2011). De uma forma geral estas técnicas apresentam elevada sensibilidade, mas no entanto apresentam algumas desvantagens associadas à necessidade de etapas morosas de enriquecimento das amostras e desenvolvimento de colónias bacterianas visíveis, não permitindo muitas vezes a obtenção atempada de resultados.

Este e outros problemas podem ser solucionados pela utilização de métodos de detecção não culturais, como por exemplo técnicas de cromatografia gasosa e/ou líquida associadas a espectrofotometria de massa ou ainda sistemas de detecção bioquímica, como por exemplo o PCR e os imunoenaios do tipo ELISA. No entanto, apesar da elevada sensibilidade e selectividade que caracterizam estas técnicas, as mesmas apresentam igualmente algumas desvantagens que limitam a sua aplicação generalizada, como sendo o envolvimento de custos acrescidos com equipamentos complexos, a necessidade de formação especializada para a operação dos equipamentos analíticos e etapas complexas de pré-processamento das amostras, assim como dificuldades associadas à elaboração das metodologias e interpretação dos resultados daí resultantes (Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005; Smietana, M. *et al.*, 2011). Adicionalmente, estas metodologias foram desenhadas para utilização em ambiente laboratorial, não sendo viável a sua utilização fora deste âmbito.

Neste sentido, têm-se reunido esforços para o desenvolvimento de metodologias eficientes e económicas para a detecção de bactérias patogénicas, que permitam a obtenção rápida e fiável de resultados, com elevada sensibilidade e aplicabilidade directamente no terreno. Assim, uma área que tem atraído cada vez mais atenção, diz respeito à utilização de bacteriófagos líticos como elementos de reconhecimento de bactérias patogénicas, sendo alvo de trabalhos de I&D nos últimos anos (McNerney, R., 1999; Mole, R.J. e Maskell, T.W.O., 2001; Pai, M. e Kalantri, S.P., 2005; Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005; Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006; Hagens, S. e Loessner, M.J., 2007; Hanlon, G.W., 2007; Schmelcher, M. e Loessner, M.J., 2008; Ripp, S., 2010; Smietana, M. *et al.*, 2011).

Ao contrário de outras técnicas, baseadas em anticorpos (ELISA) ou na amplificação de ácidos nucleicos (PCR), que foram desenvolvidas para permitir a diferenciação de estruturas celulares bacterianas, o mecanismo de reconhecimento fágico reflecte um sistema que evoluiu naturalmente, no qual os fagos especificamente reconhecem e se

ligam apenas às suas células hospedeiras, constituindo assim ferramentas ideais para a detecção de patógenos bacterianos (Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005). Para além da sua elevada especificidade e sensibilidade, os bacteriófagos apresentam ainda como vantagens: (i) completa inocuidade para seres humanos e animais, (ii) rápida e fácil propagação a baixo custo, (iii) capacidade de distinção entre células viáveis e células não viáveis, e (iv) tempo de vida bastante superior ao dos anticorpos. Adicionalmente, os reservatórios de fagos com especificidade para amplas gamas de hospedeiros são virtualmente ilimitados, encontrando-se disponíveis nos mesmos ambientes que os hospedeiros bacterianos. À semelhança dos anticorpos e dos ácidos nucleicos, também os bacteriófagos podem ser imobilizados (contidos) em matrizes de suporte para futura utilização, através de simples metodologias de adsorção e/ou encapsulação (Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006; Hagens, S. e Loessner, M.J., 2007).

A elevada especificidade dos fagos para os seus hospedeiros tem sido explorada ao longo dos últimos anos na tentativa de desenvolvimento de metodologias direccionadas para o reconhecimento e diferenciação da bactéria hospedeira em particular. Uma das primeiras aplicações dos fagos foi em esquemas de tipagem fágica, onde um conjunto de fagos com diferentes espectros líticos é utilizado para discriminar isolados bacterianos, de acordo com a sua capacidade para infectar as células e originar placas de lise fágicas (Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006). As diferenças existentes na capacidade infecciosa reflectem variações numa série de características celulares, tais como os receptores de superfície das células bacterianas e a presença de sistemas de restrição modificados, fazendo com que os ensaios sejam altamente reprodutíveis (Rees, C.E.D. e Loessner, M.J., 2005; Rees, C.E. e Dodd, C.E., 2006; Schmelcher, M. e Loessner, M.J., 2008).

Mais recentemente, têm sido desenvolvidas algumas tentativas para detecção de microrganismos com recurso a bacteriófagos, incluindo o uso de fagos nativos ou geneticamente modificados, explorando cada uma das etapas do ciclo de replicação de fagos virulentos, desde a sua adsorção à membrana celular até à lise da célula hospedeira. Os ensaios de amplificação de fagos estão entre os métodos de mais fácil execução, fazendo uso da especificidade dos fagos para com determinados hospedeiros (Mole, R.J. e Maskell, T.W.O., 2001; Shenai, S. *et al.*, 2002). A capacidade destes para infectarem e lisarem células do hospedeiro pode ser utilizada em ensaios que detectam a

libertação de moléculas do citoplasma bacteriano. O reconhecimento da parede celular, a adsorção do fago e a injeção do seu ADN no citoplasma da bactéria hospedeira têm igualmente sido explorados no desenvolvimento de métodos de detecção, incluindo a captura de células por fagos imobilizados e a marcação do hospedeiro-alvo por partículas fágicas dotadas de fluorescência (Mosier-Boss, P.A. *et al.*, 2003; Smartt, A. e Ripp, S., 2011). De uma forma geral, o material genético dos fagos codifica moléculas de elevada afinidade e especificidade, tais como proteínas da cauda ou domínios de ligação das endolisinas fágicas para a parede celular bacteriana, que têm demonstrado ser adequadas para este fim, especialmente quando associadas a técnicas de separação magnética das bactérias capturadas. Para a detecção bacteriana, tem-se recorrido igualmente à utilização de fagos repórter, ou seja, fagos geneticamente modificados nos quais são introduzidos genes que transmitem um sinal visualmente reconhecível e detectado com elevada sensibilidade, correlacionado com a ocorrência de ligação ou infecção dos hospedeiros (Smartt, A. e Ripp, S., 2011). Outros métodos de detecção utilizam fagos sem fazer uso da sua especificidade para os hospedeiros. A técnica de *phage display* é uma técnica popular que pode ser usada para a produção de moléculas de elevada afinidade para o reconhecimento de bactérias patogénicas. Esta técnica faz uso de bacteriófagos geneticamente modificados por forma a expressarem pequenas sequências peptídicas na sua superfície, que permitirão posteriormente rastrear vários tipos de amostras em busca de receptores específicos para esses mesmos epítomos (Azzazy, H.M.E. e Highsmith Jr, W.E., 2002). Uma vez que os genes responsáveis pela expressão dos peptídeos de superfície se encontram inseridos no genoma do bacteriófago, a recuperação das partículas virais que estabeleceram ligação passa pela promoção de uma infecção bacteriana com um hospedeiro específico do fago, e posterior identificação do peptídeo responsável pela ligação (Schmelcher, M. e Loessner, M.J., 2008).

Assim, por todos os aspectos acima referidos, o uso de fagos em sistemas para detecção de bactérias patogénicas oferece alternativas interessantes e vantajosas em comparação com os tradicionais métodos de cultura microbiológica e analíticos.

iii. Bacteriófago DSM JG004

O bacteriófago DSM JG004 pertence à família *Myoviridae*, integrada na ordem *Caudovirales*, e apresenta actividade lítica contra um espectro alargado de estirpes de *P. aeruginosa*. O espectro de acção alargado abrange mesmo estirpes mutantes *mucA*, produtoras de elevadas quantidades de exopolissacarídeos e que apresentam fenótipo mucóide. O receptor bacteriano para este fago foi analisado por Garbe e colaboradores (2011), através da exposição deste a estirpes de *P. aeruginosa* mutantes para alguns componentes estruturais, tendo determinado tratar-se dos lipopolissacarídeos (LPS).

Em termos morfológicos, tal como se pode observar na Figura 7, este fago apresenta uma cápside isométrica hexagonal de 67nm de diâmetro e uma cauda contráctil, da qual fazem parte o pescoço, uma bainha contráctil e um tubo central, totalizando um comprimento de 115 nm (Garbe, J. *et al.*, 2011).

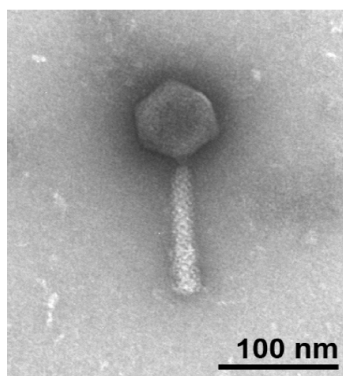


Figura 7. Caracterização morfológica do fago JG004 por coloração negativa com 2% de acetato de uranilo, seguida de análise por microscopia electrónica de transmissão (TEM) (Retirado de Garbe *et al.* (2011)).

Este bacteriófago apresenta uma fase de latência de 31 minutos e, após infectar as células hospedeiras, é capaz de originar uma progenia de 13 partículas fágicas por cada célula bacteriana infectada. Relativamente ao seu genoma, este apresenta uma molécula de DNA com 93017 pares de bases, organizadas em cadeia dupla.

4. Imobilização de entidades biológicas em matrizes biopoliméricas

i. Metodologias de imobilização

A imobilização de moléculas bioactivas ou células pode ser definida como a restrição ou localização do seu movimento na fracção aquosa de um sistema, como consequência do alojamento no interior ou na superfície de um agente imobilizador, tendo por objectivo a sua estabilização estrutural e/ou funcional (Tampion, J. e Tampion, M.D., 1987; Balcão, V.M. *et al.*, 2001b; Canilha, L. *et al.*, 2006; Covizzi, L.G. *et al.*, 2007). A imobilização permite proteger as células ou moléculas bioactivas de tensões ambientais, como o pH, temperatura, sais, solventes, inibidores e outros agentes que interfiram com a sua actividade (bio)catalítica (Souza Junior, W.C., 2006).

Está disponível uma grande variedade de técnicas para a imobilização de células ou moléculas bioactivas, assim como uma ampla variedade de suportes naturais e sintéticos. A escolha da metodologia, assim como o tipo de suporte, a serem empregues num determinado processo, devem ser empiricamente definidos, recaindo a escolha sobre aquele binómio que permita uma maior retenção de actividade. Esta escolha dependerá basicamente de dois factores, nomeadamente das características do material biológico e das condições de utilização do sistema imobilizado, não sendo possível definir um método geral de imobilização nem um suporte universal que se adapte a qualquer (bio)processo (Bickerstaff, G.F., 1997; Canilha, L. *et al.*, 2006).

Entre os métodos actualmente disponíveis são de salientar as metodologias de natureza física, como a adsorção a suportes insolúveis, o aprisionamento em matrizes poliméricas porosas ou o encapsulamento por uma membrana polimérica, metodologias químicas, nomeadamente a ligação covalente (uni- ou multipontual) ou iónica a suportes insolúveis, e a reticulação através do estabelecimento de ligações covalentes cruzadas por reagentes multifuncionais (Tampion, J. e Tampion, M.D., 1987; Bickerstaff, G.F., 1997; Souza Junior, W.C., 2006).

A imobilização por ligação a suportes macroscópicos insolúveis pode ser conseguida através de forças electrostáticas ou covalentes entre grupos reactivos do suporte e do material biológico a imobilizar (Balcão, V.M. *et al.*, 2001a; Balcão, V.M. *et al.*, 2001b;

Lamas, E.M. *et al.*, 2001; Barros, R.M. *et al.*, 2003; Neri, D.F.M. *et al.*, 2008a; Neri, D.F.M. *et al.*, 2008b; Neri, D.F.M. *et al.*, 2009a; Neri, D.F.M. *et al.*, 2009b; Neri, D.F.M. *et al.*, 2011a; Neri, D.F.M. *et al.*, 2011b). A ligação por meio de adsorção e/ou interações iónicas, apesar de ser uma metodologia simples e barata, pela reversibilidade das ligações estabelecidas, apresenta como principal desvantagem a possível perda dos biocatalisadores imobilizados (ou de subunidades dos mesmos, tratando-se de enzimas multiméricas) para o meio reaccional, impedindo a sua utilização em condições mais agressivas (Bickerstaff, G.F., 1997). Por outro lado, a imobilização através de ligações covalentes permite obter uma interacção biocatalisador-suporte mais forte, havendo no entanto o risco de, no caso de células microbianas, produzir danos na membrana celular (Bickerstaff, G.F., 1997; Canilha, L. *et al.*, 2006).

A imobilização de entidades biológicas conseguida pelo aprisionamento em matrizes porosas, como por exemplo matrizes (bio)poliméricas de alginato e de agar, envolve geralmente a síntese *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados (Bickerstaff, G.F., 1997). Ao mesmo tempo que se impede a sua difusão para o meio circunvizinho, devendo para tal os poros da matriz formada apresentarem um diâmetro inferior ao do material a imobilizar, é permitida simultaneamente a transferência de nutrientes, gases e metabolitos (Covizzi, L.G. *et al.*, 2007). Este método tem encontrado uma aplicabilidade amplamente difundida na imobilização de células viáveis, pela possibilidade de utilização de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização, permitindo a protecção das células face a condições de pH e temperatura afastadas das fisiológicas, presença de solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio externo.

Outra alternativa, passa pela imobilização via encapsulação ou microencapsulação, consistindo na contenção por membranas pré-formadas (designadamente reactores de fibras ocas) ou a formação *in situ* de uma membrana em torno das moléculas bioactivas a serem imobilizadas (Balcão, V.M. *et al.*, 1996; Balcão, V.M. e Malcata, F.X., 1998; Park, J.K. e Chang, H.N., 2000; Covizzi, L.G. *et al.*, 2007; Moutinho, C.G. *et al.*, 2011). Esta metodologia tem sido utilizada como alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, pela maior capacidade de contenção de células e menor perda de células para o meio exterior (Canilha, L. *et al.*, 2006). Um exemplo clássico desta metodologia é a

encapsulação em microesferas de alginato de cálcio, obtidas pelo gotejamento de uma solução polimérica de alginato de sódio (contendo disperso o material biológico a imobilizar) sobre uma solução de cloreto de cálcio (Covizzi, L.G. *et al.*, 2007).

Existe ainda a possibilidade de imobilização sem recurso a um suporte físico, através da agregação ou floculação de células (ou moléculas bioactivas) de forma natural ou artificialmente induzida. Desta forma, são formados agregados insolúveis de elevado peso molecular, por ligação das partículas de biocatalisador entre si, geralmente por acção de um reagente bifuncional ou multifuncional como o glutaraldeído. A floculação natural é possível, apesar de ser uma propriedade restrita de algumas células, dando origem a agregados celulares naturais que são geralmente instáveis e muitíssimo sensíveis a tensões de corte. A adição de agentes químicos que levam ao estabelecimento de ligações covalentes cruzadas entre as células, permite obter complexos mais estáveis, sob risco de diminuir a actividade catalítica e/ou metabólica das células imobilizadas pela utilização de agentes tóxicos (Bickerstaff, G.F., 1997; Canilha, L. *et al.*, 2006).

ii. Biopolímeros para imobilização

Apesar de existir uma enorme variedade de biopolímeros que poderia ser utilizada no desenvolvimento de hidrogéis para imobilização de microrganismos, células, moléculas bioactivas ou outras entidades biológicas, nesta curta revisão bibliográfica apenas serão abordados aqueles que foram mais explorados ao longo deste estudo, tendo originado matrizes estáveis e de características adequadas ao objectivo final do trabalho de I&D aplicada, nomeadamente, o agar e o alginato de sódio.

Desta forma, serão revistas algumas características físico-químicas de cada um deles, assim como detalhes sobre os mecanismos de gelificação/polimerização descritos na literatura, úteis para a posterior optimização das condições experimentais a utilizar no desenvolvimento de hidrogéis para imobilização física de bacteriófagos.

a. Agar-agar

O agar é um complexo coloidal de polissacarídeo linear, de carácter hidrofílico, extraído a partir dos agarócitos de algas marinhas vermelhas pertencentes à classe *Rhodophyceae*, principalmente das espécies *Gracilaria*, *Gelidium* e *Pterocladia*.

É constituído maioritariamente por duas fracções, a agarose e a agarpectina, estruturalmente organizadas em cadeias polissacarídicas complexas, com alternância de resíduos de galactose interligados através de ligações α -(1,3) e β -(1,4) (Stanley, N.F., 2006; Rowe, R.C. *et al.*, 2009). A agarose, componente maioritário, apresenta-se como um polímero linear neutro de unidades monoméricas de agarobiose, sendo a fracção responsável pela capacidade intrínseca de gelificação do agar. A agarpectina, fracção não-gelificante, corresponde a uma mistura heterogénea de moléculas acídicas de menores dimensões, nomeadamente agarose, percentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurónico e pequenas quantidades de ácido pirúvico (Stanley, N.F., 2006).

Tendo em consideração que a fracção gelificante é neutra, o agar apresenta um mecanismo de gelificação termotrópico, ou seja, gelifica em consequência do simples arrefecimento da solução, sem que haja necessidade de adicionar outros elementos ou recorrer a reacções químicas. Apesar de ser praticamente insolúvel em água a 25 °C, dá origem a soluções homogéneas quando aquecido entre os 85 °C e os 95 °C, produzindo-se um aumento da sua viscosidade com o abaixamento da temperatura até 32 °C – 45 °C e consequente gelificação da solução. Este fenómeno de histerese térmica, ou seja, a diferença entre o ponto de fusão e gelificação, permite a exposição do gel a temperaturas relativamente elevadas sem que ocorra a sua fusão (McHugh, D.J., 1987; Stanley, N.F., 2006).

Segundo Stanley (2006), o mecanismo de gelificação da agarose ocorre devido à formação de, e associação molecular de, cadeias de soluto em estruturas de dupla hélice, que originam uma estrutura reticular capaz de imobilizar o solvente no seu interior. Ao longo do tempo, estes géis estão sujeitos à ocorrência de sinerese, definida como a expulsão espontânea do solvente aquoso através da superfície do gel em repouso, consequência da contracção da cadeia reticular do polímero, aproximação das duplas hélices e diminuição do espaço intersticial onde se encontram retidas as moléculas de

solvente. A utilização de agar rico em grupos sulfato minimiza a ocorrência deste fenómeno mas, outros factores como a concentração do polímero, pH, tempo e proporção de açúcares, poderão interferir igualmente com a sinerese do gel.

De uma forma geral, estes géis apresentam-se mais estáveis a pH neutro ou ligeiramente alcalino, sendo que uma diminuição de pH conduz à diminuição da força do gel, e a adição de açúcares ou sais, como o cloreto de sódio, contribui para um aumento da força do gel, resultando em géis de maior dureza mas com menor coesão (Rowe, R.C. *et al.*, 2009).

Este biopolímero possui uma elevada importância a nível comercial devido ao alto poder de gelificação e à elevada força dos géis originados a baixas concentrações de polímero (0,2% - 2%), encontrando assim uma vasta aplicação em ensaios microbiológicos e nas indústrias farmacêutica e alimentar. Destaca-se igualmente a baixa viscosidade apresentada quando em solução, a elevada transparência dos géis produzidas, assim como a histerese e termo-reversibilidade a temperaturas de fusão/gelificação bem definidas. Em microbiologia, as principais vantagens do agar dizem respeito à sua inércia e ausência de inibidores capazes de interferirem com o normal desenvolvimento dos microrganismos (McHugh, D.J., 1987).

b. Alginato de sódio

O alginato de sódio corresponde ao sal sódico do ácido algínico, obtido por extracção alcalina a partir de algas marinhas da classe *Phaeophyceae*, principalmente das espécies *Laminaria*, *Macrocystis* e *Ascophyllum*. Apesar de estas constituírem a principal fonte comercial de alginatos, algumas bactérias são também capazes de o sintetizar, entre as quais a *Azotobacter vinelandii*, a *Azotobacter chroococcum* e algumas espécies do género *Pseudomonas*.

Este biopolímero destaca-se por ser de origem natural, ser sustentável, ser renovável, ser atóxico, ser biocompatível e biodegradável, ter um baixo custo associado, ser hidrofílico, e originar hidrogéis termicamente estáveis, encontrando uma vasta aplicação em vários sectores industriais, entre os quais se salientam as indústrias alimentar, farmacêutica, têxtil e do papel (Kuo, C.K. e Ma, P.X., 2001).

Do ponto de vista molecular, apresenta-se como um copolímero linear, constituído por dois tipos de unidades monoméricas, os ácidos β -D-manurónico (M) e α -L-gulurónico (G), unidos através de ligações glicosídicas 1→4 (Infarmed, 2005). A sequência e proporção destes resíduos é muito variável, dependendo da fonte a partir da qual foi extraído, podendo encontrar-se dispostos continuamente, originando blocos homopoliméricos MM ou GG, ou alternadamente, dando origem a blocos heteropoliméricos MG (ver Figura 8). Essa estrutura em blocos é responsável pelas propriedades físicas do polímero e do hidrogel por ele originado.

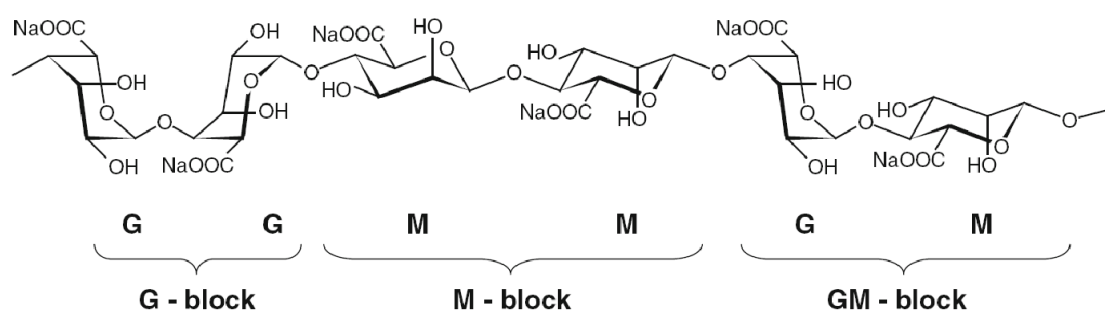


Figura 8. Cadeia polimérica de um alginato formada por blocos MM, blocos GG e blocos MG (Retirado de Donati e Paoletti (2009)).

Este biopolímero é lentamente solúvel na água, com ou sem aquecimento, resultando em soluções coloidais viscosas que sofrem uma transição sol/gel em contacto com catiões multivalentes (Infarmed, 2005). Apresenta incompatibilidade com metais pesados e aminas quaternárias catiónicas, que podem conduzir à sua degradação alcalina ou precipitação. De uma forma geral, as soluções de alginato de sódio são estáveis preferencialmente a valores de pH próximos da neutralidade, sendo que a valores de pH superiores a 10 são instáveis, enquanto que a valores de pH abaixo de 3,5 ocorre a sua precipitação (Nussinovitch, A., 1997).

O processo de gelificação do alginato está relacionado com a sua afinidade em relação a determinados catiões polivalentes, especialmente iões cálcio, e a capacidade em estabelecer com estes ligações selectivas, para dar origem a géis termoestáveis e insolúveis. A selectividade destes iões (Ca^{2+}) está intimamente relacionada com a proporção de blocos G, para a qual contribui a conformação estrutural adquirida pela

ligação diaxial entre resíduos G, assim como a presença de grupos carboxilo e hidroxilo em cada resíduo da cadeia polimérica (Smidsrod, O., 1975). A formação de hidrogéis de alginato na presença de íons cálcio é convencionalmente explicada através do modelo “*egg-box*” (ver Figura 9), segundo o qual os íons bivalentes de cálcio interagem com os grupos carboxilo dos resíduos G das cadeias poliméricas através de ligações iônicas cruzadas, dando origem a uma rede polimérica tridimensional (Donati, I. e Paoletti, S., 2009).

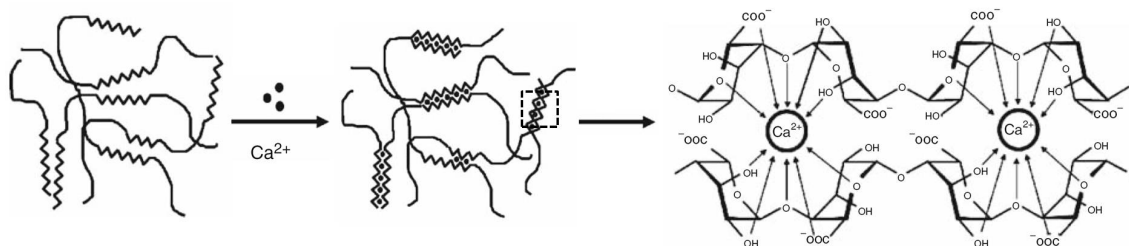


Figura 9. Modelo “*egg-box*” para a formação de hidrogéis de alginato na presença de íons cálcio (Adaptado de Donati e Paoletti (2009)).

Apesar de ser possível obter hidrogéis de alginato por tratamento com soluções ácidas, a maioria é conseguida por mecanismos de troca iônica do sódio presente nas moléculas de alginato de sódio pelos íons cálcio existentes no meio gelificante ou previamente adicionados à formulação. As características dos hidrogéis estão directamente relacionadas com uma série de variáveis, nomeadamente o tipo e concentração de alginato, a composição química e sequência de resíduos G, a fonte de íons cálcio utilizada e respectiva concentração assim como o tempo de exposição aos íons, pH, temperatura e presença de outros constituintes (Smidsrod, O., 1975).

Na literatura encontram-se descritos essencialmente dois métodos distintos para a preparação de hidrogéis de alginato: por difusão e por gelificação interna (Draget, K.I. *et al.*, 2006; Donati, I. e Paoletti, S., 2009). A metodologia de difusão é caracterizada como sendo um processo de gelificação muito rápido, em que os íons de cálcio são adicionados à solução biopolimérica sob a forma de um sal solúvel, como o cloreto de cálcio, havendo uma gelificação instantânea do polímero na interface de contacto com os íons cálcio ionizados. O processo de gelificação prossegue com a difusão dos íons cálcio através da membrana gelificada formada. Esta metodologia é fundamentalmente

utilizada na preparação de microsferas de alginato para imobilização de material biológico e células, originando geralmente géis heterogêneos que apresentam maior concentração de polímero na superfície em relação ao meio interno.

Para se conseguir uma distribuição homogênea do alginato no hidrogel, torna-se necessária a introdução ou libertação controlada dos iões de reticulação. Isto pode ser alcançado através de um método de gelificação interna, tal como descrito por Draget e colaboradores (1989). Esta metodologia tem por base a utilização de uma fonte de cálcio inactiva, por exemplo sob a forma de carbonato de cálcio insolúvel, sulfato de cálcio levemente solúvel ou cálcio complexado com agentes quelantes como o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ou citrato. A activação dos iões cálcio é, geralmente, controlada através da diminuição do pH originada pela adição de moléculas de hidrólise lenta, tais como a glucono- δ -lactona (GDL), tal como se encontra esquematizado na Figura 10. O acesso lento e controlado aos iões cálcio, permite uma gelificação uniforme, com formação de hidrogéis homogêneos.

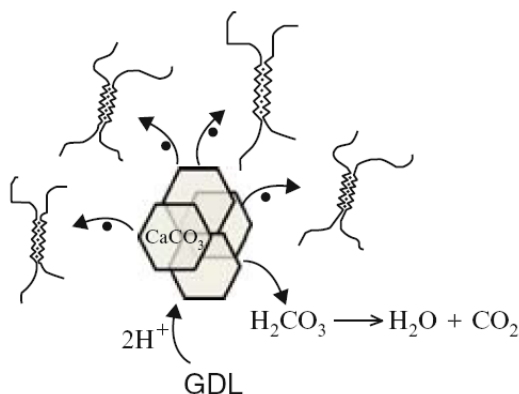


Figura 10. Processo de gelificação interna do alginato (Retirado de Donati e Paoletti (2009)).

iii. Imobilização de bacteriófagos em (bio)polímeros

Tal como referido anteriormente, a definição do melhor suporte e técnica de imobilização a utilizar na imobilização de bacteriófagos e de outras entidades bioactivas é complexa, pela existência de uma ampla variação não só nas características dos

materiais a imobilizar, mas também nas condições experimentais adoptadas ao longo do processo (Canilha, L. *et al.*, 2006).

No que diz respeito à imobilização de bacteriófagos (apesar da sua resistência a condições ambientais e experimentais ser muito variada, sendo essencial a sua avaliação individual), torna-se clara a necessidade de adoptar metodologias de imobilização de natureza inócua. De acordo com os trabalhos científicos publicados até à data, de uma forma geral têm sido utilizados três tipos de metodologias de imobilização para a estabilização de fagos, nomeadamente a sua encapsulação ou microencapsulação em materiais poliméricos como o alginato, assim como a sua adsorção a superfícies inertes e retenção dos mesmos no seio de uma matriz produzida *in situ* (Gervais, L. *et al.*, 2007; Ma, Y. *et al.*, 2008; Puapermpoonsiri, U. *et al.*, 2009; Cadernartiri, R. *et al.*, 2010).

Bennett *et al.* (1997) desenvolveram um bioadsorvente através da imobilização de fagos específicos para *Salmonella* por simples adsorção física a um suporte sólido de poliestireno, com vista à sua utilização na separação da bactéria em produtos alimentares. À semelhança deste trabalho científico, também Cadernartiri *et al.* (2010) imobilizaram bacteriófagos por adsorção física a suportes sólidos, utilizando para o efeito partículas de sílica. Outros autores têm igualmente explorado este conceito base, melhorando a ligação do bacteriófago ao suporte através da biotinizacão dos mesmos e estabelecimento de ligações com suportes sólidos previamente tratados com estreptavidina (Sun, W. *et al.*, 2001; Gervais, L. *et al.*, 2007; Tolba, M. *et al.*, 2010).

Outra estratégia explorada por alguns investigadores diz respeito à encapsulação/microencapsulação dos bacteriófagos em polímeros, como o alginato, formadas por mecanismo ionotrópico, permitindo uma maior protecção dos fagos em relação às condições ambientais (Ma, Y. *et al.*, 2008; Puapermpoonsiri, U. *et al.*, 2009).

De referir ainda a possibilidade de imobilizar bacteriófagos pela simples retenção no seio de uma matriz polimérica, com características de hidrogel. Esta abordagem não tem sido tão extensamente explorada mas permite, no entanto, utilizar condições de polimerização suaves, favoráveis à manutenção da viabilidade lítica dos fagos imobilizados. Existem inclusive alguns produtos de utilização biomédica actualmente em desenvolvimento que incluem bacteriófagos imobilizados, como por exemplo o

PhagoBioDerm[®] (Tbilisi, Georgia), que consiste numa matriz polimérica biodegradável à base de poliéster de amida impregnada de bacteriófagos, para utilização tópica em pacientes com infecções cutâneas por *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Proteus mirabilis*, contendo igualmente um antibiótico (ciprofloxacina), um anestésico (benzocaína) e enzimas proteolíticas (tripsina) (Markoishvili, K. *et al.*, 2002).

Ainda no que se refere à imobilização de bacteriófagos em hidrogéis (bio)poliméricos para aplicação em sistemas de detecção de agentes patogénicos bacterianos, a extensão dos trabalhos de pesquisa publicados até à actualidade é muito limitada (Souza, G. R. *et al.*, 2006; Souza, G. R. *et al.*, 2008). No entanto, em teoria, a associação das vantagens apresentadas pelos bacteriófagos, com as características particulares de uma matriz nanoporosa gelificada, apresenta um elevado potencial de aplicação. Esta potencialidade constituiu o alvo de estudo deste trabalho de I&D, no sentido de verificar se a imobilização no seio de um hidrogel permite estabilizar as partículas fágicas em termos estruturais e funcionais, de modo a que estas mantenham a sua actividade lítica por longos períodos de tempo. Para além da protecção conferida aos bacteriófagos, o carácter semi-sólido e nanoporoso da própria matriz facilitaria a inoculação directa das matrizes com as amostras em estudo e o seu contacto controlado com os bacteriófagos imobilizados.

II. Materiais e Métodos

1. Materiais e reagentes

i. Bacteriófago DSM JG004

Neste projecto de investigação foi utilizado o bacteriófago DSM JG004, gentilmente cedido pelo grupo de investigação da Prof. Doutora Paula Teixeira, da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB-UCP). Este bacteriófago, aquirido à Colecção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ*), foi-nos facultado sob a forma de suspensão em solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,0) e conservada a 4 °C, tendo um título de 10^7 UFP/mL (Unidades Formadoras de Placas por mililitro da suspensão).

Este bacteriófago tem uma acção estritamente lítica sobre um espectro alargado de estirpes de *P. aeruginosa*, inclusive a estirpe bacteriana *P. aeruginosa* DSM 19880 utilizada como microrganismo hospedeiro neste projecto (para a replicação do bacteriófago e avaliação da manutenção da viabilidade lítica do fago após impregnação nos hidrogéis), dando origem à formação de placas de lise de dimensão média (DSMZ GmbH, 2004).

ii. Cultura bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880

A estirpe bacteriana de *P. aeruginosa* utilizada neste projecto, denominada por DSM 19880, adquirida à Colecção Alemã DSMZ, foi igualmente cedida pelo mesmo grupo de investigação mencionado anteriormente. Esta estirpe foi utilizada como microrganismo hospedeiro do fago DSM JG004, tanto para a sua propagação como com o objectivo de avaliar a viabilidade do bacteriófago imobilizado.

A cultura bacteriana foi recebida estriada sobre meio sólido de nutriente agar (NA), após incubação a 37 °C, em ambiente aeróbio, por 24 h. A bactéria foi igualmente conservada a -80 °C por inoculação com zaragatoa de um microtubo de 1,5 mL

contendo meio *Tryptic Soy Broth* (TSB – triptona, extracto proteico de soja, glucose, cloreto de sódio e fosfato dipotássico) e 30% de glicerol, e a amostra estriada sobre NA subsequentemente mantida a 4 °C para posterior obtenção do inóculo.

iii. Reagentes

Os meios de cultura *Nutrient Broth* (NB) e *Tryptic Soy Broth* (TSB) foram adquiridos à Biokar Diagnostics (Beauvais, França) e BD (Le Pont de Claix, França), respectivamente. O Nipagin[®] M (metil-parahidroxibenzoato) proveio da Vaz Pereira (Benavente, Portugal), a glucono- δ -lactona (GDL) foi adquirida à Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), o carbonato de cálcio dihidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) proveio da Panreac (Barcelona, Espanha), o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos à Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha), o agar de grau técnico para microbiologia foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha), o alginato de sódio e a goma de xantano provieram da VWR (Leuven, Bélgica), o dextrano, com peso molecular de 250000, foi adquirido à VWR (Lutterworth, Alemanha), e o ácido poligalacturónico (PGA), com peso molecular entre 25000 e 50000, foi adquirido à AlfaAesar (Karlsruhe, Alemanha).

iv. Equipamento analítico

Ao longo de todos os procedimentos experimentais foi utilizada uma balança analítica Acculab (modelo ALC-210.4, Acculab, Colorado, EUA), uma placa de aquecimento com sistema de agitação magnética Heidolph (modelo MR 3001, Heidolph, Schwabach, Alemanha) e um agitador vórtex CAT (modelo VM2, CAT, Bagneux, França). As matrizes de hidrogel foram liofilizadas num liofilizador Telstar (modelo CRYODOS-80 de 50 Hz, Telstar, Terrassa, Espanha) e posteriormente observadas com o auxílio de uma lupa binocular Leica (modelo Leica EZ4D, Leica, Wetzlar, Alemanha). Durante as etapas de propagação e purificação do bacteriófago DSM JG004 foi utilizada uma centrífuga Heraeus (modelo Labofuge 400R Function Line, Heraeus, Buckinghamshire, Inglaterra) e uma incubadora Raypa (modelo Incuterm Digit, Raypa, Terrassa,

Espanha). A caracterização morfológica e microestrutural das matrizes de hidrogel foi realizada num microscópio electrónico de varrimento de alta resolução da marca JEOL (modelo JSM 6301F, JEOL, Tóquio, Japão), acoplado a um dispositivo de revestimento a ouro por pulverização catódica de iões (modelo JSC1100, JEOL, Tóquio, Japão), a um sistema de microanálise por raios X (modelo INCA 350 Energy X-Ray) através de espectroscopia de dispersão de energia de raio-X (Energy Dispersive Spectrometry, SEM/EDS) proveniente da Oxford Instruments GmbH (Wiesbaden, Alemanha), e a um sistema de observação de amostras a baixas temperaturas da Gatan Inc. (modelo Alto 2500, Gatan Inc, Pleasanton CA, USA) (ver Figura 11), no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).



Figura 11. Microscópio electrónico de varrimento utilizado neste projecto de I&D (JEOL, modelo JSM 6301F, Tóquio, Japão) [Fonte: autor].

2. Procedimentos experimentais

i. Optimização das condições de gelificação / polimerização dos (bio)polímeros

No desenvolvimento de hidrogéis para estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas, foram avaliados cinco (bio)polímeros distintos, nomeadamente o agar,

o alginato de sódio, o dextrano, a goma de xantano e o PGA. No entanto, ensaios preliminares realizados produziram resultados promissores apenas para os dois primeiros polímeros, sendo estes explorados em pormenor em todas as etapas subsequentes do trabalho experimental.

Os procedimentos testados derivaram, de uma forma geral, da adaptação de protocolos experimentais previamente descritos na literatura científica da especialidade. Como molde para as várias matrizes de hidrogel, foram utilizadas placas de cultura de 12 poços, sendo que em todos os ensaios foram transferidos aproximadamente 2,00 g de solução polimérica para cada poço.

a. Matrizes à base de agar

Para a optimização das matrizes de agar, foi utilizado agar de grau técnico, específico para ensaios microbiológicos, tendo sido testadas concentrações de 0,50%, 1,00%, 1,50%, 2,00% e 3,00% (m/m). As soluções de agar foram preparadas por aquecimento de água desionizada em placa de aquecimento, até uma temperatura de aproximadamente 85 °C. O agar, pesado em balança analítica, foi disperso na água desionizada aquecida com o auxílio de um agitador magnético, sendo as dispersões posteriormente levadas à ebulição durante alguns segundos, para dissolução completa do agar.

Cada solução foi transferida para os poços de placas de cultura, tendo-se aguardado aproximadamente 30 minutos antes de se proceder à inversão das placas, de modo a permitir o abaixamento da temperatura e a gelificação das soluções. As matrizes foram conservadas a 4 °C até à sua utilização.

b. Matrizes à base de alginato de sódio

Para o desenvolvimento de hidrogéis de alginato de cálcio, foram testadas duas abordagens convencionais distintas, nomeadamente o método de difusão e o de gelificação interna (Draget, K.I. *et al.*, 2006; Donati, I. e Paoletti, S., 2009).

No método de difusão, a gelificação específica do alginato de sódio foi testada com cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Para tal, foram preparadas soluções de alginato de sódio de concentrações crescentes (0,50% -3,00% (m/m)) por dissolução do polímero em água desionizada, previamente aquecida a aproximadamente 85 °C. Depois de se obterem soluções homogêneas, procedeu-se à sua transferência para os poços de placas de cultura e sobre elas foram vertidas quantidades precisas das soluções de cálcio, de acordo com os dados presentes na Tabela 1. A polimerização decorreu à temperatura ambiente, durante um período de 24 h, sendo as matrizes posteriormente conservadas a 4 °C até à sua utilização.

Tabela 1. Condições experimentais testadas no método de difusão, com variação da concentração de polímero, solução de cálcio e respectiva concentração/volume.

[Alginato de sódio] (%, m/m)	Solução de cálcio		Volume de solução de cálcio (mL)	Código
0,50	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,116 M	1	SULF0.5a
			2	SULF0.5b
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000 M	2	CLOR0.5a
1,00	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,116 M	1	SULF1a
			2	SULF1b
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000 M	2	CLOR1a
2,00	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,116 M	1	SULF2a
			2	SULF2b
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000 M	2	CLOR2a
		0,147 M		CLOR2b
		0,074 M		CLOR2c
0,049 M	CLOR2d			
3,00	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,116 M	1	SULF3a
			2	SULF3b
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000 M	2	CLOR3a

No método de gelificação interna foi utilizada uma fonte de cálcio distinta, nomeadamente o carbonato de cálcio (CaCO_3), reagente praticamente insolúvel em meio aquoso. As condições de polimerização testadas neste método encontram-se

detalhadas na Tabela 2. Apesar das variações da formulação, todas seguiram o mesmo protocolo experimental na sua preparação. Assim, o processo iniciou-se pela preparação, em almofarizes de porcelana, de dispersões de carbonato de cálcio e alginato de sódio, em aproximadamente 80% da massa total de água desionizada. Ocasionalmente, procedeu-se à sua agitação e aguardou-se por um período mínimo de uma hora, de modo a permitir a total hidratação do alginato de sódio. Para dar início à polimerização do alginato, através da libertação dos iões cálcio dispersos nas formulações, foram utilizadas soluções frescas de GDL, preparadas por dissolução em água desionizada. Estas soluções de hidrólise foram rapidamente homogeneizadas com as dispersões poliméricas anteriormente preparadas, e as misturas transferidas de imediato para os moldes. O processo de polimerização do alginato por gelificação interna foi realizado à temperatura ambiente, ao longo de 72 h, período de tempo após o qual se mantiveram as matrizes conservadas a 4 °C.

Tabela 2. Condições experimentais testadas no método de gelificação interna, com variação das concentrações de polímero, solução de cálcio e GDL.

[Alginato de sódio] (%, m/m)	[CaCO ₃] (mM)	[GDL] (mM)	Código
1,00	15,0	32,0	ALG1
1,50	15,0	32,0	ALG2
1,50	22,5	48,0	ALG3
1,00	30,0	56,1	ALG4

ii. Controlo de contaminações microbianas

a. Liofilização e rehidratação das matrizes optimizadas

As matrizes de agar e alginato de cálcio, obtidas de acordo com as formulações optimizadas anteriormente, foram submetidas a um ciclo de liofilização, sendo sujeitas a uma pressão e temperatura máximas de 0,015 mBar e -78 °C, respectivamente.

Após liofilização, cada amostra de hidrogel foi reidratada por imersão num volume de 3 mL de água desionizada. A rehidratação decorreu em placas de cultura de 12 poços,

mantendo-se as mesmas em repouso e à temperatura ambiente durante um período de 172 h.

Registaram-se as dimensões, massa e aparência macroscópica das matrizes, antes e após o processo de liofilização, bem como após a rehidratação, para posterior avaliação da viabilidade técnica deste procedimento na melhoria do tempo de vida dos hidrogéis.

b. Adição de agente antifúngico

Foi adicionado um agente conservante às duas formulações optimizadas, mais especificamente o Nipagin[®] M, numa concentração de 0,10% (m/m). Este parabeno apresenta uma acção principalmente anti-fúngica e resiste a temperaturas de autoclavagem sem que ocorra a sua degradação.

O agente conservante foi adicionado por dissolução a quente (aproximadamente 80 °C) no solvente (água) de ambas as formulações. Esta acção constituiu a primeira etapa do protocolo experimental, procedendo-se posteriormente de acordo com o descrito nos pontos **2.i.a.** e **2.i.b.** desta secção de “Procedimentos experimentais”.

c. Autoclavagem das soluções (bio)poliméricas

As soluções poliméricas de agar e alginato de sódio (sem adição da solução de GDL) foram colocadas em frascos Schott de 50 mL e esterilizadas (autoclavadas) por calor húmido sob pressão, durante 15 minutos a 121 °C.

Após autoclavagem, a solução de agar foi transferida para uma estufa a 50 °C, onde permaneceu até à sua utilização, por forma a impedir a gelificação da solução. Relativamente à solução de alginato de sódio, permitiu-se o seu arrefecimento à temperatura ambiente.

iii. Propagação e purificação do bacteriófago DSM JG004

Todas as etapas constantes desta subsecção foram realizadas em condições assépticas.

a. Preparação de uma suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880

Para a preparação da suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880, foi inoculada uma única unidade formadora de colónias num tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo *Nutrient Broth* (peptona, cloreto de sódio e extractos de levedura e carne), sendo este posteriormente incubado a 37 °C durante 18 h. Na Figura 12 encontra-se esquematizada esta etapa experimental.

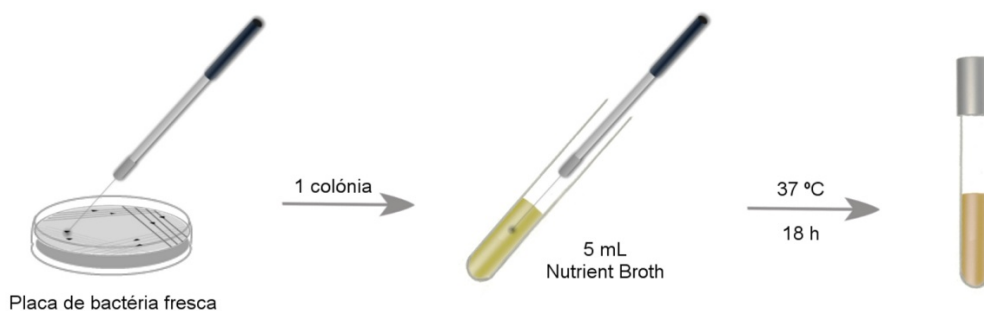


Figura 12. Representação esquemática da etapa de preparação da suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880 [Fonte: autor].

b. Propagação do bacteriófago por inoculação da cultura bacteriana

Para a propagação do fago foram preparadas diluições em série (10^{-1} - 10^{-8}) em PBS (pH 7,0), por transferência de 100 μ L da suspensão fágica para microtubos de 1,5 mL contendo 900 μ L de PBS. Foi igualmente preparada uma diluição a 1:10 em caldo NB da cultura de *P. aeruginosa* anteriormente incubada.

Para tubos de ensaio esterilizados, foram transferidos 100 μ L de cada diluição de bacteriófago e 300 μ L da suspensão bacteriana diluída, realizando ensaios em duplicado para cada diluição fágica. Para finalizar, foram transferidos 4 mL de *Nutrient Soft Agar* (NB com 0,7% (m/m) de agar), previamente fundido e estabilizado a 48 °C em banho-maria, para cada um dos tubos preparados anteriormente. Após cada adição de meio de cultura, procedeu-se rapidamente à homogeneização do tubo (em vórtex) e espalhou-se o seu conteúdo sobre uma placa de NA (NB com 1,5% (m/m) de agar). Permitiu-se a

solidificação da camada de *soft agar* durante 10-15 minutos, e incubaram-se as placas à temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. As várias etapas deste procedimento experimental encontram-se esquematizadas na Figura 13.

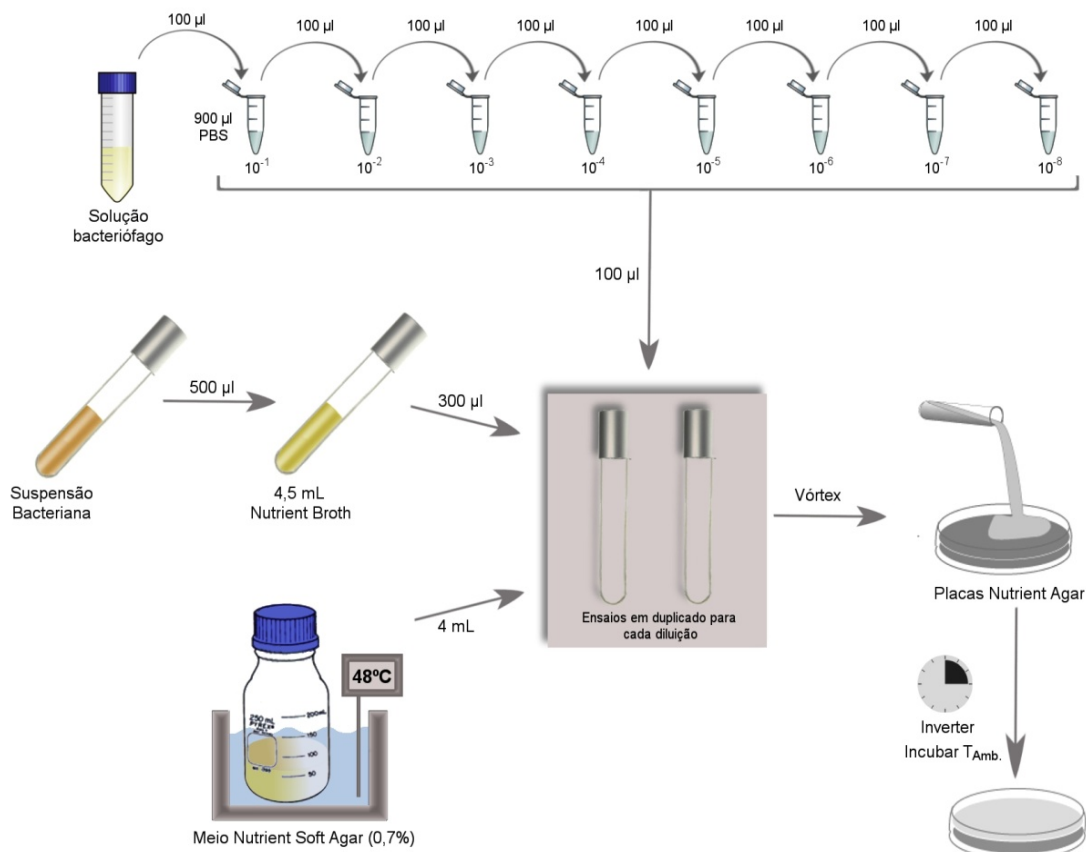


Figura 13. Representação esquemática do processo de propagação fágica [Fonte: autor].

c. Purificação e quantificação do bacteriófago

Após o período de incubação, seleccionaram-se as 4 placas de cultura correspondentes às maiores concentrações fágicas (diluições 10^{-1} e 10^{-2}) e adicionou-se 5 mL de PBS. Estas placas foram isoladas com parafilme, de forma a prevenir eventuais evaporações, e incubadas à temperatura ambiente durante 3 h.

Fragmentaram-se as camadas de *soft agar* das placas seleccionadas com o auxílio de uma ansa estéril, tendo-se reunido as mesmas, juntamente com o PBS adicionado, em tubo de centrífuga estéril. Esta mistura foi centrifugada a 5500 rpm a uma temperatura de 4 °C, para promover a deposição do agar. O sobrenadante foi cuidadosamente

transferido para uma seringa estéril de 20 mL e filtrado através de um filtro de 0,22 μm de tamanho de poro para um tubo Falcon estéril. Esta suspensão fágica constituiu a solução *stock* de fago, tendo sido armazenada a 4 °C. Este processo encontra-se esquematizado na Figura 14.

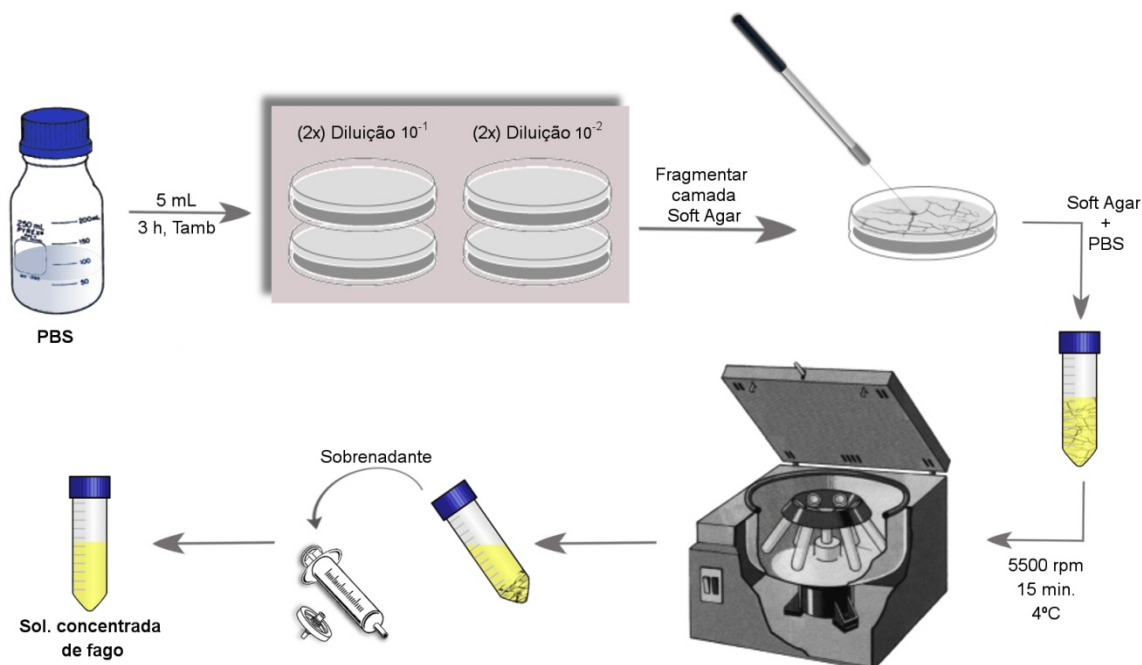


Figura 14. Representação esquemática do processo de preparação da solução *stock* de bacteriófago [Fonte: autor].

Para a determinação do título de fago na solução *stock*, procedeu-se como descrito anteriormente para a propagação do mesmo. Assim, procedeu-se ao plaqueamento sobre meio NA de uma camada de *soft agar* constituída por 100 μL de cada diluição fágica, 300 μL da diluição bacteriana e 4 mL de *Nutrient Soft Agar*. Após incubação das placas de Petri à temperatura ambiente, durante um período de 24 a 48 horas, procedeu-se à contagem das placas de lise fágica formadas no tapete bacteriano de *P. aeruginosa* e cálculo do correspondente título fágico, traduzido pelo número de UFP/mL, através da aplicação da equação (1):

$$\text{UFP}/\text{mL} = (\text{n}^\circ \text{ de placas de lise}) \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{\text{volume de inóculo}} \quad (1)$$

iv. Incorporação do bacteriófago nas formulações (bio)poliméricas seleccionadas

A estabilização estrutural e funcional do fago nas matrizes biopoliméricas consistiu na inclusão do mesmo nas formulações optimizadas, antes da sua gelificação/polimerização. Para tal, alíquotas da solução *stock* do fago foram adicionadas a ambas as formulações poliméricas, numa concentração de 1,00% (m/m), correspondente a aproximadamente $1,38 \times 10^8$ UFP/mL. Independentemente da formulação em questão, o bacteriófago foi adicionado após a etapa de autoclavagem das soluções poliméricas, de modo a não inactivar as partículas fágicas.

No caso da formulação de agar, o bacteriófago foi adicionado à solução esterilizada de agar e conservante, termostaticada a 48 °C, imediatamente antes da sua transferência para os moldes, tendo-se tido o cuidado de proceder previamente a uma homogeneização suave da solução em vórtex. No caso da formulação de alginato de sódio, o bacteriófago foi igualmente adicionado à suspensão esterilizada de alginato de sódio, carbonato de cálcio e conservante, conjuntamente com a solução de GDL recém-preparada, procedendo-se à homogeneização suave da mistura em vórtex, antes da transferência para os moldes.

A composição final das formulações de alginato de cálcio e de agar, em termos qualitativos e quantitativos, está incluída nas Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa das matrizes de alginato de cálcio optimizadas.

Componente	% (m/m)	m (g)
Bacteriófago	1,00	≈ 0,02 (20 µL)
Nipagin® M	0,10	0,0020
Alginato de sódio	1,50	0,0300
CaCO ₃	0,23	0,0046
GDL	0,86	0,0172
Água desionizada	96,31	1,9262
Total	100,00 %	2,0000 g

Tabela 4. Composição qualitativa e quantitativa das matrizes de agar otimizadas.

Componente	% (m/m)	m (g)
Bacteriófago	1,00	≈ 0,02 (20 µL)
Nipagin® M	0,10	0,0020
Agar	1,50	0,0300
Água desionizada	97,40	1,9480
Total	100,00 %	2,0000 g

v. Avaliação da viabilidade lítica dos bacteriófagos imobilizados

A influência dos diversos componentes das formulações biopoliméricas sobre a formação do tapete bacteriano, coesão estrutural das matrizes polimerizadas, e viabilidade lítica do bacteriófago, foi avaliada para as duas formulações otimizadas. As várias condições testadas encontram-se resumidas na Tabela 5. Independentemente das condições em análise, os ensaios microbiológicos consistiram na inoculação das matrizes de composição variável com uma suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* (preparada de acordo com o descrito no ponto **2.iii.a.** do capítulo de “Materiais e Métodos”), e posterior incubação das mesmas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à análise e registo macroscópico das mesmas.

Tabela 5. Condições experimentais testadas na avaliação da estrutura das matrizes, crescimento bacteriano e viabilidade do fago estabilizado.

Código da matriz	Variáveis em estudo		
	Conservante	Bacteriófago	Bactéria
000	-	-	-
001	-	-	+
010	-	+	-
011	-	+	+
100	+	-	-
101	+	-	+
110	+	+	-
111	+	+	+

[**Legenda:** (+) presença; (-) ausência.]

Por uma questão de facilidade, as matrizes de agar e de alginato de cálcio serão referenciadas, respectivamente, por AGR e ALG, sucedidas do conjunto de três algarismos correspondentes à presença ou ausência de (sequencialmente) agente conservante, fago e inóculo bacteriano. Para cada condição experimental foram ainda produzidos dois tipos de amostras, variando apenas entre si o solvente aquoso utilizado: água desionizada (A) ou caldo nutritivo TSB (B). Desta forma, a referência das amostras virá acrescida das letras A ou B, de acordo com o solvente aquoso utilizado na sua preparação. A título de exemplo, e para uma compreensão mais clara da nomenclatura utilizada, a amostra com referência AGR010B corresponderá a uma matriz de agar preparada com caldo TSB e fago incorporado, não fazendo parte da sua constituição o agente conservante nem o inóculo bacteriano.

As amostras com referência “000” correspondem aos controlos de ambas as matrizes poliméricas, com os quais serão comparados todos os resultados obtidos nesta secção experimental.

vi. Avaliação da capacidade de formação de tapete bacteriano

A avaliação da capacidade de formação de tapete bacteriano de *P. aeruginosa* sobre as matrizes-base após incubação, foi realizada por comparação dos resultados obtidos para as matrizes “001A” e “001B”, para ambos os polímeros, com os respectivos resultados controlo.

Uma vez que não foi observado crescimento bacteriano nas amostras preparadas com água desionizada, as análises subsequentes apenas se referirão às amostras suplementadas com caldo nutritivo TSB.

vii. Avaliação da coesão estrutural das matrizes biopoliméricas

A influência dos diversos componentes das formulações finais sobre a coesão estrutural das matrizes polimerizadas foi avaliada. Mais precisamente, a influência da alteração do solvente aquoso para caldo TSB (matrizes “000A” e “000B”), introdução do agente

conservante (matrizes “100A” e “100B”) e introdução da suspensão tamponada de fago (em PBS) (matrizes “010A” e “010B”).

viii. Avaliação da influência da adição do agente conservante sobre o crescimento bacteriano

A influência do agente conservante sobre o crescimento do hospedeiro específico do fago na superfície das matrizes poliméricas foi determinada por comparação dos resultados obtidos para as matrizes “101B” de ambos os polímeros, com os resultados observados para as respectivas matrizes sem incorporação de conservante.

ix. Avaliação da viabilidade lítica do bacteriófago

A viabilidade lítica do bacteriófago imobilizado nas matrizes gelificadas/polimerizadas foi inicialmente avaliada por observação do tapete bacteriano existente nas matrizes “011B” com o formado nas amostras controlo “010B” e “000B”.

A viabilidade do fago foi igualmente avaliada nas amostras “111B”, de modo a averiguar se a introdução do agente antimicrobiano tem algum tipo de interferência sobre a actividade fágica.

x. Microanálise estrutural das matrizes polimerizadas através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento

As matrizes polimerizadas suplementadas com caldo nutritivo TSB foram igualmente analisadas por CRIO-SEM no CEMUP, com o objectivo de avaliar a microestrutura porosa das matrizes.

Cada matriz foi individualmente seccionada com o auxílio de um bisturi, até uma dimensão final aproximada de 1 mm de espessura por 5 mm de comprimento (ver Figura 15a), e aplicada em suporte múltiplo (ver Figura 15b). Estas amostras foram congeladas sob vácuo em lama de azoto a aproximadamente -210 °C (ver Figura 15c) e

transferidas, igualmente sob vácuo, para a antecâmara criogénica do microscópio electrónico de varrimento, estabilizada a uma temperatura de aproximadamente $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde se procedeu à sua fractura (ver Figura 15 d,e). Após fractura, procedeu-se à sublimação da água presente nas amostras por elevação da temperatura até cerca de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante um período de 3 minutos (ver Figura 15f). A temperatura da antecâmara voltou a ser reduzida até -150°C , sendo o suporte contendo a(s) amostra(s) transferido para a coluna do microscópio electrónico, onde as amostras fracturadas foram revestidas com uma liga de ouro/paládio durante 45 segundos, com uma intensidade de corrente de 12 mA. As amostras revestidas foram observadas a diversas ampliações, sendo as imagens adquiridas através do sistema INCA ENERGY 350.

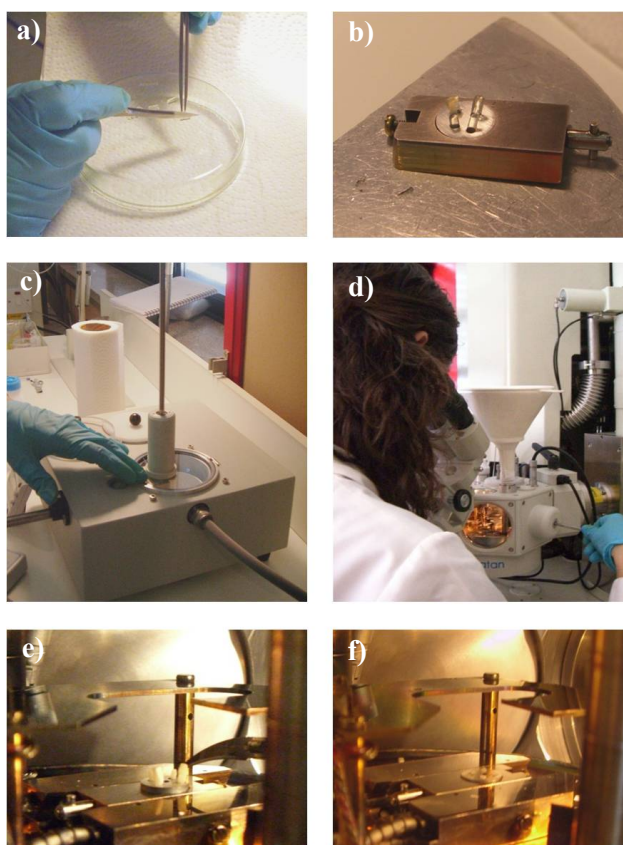


Figura 15. Etapas de processamento das amostras para análise por CRIO-SEM [Fonte: autor].

[**Legenda:** (a) Corte das amostras; (b) Aplicação das amostras em suporte múltiplo; (c) Congelamento das amostras sob vácuo em lama de azoto a aproximadamente $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$; (d/e) Transferência sob vácuo para a antecâmara do microscópio electrónico de varrimento, e fractura das amostras; (f) Sublimação da humidade presente nas amostras, a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$.]

III. Resultados e Discussão

1. Optimização das condições de gelificação / polimerização

A primeira etapa deste projecto de investigação e desenvolvimento consistiu na optimização das condições de gelificação/polimerização de vários biopolímeros, com o objectivo de posteriormente incorporar bacteriófagos nas formulações, promovendo a estabilização estrutural e funcional destes no interior dos hidrogéis.

Através da consulta de literatura científica sobre o desenvolvimento de hidrogéis à base de biopolímeros, rapidamente se constata que a maioria dos protocolos experimentais descritos faz uso de agentes de reticulação químicos, solventes orgânicos e, até mesmo, radiações ionizantes. (Hennink, W. E. e van Nostrum, C. F., 2002; Hoffman, A. S., 2002; Van Tomme, S. R. *et al.*, 2008). No entanto, esse tipo de condições experimentais foi evitado neste trabalho de investigação, uma vez que poderia condicionar a viabilidade e a actividade dos fagos imobilizados, assim como a sobrevivência do seu hospedeiro específico, impedindo a avaliação da presença de fagos viáveis.

Assim, uma das prioridades na selecção dos protocolos experimentais a adoptar no desenvolvimento das matrizes passou pelo recurso apenas a metodologias físicas, com condições moderadas e reagentes virtualmente inócuos.

i. Matrizes à base de agar

A metodologia adoptada para a preparação de matrizes de agar reflecte a técnica correntemente utilizada para a preparação de meios sólidos de cultura microbológica. Este biopolímero forma facilmente hidrogéis, por simples mecanismo termotrópico, ou seja, por dissolução em água desionizada levada à ebulição, seguido de arrefecimento à temperatura ambiente.

Foram testadas concentrações de agar entre 0,50% - 3,00% (m/m), sendo que a obtenção de estruturas tridimensionais gelificadas capazes de manterem a sua arquitectura, após remoção do molde, foi uma constante em todas as concentrações utilizadas, mesmo para

a concentração de 0,50% (m/m) de agar. Tal como pode ser observado pela análise da Figura 16, todas as amostras reflectem a arquitectura do molde utilizado, apresentando após gelificação a forma de discos com aproximadamente 20 mm de diâmetro e 5 mm de espessura.

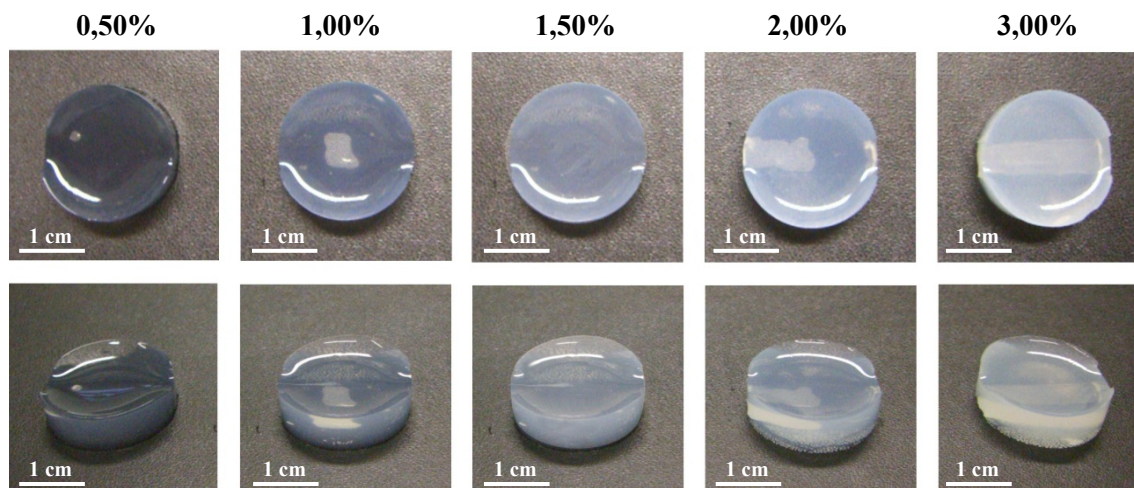


Figura 16. Aspecto macroscópico dos hidrogéis de agar obtidos a partir de diferentes concentrações de biopolímero.

Relativamente a características como a resistência à fractura, e a transparência, observou-se que estas variáveis são dependentes da concentração de polímero utilizado. Se, por um lado, o aumento da concentração de polímero é acompanhado de uma perda de transparência da matriz, por outro lado está associado a um aumento de resistência mecânica à fractura.

Assim, apesar da matriz produzida com 0,50% (m/m) de agar apresentar uma elevada transparência, facilmente fractura ao ser removida do molde, sendo a sua resistência estrutural insuficiente para uma adequada inoculação com bactéria. Por outro lado, a matriz produzida com 3,00% (m/m) de agar apresenta uma viscosidade superior a quente, o que dificulta a dissipação de pequenas bolhas de ar incluídas aquando da transferência da solução para os moldes. Tendo em consideração estes aspectos, terá de haver uma solução de compromisso entre transparência e resistência mecânica na escolha da formulação mais adequada.

Outro aspecto que foi considerado para essa selecção foi a ocorrência de sinerese. Apesar deste fenómeno ser comum neste tipo de matrizes, não se observou o

extravasamento de quantidades significativas de solvente a partir da rede polimérica, pelo que este factor não teve um impacto considerável na escolha da matriz que seria objecto de estudo posterior.

Após análise das características acima referidas, a escolha recaiu sobre a formulação contendo 1,50% (m/m) de agar. A concentração de agar utilizada nesta formulação reflecte a concentração de polímero vulgarmente empregue na preparação da maioria dos meios de cultura sólidos utilizados em microbiologia. Esta formulação originou hidrogéis com estrutura tridimensional estável e com uma resistência mecânica adequada, facilitando o posterior espalhamento de inóculo bacteriano na sua superfície. As análises subsequentes serão assim realizadas com estes hidrogéis.

ii. Matrizes à base de alginato de cálcio

A formação de hidrogéis a partir de soluções de alginato de sódio pode ser alcançada por tratamento das mesmas com soluções ácidas, assim como por mecanismos de troca iónica com iões bivalentes de cálcio. Neste caso particular, como se pretendia utilizar as matrizes para a imobilização de bacteriófagos e posterior inoculação bacteriana na sua superfície para avaliação da viabilidade lítica dos mesmos, um requisito final importante será a existência de um ambiente próximo da neutralidade. Desta forma, o recurso a soluções ácidas para a gelificação do alginato não será desejável, constituindo o processo de gelificação por troca iónica o mecanismo mais adequado ao propósito final das matrizes.

Relativamente aos mecanismos de troca iónica, tal como referido anteriormente, facilmente se obtêm hidrogéis de alginato utilizando um ião de reticulação adequado que, sendo quelatado pelas sequências G na cadeia de alginato, induz a formação de uma rede tridimensional (Draget, K.I. *et al.*, 2006; Donati, I. e Paoletti, S., 2009). Como tal, a presença de um estado semi-sólido é garantida pelas interações físicas entre o ião e algumas das metades urónicas que compõem a cadeia de polissacarídeo. O principal ião utilizado para a reticulação destas matrizes é o cálcio, sendo fundamentalmente duas as metodologias aplicadas: difusão e gelificação interna, tendo-se avaliado a potencialidade de ambas.

Recorrendo-se à técnica de difusão, foram testadas concentrações de alginato de sódio entre 0,50% - 3,00% (m/m), diferentes soluções (com variação do volume e concentração das mesmas) de reticulação (cloreto de cálcio e sulfato de cálcio). Tal como se pode observar na Figura 17, de uma forma geral todas as soluções de alginato sofreram uma transição sol-gel com a adição de uma fonte de cálcio activa, dando origem a hidrogéis de aspecto mais ou menos translúcido, coloração esbranquiçada e morfologia irregular, raramente reflectindo a arquitectura dos moldes utilizados.

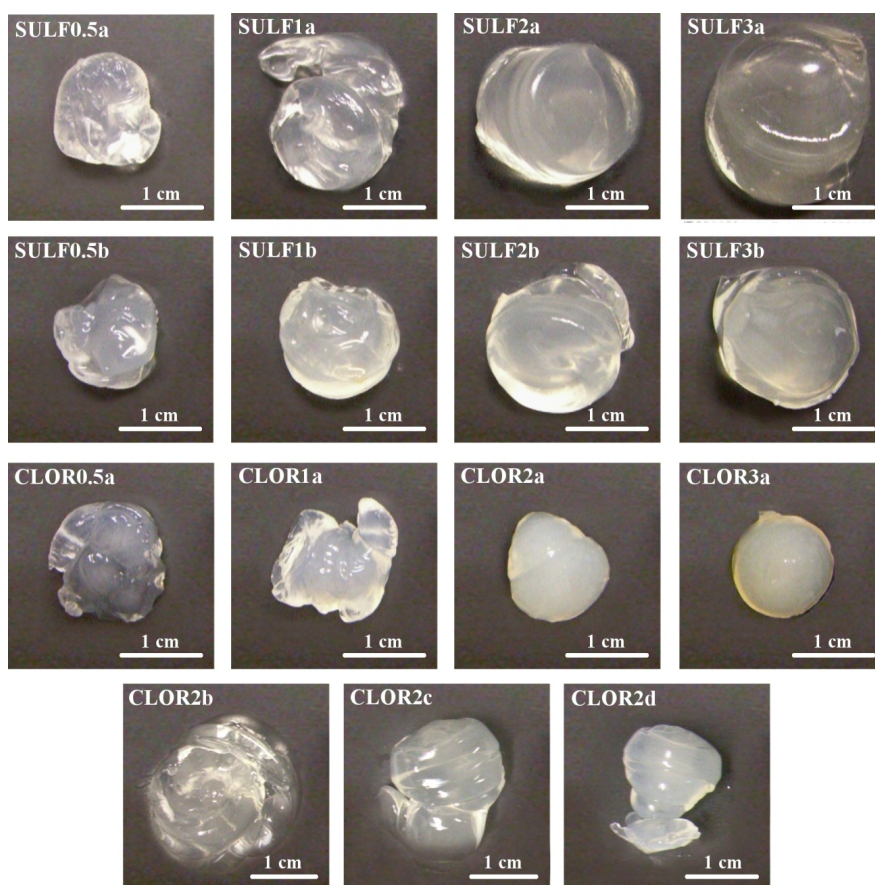


Figura 17. Aspecto macroscópico das matrizes de alginato de cálcio obtidas através do método de difusão, com variação da concentração tanto de polímero como da solução de cálcio.

Em todas as condições experimentais acima testadas, verificou-se uma gelificação superficial instantânea da solução polimérica aquando da adição da solução de cálcio, observando-se simultaneamente o desenvolvimento de alterações conformacionais nos hidrogéis. No caso das matrizes reticuladas com soluções de sulfato de cálcio (apresentadas no quadrante superior direito da imagem (ver Figura 17)), não se

verificou a ocorrência de uma deformação estrutural tão acentuada, o que por um lado se pode ter devido à maior viscosidade da solução polimérica, relacionada com a concentração de alginato presente (2,00% - 3,00%), e, por outro, à utilização de uma fonte de cálcio ligeiramente insolúvel em água. Pelo contrário, a reticulação com soluções de cloreto de cálcio originou hidrogéis altamente irregulares e heterogéneos, o que pode ser correlacionado com a disponibilidade imediata dos iões cálcio em solução, independentemente da concentração de polímero utilizada.

De uma forma geral, e apesar do aspecto macroscópico irregular, estes hidrogéis apresentaram boas propriedades mecânicas e deformabilidade reversível, permitindo a sua compressão táctil e restabelecimento da morfologia com a cessação da aplicação de forças de pressão, sem que houvesse comprometimento da estrutura nem expulsão do solvente retido no interior das matrizes. No entanto, uma excepção foram as matrizes CLOR2a e CLOR3a, que apresentaram uma estrutura mais compacta e menos elástica, com maior dificuldade para recuperar o aspecto pré-compressão.

Com estes ensaios preliminares não se obtiveram hidrogéis com as características desejadas. No entanto, os resultados obtidos permitiram verificar a elevada potencialidade deste polímero para o desenvolvimento de matrizes de imobilização de moléculas bioactivas e de células (microbianas ou outras).

Os ensaios com alginato de sódio prosseguiram com a aplicação do método de gelificação interna. A título de referência, a escolha das condições de polimerização para a matriz ALG1 teve por base o estudo realizado por Draget e colaboradores (1989), correspondendo as restantes matrizes produzidas a adaptações do mesmo estudo, em termos de concentrações dos vários constituintes da formulação. Assim, nestes novos ensaios foram testadas concentrações de polímero entre 1,00% - 1,50% (m/m) e, relativamente à fonte de cálcio, foi utilizada uma forma inactiva do ião, sob a forma de carbonato de cálcio, incorporado em variadas concentrações. A libertação controlada dos iões cálcio foi realizada pela GDL, adicionada em concentrações variáveis desde 32,0 mM a 56,1 mM.

À semelhança do observado no método de difusão, o princípio do processo de gelificação do alginato está relacionado com um processo de troca iónica, verificando-se

a formação de redes tridimensionais por interação com os íons cálcio adicionados. A grande diferença desta metodologia relativamente à discutida anteriormente diz respeito à homogeneidade dos hidrogéis obtidos. Como pode ser observado na Figura 18, todas as matrizes se apresentaram altamente translúcidas e homogêneas, do ponto de vista da observação macroscópica.

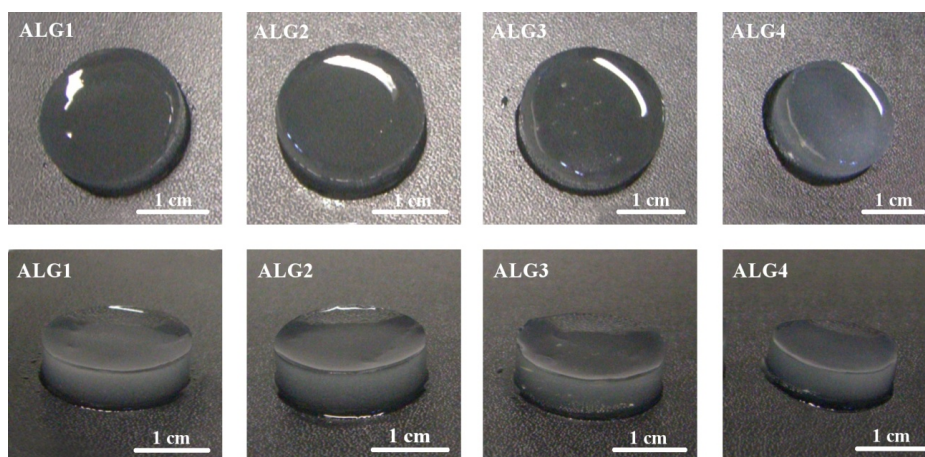


Figura 18. Aspecto macroscópico das matrizes de alginato de cálcio obtidas através do método de gelificação interna.

Ao contrário do verificado no método de difusão, a gelificação do alginato não foi imediata com a adição da fonte de cálcio, dado que este se encontrava numa forma inactiva e insolúvel, não se encontrando os íons disponíveis para a reacção com o polímero. Isto permitiu dispersar homogeneamente a fonte de cálcio no seio da formulação. A gelificação do alginato iniciou-se com a adição da solução de GDL, responsável pela hidrólise lenta do carbonato de cálcio em solução, observando-se assim um aumento da viscosidade da formulação aproximadamente 5 minutos após a sua adição. Este período de pré-gelificação facilitou a homogeneização total das formulações e a sua transferência para os moldes. Através deste processo mais lento de gelificação dos hidrogéis de alginato, obtiveram-se matrizes coesas e elásticas com a forma de discos de aproximadamente 20 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, reflectindo a arquitectura dos moldes utilizados.

Durante o período de tempo ao longo do qual decorreu a formação dos hidrogéis (cerca de 72 h), foi possível observar a presença de micro-bolhas dispersas por todas as matrizes, relacionadas com a libertação de dióxido de carbono durante o processo de

polimerização, tendo-se no entanto verificado a sua dissipação com o decorrer das reacções de polimerização.

O grau de sinerese (% de libertação de água) das várias matrizes foi também avaliado, por comparação da massa inicial e final das mesmas, através da aplicação da equação (2):

$$\text{Grau de sinerese (\%)} = \frac{m_{\text{inicial}} - m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Uma análise aos resultados apresentados na Tabela 6 permitiu concluir que, de uma forma geral, todas as matrizes produzidas sofreram processos de sinerese ao longo da polimerização, tendo esta sido mais notória no caso da formulação ALG4, com um grau de sinerese de aproximadamente 45%. A ocorrência de um maior grau de sinerese nas matrizes correspondentes poderá ser explicada pelo aumento da concentração de iões cálcio, assim como do agente de hidrólise, o que resultou em hidrogéis que, apesar de apresentarem maior resistência mecânica à compressão táctil e ao corte, sofreram alteração bastante significativa das suas dimensões, relativamente às dimensões apresentadas pelo molde.

Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação do grau de sinerese das matrizes de alginato reticuladas com CaCO₃ e GDL.

	ALG1	ALG2	ALG3	ALG4
m_{inicial} (g)	≈ 2 g			
m_{final} (g)	1,6042	1,6931	1,7015	1,0967
Grau sinerese (%)	19,79	15,34	14,92	45,16

Apesar de todas as formulações testadas terem produzido resultados bastante satisfatórios, a formulação seleccionada como base para os ensaios subsequentes foi a ALG3 pela homogeneidade macroscópica e transparência dos hidrogéis por ela originados, propriedades mecânicas adequadas aos ensaios microbiológicos e ocorrência de um menor grau de sinerese.

2. Controlo de contaminações microbianas

Pela elevada percentagem de água presente nas matrizes de agar e alginato de cálcio, estas estão sujeitas a contaminação microbiana durante o armazenamento, o que poderá induzir alterações nas características físico-químicas tanto das próprias soluções como das matrizes resultantes.

No caso particular do alginato de sódio, poderá mesmo verificar-se uma diminuição da viscosidade das soluções e das matrizes, decorrente da acção microbiana. Idealmente, estas soluções podem ser esterilizadas com óxido de etileno ou filtradas através de filtro com diâmetro de poro de 0,20 µm, sem que haja uma alteração significativa da sua viscosidade. Por outro lado, o aquecimento destas soluções a temperaturas superiores a 70 °C origina alguma despolimerização e conseqüente perda de viscosidade, pelo que a esterilização por calor húmido sob pressão deve ser evitada. Em alternativa, as formulações poderão ser preservadas por incorporação de agentes conservantes, nomeadamente clorocresol (0,1% (m/m)), cloroxilenol ou parabenos (Rowe, R.C. *et al.*, 2009).

Também o agar, que na forma desidratada não está sujeito a contaminações microbianas, quando em solução ou gelificado torna-se meio fértil para contaminação por bactérias e fungos. Apesar de, neste caso, os contaminantes não produzirem alteração das suas propriedades físicas e químicas, devem ser tomadas as devidas precauções para controlar o crescimento accidental de microrganismos contaminantes, principalmente se as matrizes tiverem como objectivo a utilização em sistemas de detecção bacteriana. Estas soluções são facilmente esterilizadas por calor húmido sob pressão, sendo esta metodologia rotineiramente utilizada em laboratórios de microbiologia.

i. Liofilização e rehidratação das matrizes optimizadas

A hipótese inicialmente abordada para a conservação das matrizes de agar e alginato de cálcio optimizadas ao longo deste projecto passou pela liofilização das mesmas, no sentido de sublimar o conteúdo hídrico mantendo a estrutura tridimensional das matrizes, e minimizar assim a ocorrência de contaminações microbianas. Teoricamente,

este processo levaria à obtenção de matrizes com uma estrutura porosa, contendo uma percentagem residual de água, o que permitiria, por um lado, mantê-las livres de microrganismos contaminantes por um período de tempo mais alargado e, por outro, restaurar as suas características originais por simples rehidratação com água ou outros solventes aquosos ou através da aplicação de amostras biológicas fluidas onde se pretendesse proceder à detecção da presença da bactéria-alvo, apenas quando fosse necessária a sua utilização. Idealmente, essa rehidratação poderia (e deveria) mesmo ser efectuada pela simples aplicação da amostra fluída, biológica ou não, a analisar.

Assim, procedeu-se à liofilização de matrizes de ambos os tipos de biopolímero, tendo o seu aspecto macroscópico e massa sido avaliados antes e após a liofilização, assim como após um período de tempo de 120 h de imersão em água desionizada.

O aspecto macroscópico das matrizes ao longo das três fases mencionadas encontra-se representado na Figura 19. Comparando os hidrogéis iniciais (a) com os rehidratados (c) é possível inferir que a rehidratação não foi total, apresentando as matrizes rehidratadas um aspecto heterogéneo e dimensões inferiores às iniciais, não reflectindo as características macroscópicas observadas inicialmente. Aparentemente, a camada mais externa das matrizes poliméricas foi rehidratada com sucesso, não tendo ocorrido o mesmo no interior das mesmas, onde o solvente aquoso parece não ter conseguido alcançar os biopolímeros e restaurado a sua estrutura inicial.

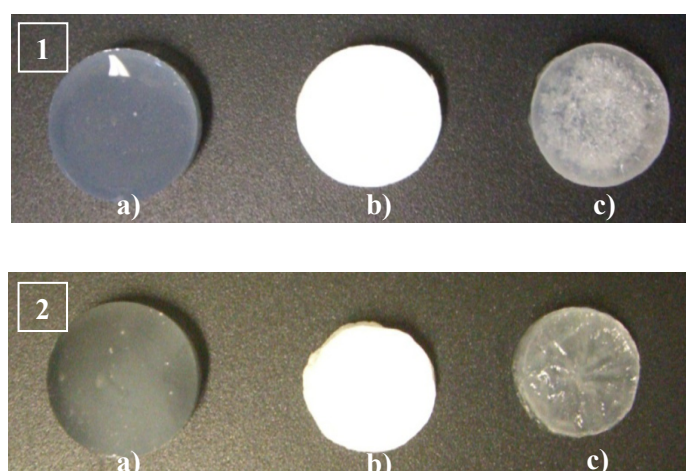


Figura 19. Aspecto macroscópico das matrizes de agar (1) e alginato de cálcio (2) (a) antes da liofilização, (b) após a liofilização, e (c) após rehidratação.

A incompleta rehidratação das matrizes foi confirmada por análise da variação das respectivas massas ao longo das três fases de processamento, encontrando-se os resultados obtidos na Tabela 7. Pela análise dos resultados apresentados, é possível concluir que as amostras liofilizadas apresentaram aproximadamente 2,00% do peso inicial. Tendo em consideração a composição inicial das matrizes, teoricamente seria de esperar que o peso das amostras de agar e alginato de cálcio, após liofilização, fosse de aproximadamente 1,50% e 1,73%, respectivamente, correspondendo à fracção de soluto presente em cada uma das matrizes. Apesar de ligeiramente superiores, os resultados obtidos encontram-se dentro do esperado, não sendo esta diferença muito significativa, dado que nestes ensaios preliminares foi utilizado um número muito reduzido de amostras.

Tabela 7. Resultados obtidos para a variação de massa das matrizes, após liofilização e rehidratação das mesmas.

	Matriz de agar			Matriz de alginato de cálcio		
	INI	LFZ	RHT	INI	LFZ	RHT
Peso (g)	2,0421	0,0388	1,2066	2,0167	0,0450	0,8673
% Peso em relação ao inicial	100,00	1,90	59,09	100,00	2,23	43,01

[**Legenda:** INI (inicial); LFZ (liofilizada); RHT (reidratada).]

As amostras liofilizadas foram também analisadas com recurso a uma lupa. O aspecto das mesmas, em secção transversal, encontra-se representado na Figura 20. Ambos os tipos de matrizes liofilizadas apresentaram uma estrutura interna porosa, com aspecto vitrificado, consequência do processo a que foram sujeitos. Apesar de não estar representado, não foi observada qualquer porosidade na superfície de ambas, o que poderá estar relacionado com a dificuldade verificada na rehidratação completa das matrizes.

Por todos os aspectos referidos anteriormente, esta não provou ser a metodologia mais adequada para o controlo das contaminações microbianas, frequentes neste tipo de hidrogéis.

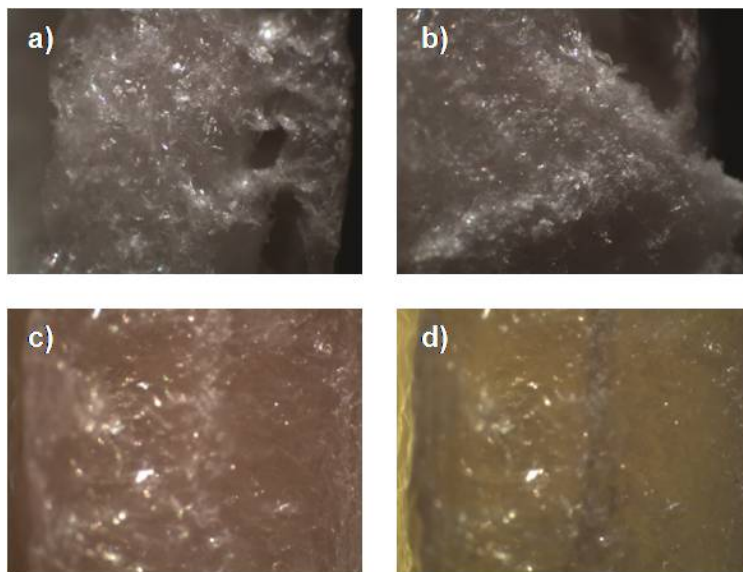


Figura 20. Aspecto microscópico das amostras de agar (a,b) e de alginato de cálcio (c,d), em corte transversal (Ampliação: 35×).

Em alternativa, na preparação dos hidrogéis optou-se por adicionar um agente conservante com actividade antimicrobiana, com acção predominantemente anti-fúngica, esterilizar as soluções por calor húmido sob pressão (121 °C durante 15 minutos) ou efectuar uma filtração esterilizante através de filtro com diâmetro de poro de 0,22 μm , e concluir utilizando condições assépticas.

ii. Adição de agente antifúngico

Na escolha do agente antimicrobiano foi necessário ter em consideração o objectivo futuro das matrizes, ou seja, foi preciso não esquecer que se pretende imobilizar um bacteriófago com acção lítica específica para *P. aeruginosa*, pelo que o conservante escolhido não poderia influenciar a viabilidade e/ou crescimento do microrganismo a detectar. Posto isto, analisando os conservantes disponíveis no laboratório de investigação do Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacêutica (GIBQB-UFP), a escolha recaiu sobre o Nipagin[®] M, nome comercial para o metilparahidroxibenzoato, também conhecido por metilparabeno. Este parabeno é eficaz dentro de uma ampla gama de valores de pH (4-8), apresenta um espectro alargado de acção antimicrobiana, principalmente no que diz respeito a fungos e leveduras, e pode

ser submetido a temperaturas de autoclavagem sem que ocorra a sua degradação (Aalto, T.R. *et al.*, 1953; Rowe, R.C. *et al.*, 2009).

Apesar de na literatura científica estar descrita acção antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, a concentração mínima inibitória (CMI) do metilparabeno em solução aquosa para estirpes desta espécie bacteriana é de 4000 µg/mL ($\approx 0,4\%$ (m/m)), enquanto a CMI para alguns fungos comuns varia entre 250-1000 µg/mL ($\approx 0,025\%$ a 0,1% (m/m)) (Rowe, R.C. *et al.*, 2009). Desta forma, a concentração escolhida foi de 0,1% (m/m), de modo a prevenir a sua eventual acção sobre o agente microbiano a detectar, mantendo, no entanto, acção inibitória sobre os microrganismos fúngicos contaminantes.

A influência macroscópica da adição deste composto, em termos estruturais, foi avaliada através da comparação entre matrizes preparadas com e sem adição de conservante. Relativamente às matrizes de agar, aparentemente, a introdução do agente conservante não induziu alterações na textura, homogeneidade, transparência e coesão estrutural das matrizes. Por outro lado, nas matrizes à base de alginato de cálcio, verificou-se uma ligeira diminuição da coesão estrutural das mesmas, apresentando estas uma menor resistência superficial à compressão. No entanto, foi mantida a homogeneidade e transparência das matrizes, e a consistência do meio (ainda que parcialmente reduzida) não condiciona a realização dos ensaios microbiológicos.

iii. Autoclavagem das soluções poliméricas

De acordo com o referido anteriormente, ao contrário das soluções de agar, cujas propriedades se mantêm inalteradas por exposição ao calor húmido sob pressão, as soluções de alginato de sódio poderão experimentar diminuição de viscosidade. Desta forma, o efeito da autoclavagem das referidas soluções foi avaliada por comparação das características estruturais de matrizes preparadas a partir de soluções autoclavadas, com matrizes preparadas com soluções não sujeitas a autoclavagem.

Tal como esperado, as matrizes de agar resultantes apresentaram as mesmas características, quer tenham sido obtidas por arrefecimento de soluções autoclavadas, ou

não, não havendo influência deste procedimento nas propriedades macroscópicas e estruturais das matrizes. No caso das matrizes de alginato de cálcio, efectivamente verificou-se uma ligeira diminuição da viscosidade da solução polimérica, não sendo no entanto perceptível após polimerização da mesma por gelificação interna com GDL.

Assim, o recurso à autoclavagem das soluções poliméricas, como forma de esterilização das mesmas, é aplicável em ambos os tipos de polímeros, não influenciando a sua estrutura final.

3. Propagação e purificação do bacteriófago DSM JG004

O bacteriófago DSM JG004 foi propagado numa cultura de *Pseudomonas aeruginosa* DSM19880, para preparação de uma solução-*stock* de fago concentrada. A solução obtida foi purificada e o título em fago determinado por plaqueamento com uma suspensão do seu hospedeiro específico. O número de placas de lise produzidas nas diluições mais altas foi contabilizado (ver Figura 21) e a concentração de fago determinada por aplicação da equação (1), apresentada no capítulo de “Materiais e Métodos”.

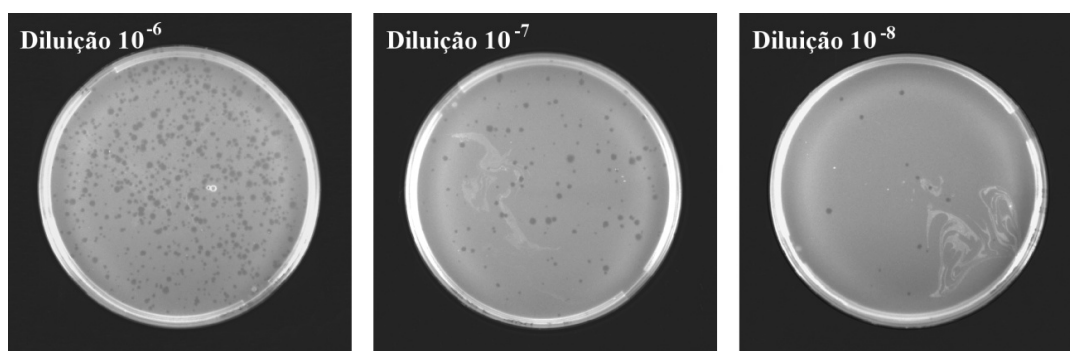


Figura 21. Placas de lise fágicas produzidas nas diluições 10^{-6} a 10^{-8} .

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8. No caso da diluição 10^{-6} , o número de placas de lise fágicas formado é considerado incontável, pelo que a concentração de fago na solução-*stock* corresponderá ao valor médio entre as concentrações determinadas para as diluições 10^{-7} e 10^{-8} , ou seja, um título fágico de $1,38 \times 10^{10}$ UFP/mL.

Tabela 8. Título de fago nas diluições preparadas a partir da solução-*stock* concentrada de fago.

	Diluição 10 ⁻⁶	Diluição 10 ⁻⁷	Diluição 10 ⁻⁸
Nº de placas de lise	> 300	136	14
Título de fago (UFP/mL)	-----	1,36 x 10 ¹⁰	1,40 x 10 ¹⁰

4. Avaliação da viabilidade lítica das partículas fágicas imobilizadas

Para a avaliação da viabilidade lítica dos bacteriófagos imobilizados tornou-se fundamental promover a formação de um tapete bacteriano à superfície das matrizes, com um hospedeiro específico do fago, e garantir antecipadamente que os restantes componentes das formulações biopoliméricas não iriam interferir com a actividade bacteriana, coesão estrutural das matrizes, nem mesmo com a actividade lítica do fago nelas incorporado. Assim, foram preparadas várias matrizes de acordo com as formulações optimizadas, as quais foram posteriormente inoculadas (por espalhamento) com uma suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* DSM19880 e incubadas durante 24 h a uma temperatura de 37 °C. O aspecto macroscópico do tapete bacteriano foi analisado para cada condição experimental, tendo-se como controlo as respectivas matrizes não inoculadas. Os resultados obtidos são apresentados nas Figura 22 e 23 para as matrizes de agar e de alginato de cálcio, respectivamente.

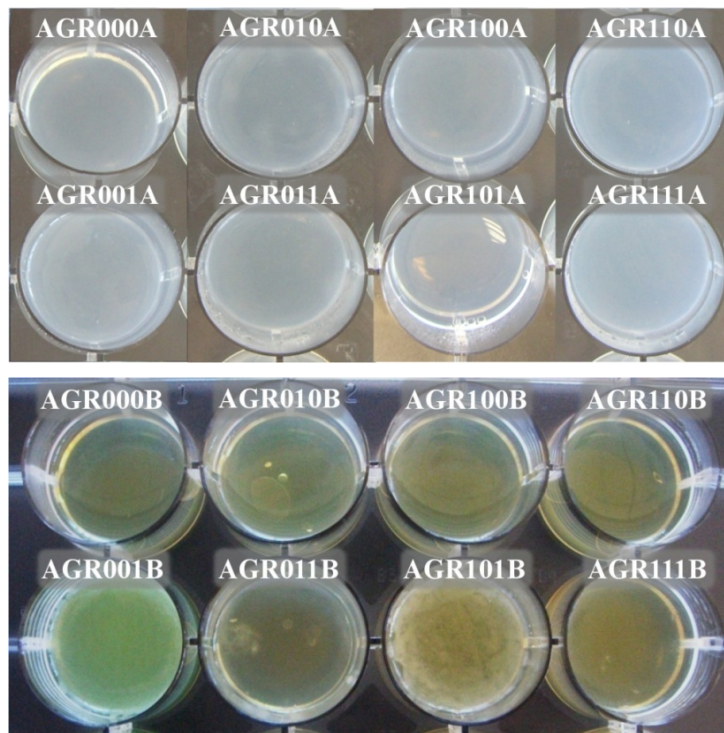


Figura 22. Aspecto macroscópico do tapete bacteriano (*P. aeruginosa* DSM 19880) formado sobre as matrizes de agar testadas, após incubação a 37 °C durante 24 h.

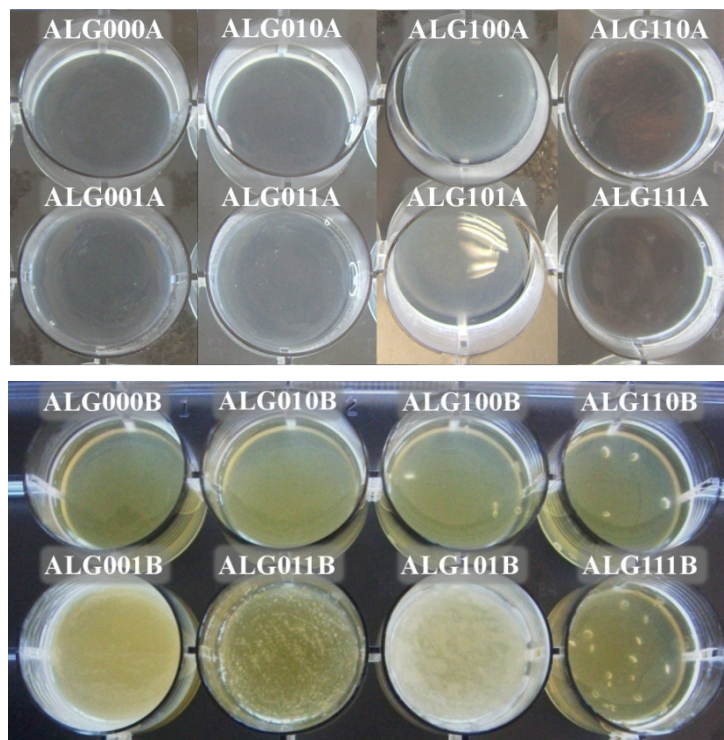


Figura 23. Aspecto macroscópico do tapete bacteriano (*P. aeruginosa* DSM 19880) formado sobre as matrizes de alginato testadas, após incubação a 37 °C durante 24 h.

i. Avaliação da capacidade de formação de tapete bacteriano

Uma vez que a avaliação da viabilidade dos bacteriófagos imobilizados foi realizada pela observação de lise sobre um tapete bacteriano específico, tornou-se essencial avaliar a capacidade de formação do mesmo após inoculação da superfície das matrizes por espalhamento. Assim, por comparação dos resultados obtidos para as matrizes “001A” e “001B” de ambos os polímeros, é possível constatar que, no caso das matrizes preparadas com água desionizada, não se verificou a formação explícita de um tapete bacteriano. Pelo contrário, as matrizes suplementadas com um caldo nutritivo apresentam um desenvolvimento claro de tapete bacteriano contínuo e homogêneo na superfície das matrizes inoculadas, sendo visível inclusive a produção de pigmento de coloração esverdeada, característico da bactéria *P. aeruginosa*, no caso da matriz de agar AGR001B.

No caso da correspondente matriz de alginato (ALG001B), apesar da produção de pigmento não ser tão intensa, a presença do tapete bacteriano é clara, apresentando-se este com um aspecto mucóide, distinto do observado nas matrizes de agar. Estas matrizes apresentam uma outra particularidade, relacionada com a observação de uma ligeira perda de coesão na parte superior da matriz com o desenvolvimento do tapete bacteriano. A desestabilização do hidrogel poderá ser explicada pela possível produção de enzimas liases pela bactéria utilizada, capazes de fragmentarem as moléculas de alginato (Donati, I. e Paoletti, S., 2009).

Outro aspecto característico das culturas da bactéria utilizada, e que permite frequentemente a sua identificação empírica, é a produção de um odor frutado pela mesma, inexistente no caso das matrizes não suplementadas com TSB.

Sendo a formação de tapete bacteriano indispensável para inferir sobre a actividade lítica dos bacteriófagos imobilizados nas matrizes, e tendo em consideração a impossibilidade de visualização de tapete bacteriano nas formulações produzidas com água desionizada, a discussão dos parâmetros seguintes terá apenas em consideração os resultados obtidos com as matrizes suplementadas com meio TSB (códigos terminados em “B”).

ii. Avaliação da coesão estrutural das matrizes

A manutenção da coesão estrutural das matrizes foi outro parâmetro físico a ser considerado, para inferir da viabilidade das mesmas como estruturas de suporte, tanto para a imobilização dos bacteriófagos, como para a sua manipulação microbiológica. Desta forma, foi avaliada a influência de diversos componentes presentes nas formulações finais, mais precisamente, a influência da alteração do solvente aquoso para caldo TSB (matrizes “000A” e “000B”), a introdução do agente conservante (matrizes “100A” e “100B”) e a introdução da suspensão de fago em PBS (matrizes “010A” e “010B”).

Relativamente à modificação do solvente aquoso nas formulações, assim como a introdução da suspensão de fago em PBS, aparentemente não foram produzidas alterações na coesão estrutural, elasticidade, resistência mecânica e opacidade das matrizes, independentemente do polímero em questão. Este aspecto seria particularmente preocupante no caso das matrizes de alginato, pois a presença de outros íons bivalentes, para além dos íons cálcio responsáveis pela sua polimerização, poderia conduzir à desestruturação dos hidrogéis. No entanto, mesmo nestas matrizes isso não se verificou.

Em relação ao efeito da introdução do agente conservante nas formulações conducentes às matrizes polimerizadas, este foi já objecto de análise detalhada no ponto **2.ii.** deste capítulo de “Resultados e Discussão”.

iii. Avaliação da influência da adição do agente conservante sobre o crescimento bacteriano

Outro aspecto que poderia comprometer a viabilidade das partículas fágicas imobilizadas no seio das matrizes biopoliméricas dizia respeito à introdução do agente conservante. O agente antimicrobiano utilizado (Nipagin[®] M), apesar de ser eficaz principalmente contra fungos e leveduras, tem igualmente acção sobre a bactéria utilizada nestes ensaios, podendo inibir o crescimento do hospedeiro específico do fago e impedir a formação do tapete bacteriano. No entanto, ainda que se tenham utilizado concentrações de conservante bastante abaixo da CMI para a bactéria hospedeira, foi

necessário verificar se este estaria a impedir o sucesso das análises subsequentes. Para tal, foram inoculadas matrizes de ambos os polímeros com e sem conservante incorporado e os resultados da incubação comparados entre si.

No caso das matrizes de agar preparadas com conservante incorporado (AGR101B), foi possível observar a formação de um tapete bacteriano contínuo à superfície das mesmas, não havendo aparente influência da adição do conservante sobre o desenvolvimento do microrganismo hospedeiro. No entanto, será de salientar que, comparando o aspecto macroscópico do tapete bacteriano produzido nas matrizes AGR001B e AGR101B, a presença do conservante parece ter influenciado a produção de pigmento pela bactéria.

iv. Avaliação da manutenção da viabilidade lítica do bacteriófago

A avaliação da manutenção da viabilidade lítica das partículas fágicas imobilizadas nas matrizes biopoliméricas passou pela observação de fenómenos de lise, decorrentes da actividade fágica sobre um tapete bacteriano originado pelo hospedeiro específico do fago.

Analisando as matrizes AGR011B e ALG011B, não foi possível observar um tapete bacteriano contínuo, apenas se observando a presença de bactéria em alguns pontos da superfície da matriz. Por comparação com as matrizes controlo AGR001B e ALG001B, a ocorrência de lise da bactéria, traduzida pela interrupção do tapete bacteriano, foi evidente, demonstrando que o fago imobilizado, responsável pelos fenómenos de lise observados, se encontrava viável e a sua actividade lítica mantida.

Resultados semelhantes foram observados na presença do agente conservante (matrizes AGR111B e ALG111B), não havendo uma aparente influência do agente antimicrobiano sobre a actividade lítica do fago.

5. Microanálise estrutural das matrizes através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento

A estrutura microscópica das matrizes biopoliméricas analisadas no ponto anterior, foi avaliada por CRIO-SEM, no sentido de tentar estabelecer algumas relações entre a microestrutura apresentada pelas várias matrizes gelificadas e a estabilização estrutural e funcional do bacteriófago DSM JG004.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 24 para as matrizes de agar, e na Figura 25 para as matrizes de alginato. Todas as matrizes observadas estão identificadas com a sua referência individual, sendo que nas matrizes assinaladas com um asterisco (*) foi possível observar a presença da bactéria hospedeira em zonas mais superficiais das mesmas.

Da observação das matrizes de agar (ver Figura 24) é possível depreender que, de uma forma geral e independentemente da condição experimental testada, todas as matrizes apresentam uma estrutura microporosa fina com marcada interconectividade entre poros, apresentando estes um índice de polidispersão elevado. Apesar de não ter sido possível observar a presença de fago em nenhuma das amostras, pelo carácter nanométrico destes se situar abaixo do limite de resolução da técnica de microscopia utilizada, este tipo de arquitectura interna das matrizes permitirá uma boa contenção dos bacteriófagos incluídos nas formulações, facilitando, no entanto, o acesso do mesmo ao seu hospedeiro específico, tendo em consideração a elevada interconectividade observada.

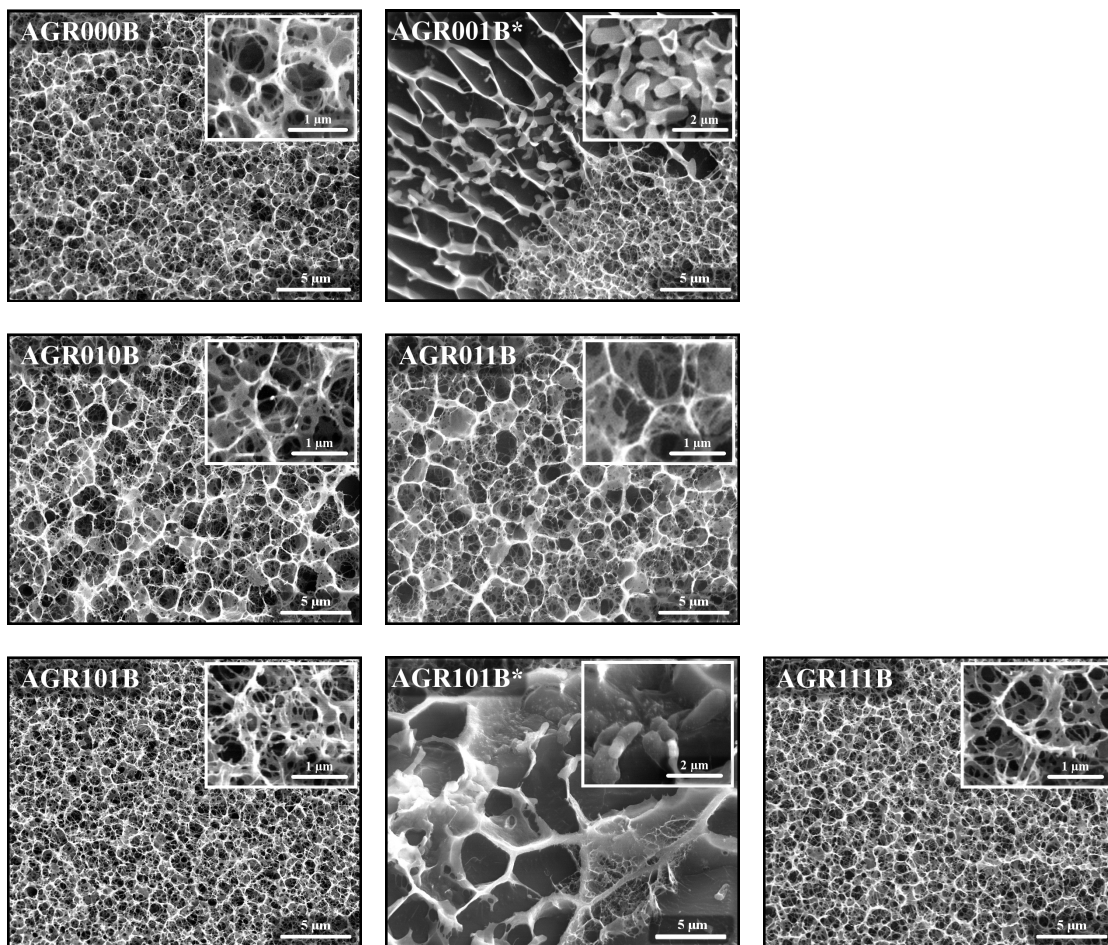


Figura 24. Microfotografias de CRIO-SEM das matrizes de agar, com variação das condições experimentais utilizadas em termos de adição de agente conservante, incorporação do bacteriófago e inoculação bacteriana [Fonte: autor].

À semelhança do que foi discutido anteriormente, a inclusão de um agente antimicrobiano nas formulações conducentes às matrizes polimerizadas, assim como a inoculação por espalhamento com *Pseudomonas aeruginosa* DSM19880, não produziu alterações visíveis na arquitetura dos hidrogéis originados, como poderá ser observado, por exemplo, por comparação entre as matrizes AGR000B e AGR111B.

A presença de, e observação de, bacilos de *Pseudomonas aeruginosa* deveria ser comum a todas as matrizes inoculadas, sendo espectável a presença de bactéria apenas na superfície inoculada, pela complexidade da estrutura microporosa das matrizes. No entanto, entre as matrizes observadas, previamente inoculadas por espalhamento com bactéria, apenas foi possível observar a sua presença nas matrizes AGR001B* e AGR101B*, apresentando o microrganismo uma forma baciliforme ligeiramente curva,

com dimensões aproximadas de 0,5 μm de diâmetro por 1,5 μm de comprimento. O facto de não se ter observado o mesmo para as restantes amostras inoculadas, não será conclusivo quanto à sua ausência, uma vez que, considerando o pré-processamento das matrizes para observação por microscopia electrónica, a superfície de inoculação poderá ter sido removida aquando da fractura das amostras.

Em relação às matrizes de alginato observadas (ver Figura 25), constatou-se a existência de uma arquitectura microporosa com poros de dimensões aparentemente mais elevadas, menor índice de polidispersão e menor interconectividade, quando comparada com a microestrutura observada para as matrizes de agar. Apesar dos ensaios microbiológicos terem revelado a manutenção da actividade lítica dos bacteriófagos imobilizados, esta microarquitECTURA com menor interconectividade entre poros poderá condicionar o acesso dos fagos ao seu hospedeiro, ao conferir uma maior retenção dos mesmos no seio da matriz polimerizada de alginato. Desta forma, os fenómenos de lise bacteriana observados sobre o tapete de *P. aeruginosa* deverão estar associados apenas à actividade dos bacteriófagos presentes nas camadas mais superficiais dos hidrogéis de alginato. Estas observações permitiram igualmente confirmar que, com a introdução do agente conservante (ALG101B), a estrutura das matrizes sofreu uma ligeira alteração, produzindo-se uma microarquitECTURA mais aberta, possivelmente responsável pela menor resistência à compressão observada nestas matrizes. Por outro lado, nas matrizes em que foi possível manter parte da camada superficial inoculada, após crio-fractura das mesmas, observou-se a presença de estruturas baciliformes, correspondentes ao inóculo bacteriano de *P. aeruginosa*, envolvidas por uma substância de aspecto homogéneo e contínuo.

Esta observação vai de encontro ao aspecto mucóide do tapete bacteriano de *P. aeruginosa* produzido sobre os hidrogéis de alginato, podendo esta substância corresponder a alginato produzido pelas próprias bactérias ou, por outro lado, ser decorrente da actividade de enzimas liase produzidas por estes microrganismos, que originam a degradação das cadeias de alginato com redução da viscosidade do mesmo (Donati, I. e Paoletti, S., 2009).

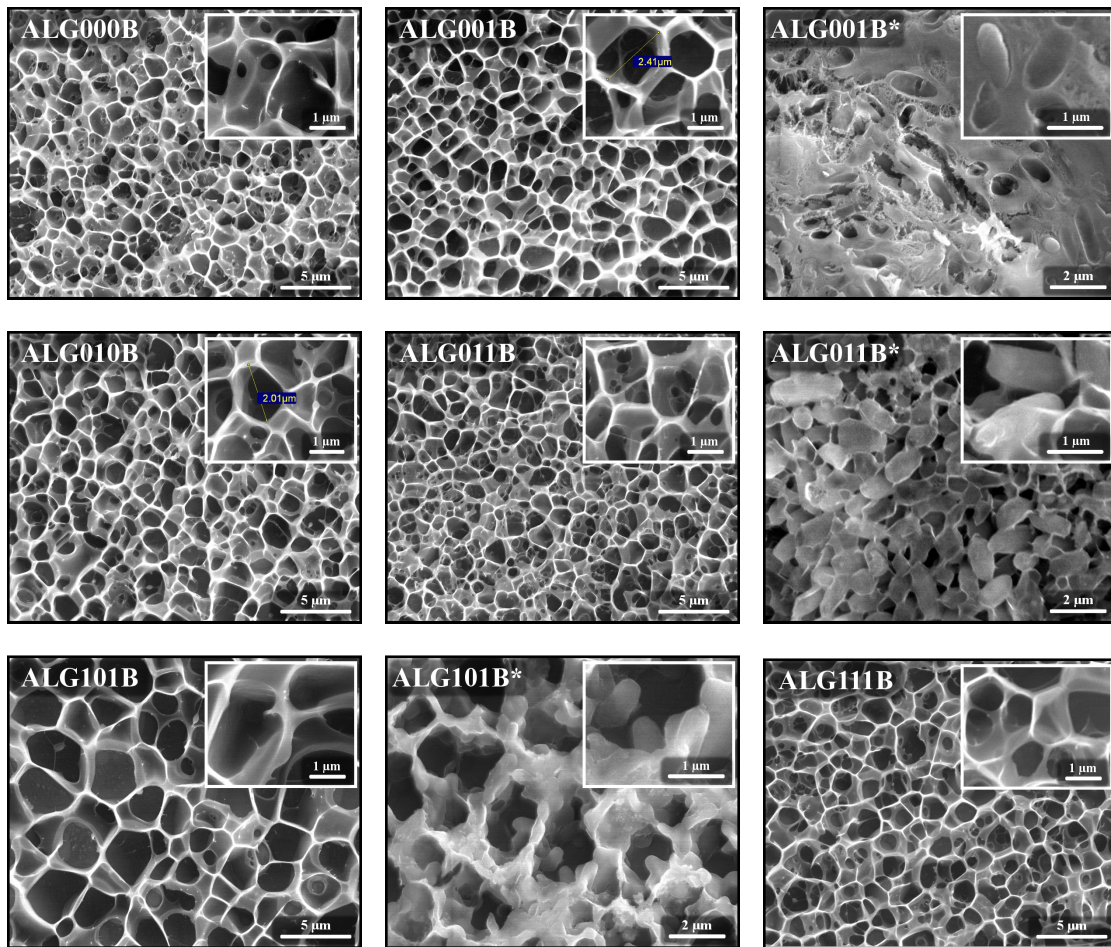


Figura 25. Microfotografias de CRIO-SEM das matrizes de alginato, com variação das condições experimentais utilizadas em termos de adição de agente conservante, incorporação do bacteriófago e inoculação bacteriana [Fonte: autor].

IV. Conclusões

Este trabalho de investigação para conclusão de ciclo de estudos teve como principal objectivo o desenvolvimento de hidrogéis para a estabilização estrutural e funcional de um bacteriófago, tendo-se utilizado como modelo o bacteriófago DSM JG004, com acção lítica específica sobre a estirpe bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880, visando uma potencial aplicação futura ao nível de sistemas de detecção bacteriana.

Para o efeito, foram optimizadas duas matrizes biopoliméricas, à base de agar e alginato de sódio, nas quais foi incorporada uma suspensão do referido bacteriófago. Os ensaios microbiológicos, realizados com o seu hospedeiro bacteriano específico, demonstraram a manutenção da viabilidade lítica dos bacteriófagos após a sua imobilização no seio das matrizes biopoliméricas, comprovada pela ocorrência de lise do tapete microbiano produzido (produção de placas de lise fágica). A análise dos hidrogéis por CRIO-SEM revelou igualmente a existência de uma estrutura porosa de características intrincadas apropriadas para a protecção dos bacteriófagos, não restringindo, no entanto, o acesso fácil ao seu hospedeiro bacteriano específico, de modo a promover a sua lise. A estabilização das partículas fágicas pode ainda ser correlacionada com a alteração das condições termodinâmicas do meio envolvente de cada partícula, uma vez que os movimentos das moléculas de solvente na sua microvizinhança se encontravam seriamente reduzidos pelo efeito de gelificação da matriz polimérica, o que está em consonância com o descrito na literatura científica para o caso da estabilização de moléculas proteicas (Ragoonanan, V. e Aksan, A., 2007).

As condições de gelificação/polimerização das matrizes provaram ser inócuas e não interferiram com a actividade biológica, nem do fago nem da bactéria, tendo-se alcançado com sucesso a estabilização estrutural e funcional do primeiro. Ambas as matrizes encontram potencial aplicação tanto na detecção de uma ampla variedade de contaminações bacterianas, adaptando o bacteriófago estabilizado, como em sistemas de libertação controlada na terapêutica de infecções bacterianas superficiais, alterando-se adicionalmente a espessura das matrizes biopoliméricas.

Em termos de perspectivas futuras seria relevante avaliar a longo prazo, e sob múltiplas condições de conservação, a estabilidade das matrizes bio(poliméricas) e a manutenção da viabilidade das partículas fágicas imobilizadas. Uma outra vertente futura deste projecto experimental passará pela inclusão nos hidrogéis de um mecanismo cromogénico para detecção de componentes bacterianos intracelulares, dando origem a um inovador sistema de detecção de patógenos bacterianos.

V. Referências Bibliográficas

- Aalto, T. R., Firman, M. C. e Rigler, N. E. (1953). *p*-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 42 (8), pp. 449-457.
- Ackermann, H. W. (2005). Bacteriophage Classification. In: Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 67-90.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152 (2), pp. 227-243.
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York, Interscience, pp. 49-62.
- Azzazy, H. M. E. e Highsmith Jr, W. E. (2002). Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, 35 (6), pp. 425-445.
- Balcão, V. M. e Malcata, F. X. (1998). On the performance of a hollow-fiber bioreactor for acidolysis catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, 60 (1), pp. 114-123.
- Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X. e Guisán, J. M. (2001a). Coimmobilization of L-asparaginase and glutamate dehydrogenase onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (7-8), pp. 696-704.
- Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X. e Guisán, J. M. (2001b). Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. *Biotechnology Progress*, 17 (3), pp. 537-542.
- Balcão, V. M., Vieira, M. C. e Malcata, F. X. (1996). Adsorption of Protein from Several Commercial Lipase Preparations onto a Hollow-Fiber Membrane Module. *Biotechnology Progress*, 12 (2), pp. 164-172.
- Barros, R. M., Extremina, C. I., Gonçalves, I. C., Braga, B. O., Balcão, V. M. e Malcata, F. X. (2003). Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (7), pp. 908-916.
- Bennett, A. R., Davids, F. G., Vlahodimou, S., Banks, J. G. e Betts, R. P. (1997). The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of Salmonella. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (2), pp. 259-265.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells - Some Practical Considerations. In: Bickerstaff, G. F. (Ed.) *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey, Humana Press, pp. 1-11.

- Cademartiri, R., Anany, H., Gross, I., Bhayani, R., Griffiths, M. e Brook, M. A. (2010). Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials*, 31 (7), pp. 1904-1910.
- Canilha, L., Carvalho, W. e Almeida e Silva, J. B. (2006). Biocatalizadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biociência & Desenvolvimento*, 36, pp. 48-57.
- Carlson, K. (2005). Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches. In: Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 429-484.
- Carlton, R. M. (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47, pp. 267-274.
- Centers for Disease Control and Prevention (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control*, 32 (8), pp. 470-485.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Healthcare-associated Infections (HAIs). [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/hai/index.html>>. [Consultado em 26/07/2011].
- Cezário, R. C. (2008). *Surto por Pseudomonas aeruginosa resistente ao imipenem nas Unidades de Terapia Intensiva/ Adulto de dois hospitais de Uberlândia - MG*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia.
- Costa, A. C., Noriega, E., Fonseca, L. F. e Silva, M. G. (2009). *Inquérito nacional de prevalência de infecção*. Lisboa, Direcção-Geral de Saúde.
- Covizzi, L. G., Giese, E. C., Gomes, E., Dekker, R. e Silva, R. (2007). Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, 28 (2), pp. 143-160.
- Direcção-Geral da Saúde (2007). Programa nacional de prevenção e controlo da infecção associada aos cuidados de saúde. [Em linha]. Disponível em < www.dgs.pt>. [Consultado em 27/06/2011].
- Donati, I. e Paoletti, S. (2009). Material Properties of Alginates. In: Rehm, B. H. A. (Ed.) *Alginates: Biology and Applications*. Münster, Springer, pp. 1-53.
- Draget, K. I., Moe, S. T., Skjak-Bræk, G. e Smidsrod, O. (2006). Alginates. In: Stephen, A. M., Phillips, G. O. e Williams, P. A. (Eds.). *Food Polysaccharides and Their Applications*, 2.^a Ed. New York, Taylor & Francis Group, pp. 289-334.
- Draget, K. I., Ostgaard, K. e Smidsrod, O. (1989). Alginate-based solid media for plant tissue culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31 (1), pp. 79-83.

- DSMZ GmbH. (2004). Phage JG004. [Em linha]. Disponível em <http://www.dsmz.de/microorganisms/phage_info.php?dsmz_no=19871>. [Consultado em 11/04/2011].
- European Centre for Disease Prevention and Control (2010). *Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe*. Stockholm, ECDC.
- Garbe, J. (2010). *Isolation of Pseudomonas aeruginosa phages and their application for the analysis of lipopolysaccharides*. Tese de Doutorado, Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Germany.
- Garbe, J., Bunk, B., Rohde, M. e Schobert, M. (2011). Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004. *BMC Microbiology*, 11, pp. 102-113.
- Gervais, L., Gel, M., Allain, B., Tolba, M., Brovko, L., Zourob, M., Mandeville, R., Griffiths, M. e Evoy, S. (2007). Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125 (2), pp. 615-621.
- Giamarellou, H. (2002). Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, pp. 229-233.
- Guttman, B., Raya, R. e Kutter, E. (2005). Basic Phage Biology. In: Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 28-66.
- Hagens, S. e Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (3), pp. 513-519.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30 (2), pp. 118-128.
- Hennink, W. E. e van Nostrum, C. F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (1), pp. 13-36.
- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (1), pp. 3-12.
- Horan, T. C., Andrus, M. e Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*, 36 (5), pp. 309-332.
- Inal, J. M. (2003). Phage Therapy: a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51, pp. 237-244.
- Infarmed (Ed.) (2005). *Farmacopeia Portuguesa VIII*. Lisboa, Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento.
- Kerr, K. G. e Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73, pp. 338-344.

- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards, C. L., Jr., Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A. e Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports*, 122 (2), pp. 160-166.
- Kramer, A., Schwebke, I. e Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6 (1), pp. 130-137.
- Kuo, C. K. e Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22 (6), pp. 511-521.
- Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (2005). Introduction. In: Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 1-4.
- Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcão, V. M. e Malcata, F. X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (7-8), pp. 642-652.
- Lin, E. C. C., Goldstein, R. N. e Syvanen, M. (1984). *Bacteria, Plasmids, and Phages: An Introduction to Molecular Biology*. Cambridge, Harvard University Press.
- Loc-Carrillo, C. e Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1 (2), pp. 111-114.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. e Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, 2 (9), pp. 1051-1060.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. e Sabour, P. M. (2008). Microencapsulation of bacteriophage *felix O1* into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), pp. 4799-4805.
- Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Glenn, J. e Sulakvelidze, A. (2002). A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *International Journal of Dermatology*, 41 (7), pp. 453-458.
- McHugh, D. J. (Ed.) (1987). *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- McNerney, R. (1999). TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3 (3), pp. 179-184.
- Mirza, A. (2011). Hospital-Acquired Infections. [Em linha]. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/967022-overview>>. [Consultado em 28/07/2011].

- Mole, R. J. e Maskell, T. W. O. (2001). Phage as a diagnostic - the use of phage in TB diagnosis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76 (7), pp. 683-688.
- Mosier-Boss, P. A., Lieberman, S. H., Andrews, J. M., Rohwer, F. L., Wegley, L. E. e Breitbart, M. (2003). Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species. *Applied Spectroscopy*, 57 (9), pp. 1138-1144.
- Moutinho, C. G., Matos, C. M., Teixeira, J. A. e Balcão, V. M. (2011). Nanocarrier possibilities for functional targeting of bioactive peptides and proteins: state-of-the-art. *Journal of Drug Targeting*, In Press, pp. 1-28.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Cardoso, S. M., Silva, A. M. S., Domingues, M. d. R. M., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho Jr, L. B. e Teixeira, J. A. C. (2011a). Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *International Dairy Journal*, 21 (3), pp. 172-178.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho Jr, L. B. e Teixeira, J. A. (2008a). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 9 (14), pp. 2334-2339.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R., Carvalho Jr., L. B. e Teixeira, J. A. (2008b). β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized onto different magnetic supports: A comparative experimental and modelling study of the galactooligosaccharides production. In: Ferreira, E. C. e Mota, M. (Eds.). *Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2008*. Braga, pp. 1036-1041.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C. A. P., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho Jr, L. B. e Teixeira, J. A. (2009a). Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115 (1), pp. 92-99.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Dourado, F. O. Q., Oliveira, J. M. B., Carvalho Jr, L. B. e Teixeira, J. A. (2009b). Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane-polyaniline particles. *Reactive and Functional Polymers*, 69 (4), pp. 246-251.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Dourado, F. O. Q., Oliveira, J. M. B., Carvalho Jr, L. B. e Teixeira, J. A. (2011b). Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70 (1-2), pp. 74-80.
- Nicolle, L. E. (2002). Nosocomial Infections. In: Breslow, L. (Ed.) *Encyclopedia of Public Health*, Volume 3. New York, Macmillan Reference USA, pp. 828-830.

- Nussinovitch, A. (1997). *Hydrocolloid applications - Gum technology in the food and other industries*. London, Chapman & Hall.
- Pai, M. e Kalantri, S. P. (2005). Bacteriophage-based tests for tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23 (3), pp. 149-150.
- Park, J. K. e Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18 (4), pp. 303-319.
- Pier, G. B. e Ramphal, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E. e Dolin, R. (Eds.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7.^a Ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 2835-2860.
- Pina, E., Ferreira, E., Marques, A. e Matos, B. (2010). Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 10, pp. 27-39.
- Pires, E. J. V. C., Silva Júnior, V. V. d., Lopes, A. C. d. S., Veras, D. L., Leite, L. E. e Maciel, M. A. V. (2009). Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 21, pp. 384-390.
- Pitt, T. L. e Simpson, A. J. H. (2006). *Pseudomonas and Burkholderia spp.* In: Gillespie, S. H. e Hawkey, P. M. (Eds.). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2.^a Ed. Wiltshire, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 427-443.
- Puapermpoonsiri, U., Spencer, J. e van der Walle, C. F. (2009). A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (1), pp. 26-33.
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H. e Heller, H. C. (2007). *Life –The Science of Biology*, 7.^a Ed. Sunderland, W. H. Freeman & Co.
- Ragoonanan, V. e Aksan, A. (2007). Protein stabilization. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 34, pp. 246-252.
- Rees, C. E. e Dodd, C. E. (2006). Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food. *Advances in Applied Microbiology*, 59, pp. 159-186.
- Rees, C. E. D. e Loessner, M. J. (2005). Phages for the Detection of Pathogenic Bacteria. In: Kutter, E. e Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 264-281.
- Ripp, S. (2010). Bacteriophage-based pathogen detection. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 118, pp. 65-83.
- Roberts, K. J. (2006). Microbiology 201. [Em linha]. Disponível em <<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%2013/lytic.html>>. [Consultado em 30/10/2011].

- Rossolini, G. M. e Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (Suppl. 4), pp. 17-32.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J. e Quinn, M. E. (Eds.). (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6.^a Ed. London, Pharmaceutical Press.
- Sá-Correia, I. (2000). Pseudomonaceae: Pseudomonas. In: Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (Eds.). *Microbiologia*, Volume 2. Lousã, Lidel, pp. 123-136.
- Schmelcher, M. e Loessner, M. J. (2008). Bacteriophage: Powerful Tools for the Detection of Bacterial Pathogens. In: Zourob, M., Elwary, S. e Turner, A. (Eds.). *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. New York, Springer, pp. 731-754.
- Shenai, S., Rodrigues, C. e Mehta, A. P. (2002). Evaluation of a new phage amplification technology for rapid diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 20 (4), pp. 194-199.
- Smartt, A. e Ripp, S. (2011). Bacteriophage reporter technology for sensing and detecting microbial targets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (4), pp. 991-1007.
- Smidsrod, O. (1975). Molecular-Basis for Some Physical-Properties of Alginates in Gel State. *Faraday Discussions*, 57, pp. 263-274.
- Smietana, M., Bock, W. J., Mikulic, P., Ng, A., Chinnappan, R. e Zourob, M. (2011). Detection of bacteria using bacteriophages as recognition elements immobilized on long-period fiber gratings. *Optics Express*, 19 (9), pp. 7971-7978.
- Souza, G. R., Christianson, D. R., Staquicini, F. I., Ozawa, M. G., Snyder, E. Y., Sidman, R. L., Miller, J. H., Arap, W. e Pasqualini, R. (2006). Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (5), pp. 1215-1220.
- Souza, G. R., Yonel-Gumruk, E., Fan, D., Easley, J., Rangel, R., Guzman-Rojas, L., Miller, J. H., Arap, W. e Pasqualini, R. (2008). Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: the effect of cis- and trans-acting factors. *Plos One*, 3 (5), pp. 1-5.
- Souza Junior, W. C. (2006). *Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Stanley, N. F. (2006). Agar. In: Stephen, A. M., Phillips, G. O. e Williams, P. A. (Eds.). *Food Polysaccharides and Their Applications*, 2.^a Ed. New York, Taylor & Francis Group, pp. 217-238.

- Sun, W., Brovko, L. e Griffiths, M. (2001). Use of bioluminescent Salmonella for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27 (2), pp. 126-128.
- Tampion, J. e Tampion, M. D. (1987). *Immobilized Cells: Principles and Applications*. New York, Cambridge University Press.
- Tolba, M., Minikh, O., Brovko, L. Y., Evoy, S. e Griffiths, M. W. (2010). Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (2), pp. 528-535.
- Van Tomme, S. R., Storm, G. e Hennink, W. E. (2008). In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 355 (1-2), pp. 1-18.
- WHO (2002). *Prevention of hospital-acquired infections - A practical guide*, 2ª Ed. Malta, World Health Organization.

ANEXOS

MICRO BIOTEC'11

BRAGA
01 DEC - 03 DEC

PORTUGUESE SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
PORTUGUESE SOCIETY FOR BIOTECHNOLOGY

irvs
Life and Health Sciences Research Institute
Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde



Universidade do Minho
Escola de Ciências



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

IBB

INSTITUTE FOR BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING

 **SPM**
Sociedade Portuguesa de Microbiologia

<http://microbiotec11.org>

Microbiotec11

Provisional edition

Edition: Joana Azeredo, Jorge Pedrosa, Mark Sturme, Nuno Cerca

Cover: Don't Lose Your Brain

Design: Nuno Cerca

Publisher: Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica

ISBN: 978-989-97478-1-4

Número de depósito legal: 336373/11

Printed by: Sersilito – Empresa Gráfica, Lda

<http://microbiotec11.wordpress.com>

This is the book of abstracts of the scientific presentations at Microbiotec11. The acceptance of communications was based on the submitted abstracts. The text hereby reproduced is of the responsibility of its authors. Authors are encouraged to report typing errors to be corrected. A final e-version will be distributed to all participating authors.

PS3: 1

Biopolymeric matrices for structural and functional stabilization of bacteriophages**Victor M. Balcão^{1,2}, Ana R. Moreira¹, Carla G. Moutinho^{1,2}, José A. Teixeira²**¹Bioengineering and Biopharmaceutical Chemistry Research Group, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal; ²IBB - Institute for Biotechnology & Bioengineering, Centre Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

In the recent past years, bacteriophage research has experienced a renaissance due to their potential application in the pharmaceutical field, especially with the increase of bacterial resistance to antibiotics and the possibility to take part in new methods of early detection and diagnosis of bacterial infections. In that context, the structural and functional stabilization of bacteriophages using biopolymeric microporous hydrogels represents a promising research focus with a broad potential biomedical/ biopharmaceutical application. The scope of this work was to develop biopolymeric non-toxic phage-hydrogels of agar and sodium alginate, obtained at neutral pH and mild polymerization conditions, in order to offer adequate characteristics to the maintenance of phage's lytic activity. Disc-like phage-hydrogels were prepared, with a phage and polymer concentration of 1.3×10^8 PFU/ml and 1.5% (w/v), respectively. Regarding the alginate hydrogels, CaCO_3 (22.5 mM) and GDL (48 mM) were also included in the formulation. Agar hydrogels were prepared naturally by jellification, as a function of temperature lowering, and alginate hydrogels were prepared by internal gelation. The matrices were inoculated with a suspension of susceptible (host) bacteria and incubated at 37 °C for 24h. Observation of bacterial lawn's lysis demonstrated that bacteriophages kept their lytic activity, being the method of physical entrapment able to promote their stabilization. Cryo-SEM analysis revealed that both types of phage-hydrogels present interconnective microporous network, which guaranties a facilitated access of the phages to the bacteria, ensuring an efficient lysis of the host bacteria present in the surface of the hydrogels. The developed hydrogels also present appropriate physical and chemical properties for a wider variety of applications in the field of pharmaceutical sciences, such as controlled release of (macro)molecules, cell immobilization and 3D support for tissue regeneration.

PS3: 2

Structural and functional stabilization of glycomacropeptide via encapsulation within multiple emulsions**Carla G. Moutinho^{1,2}, José A. Teixeira², Victor M. Balcão^{1,2}**¹Bioengineering and Biopharmaceutical Chemistry Research Group, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal; ²IBB - Institute for Biotechnology & Bioengineering, Centre Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

Bovine glycomacropeptide (GMP), derived from whey proteins, has been demonstrated to possess an interesting bioactivity that has attracted a lot of attention over the last few years. In particular, its ability to bind *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins, inhibit bacterial and viral adhesion, suppress gastric secretions, promote bifidobacterial growth and modulate immune system responses. Of these, protection against toxins, bacteria and viruses, and modulation of the immune system, are the most promising applications for this bioactive dairy macropeptide. The development of strategies that may allow its structural and functional stabilization via nanoencapsulation within multiple emulsions may increase its food and biopharmaceutical applicabilities. In this research effort, bovine GMP was (thermodynamically) stabilized via entrapment within water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsions aiming at mimicking the multifunctional design of biology, with several lipid matrices, and stabilizing layer compositions. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions are ideal for encapsulation since they can carry both polar and non-polar (bio)molecules. The composition of the stabilizing layer of the nanosystem was changed by using different poloxamers and proportions of lecithin. Physicochemical characterization of the optimized GMP-encasing nanovesicle formulations encompassed determination of Zeta potential and particle hydrodynamic size over storage time, surface morphology via CRYO-SEM, and microcalorimetric analysis via DSC.

PS3: 3

Antibacterial activity and antiradical activity of *Nasturtium officinale* hydrophilic extract and their natural compound 2-phenylethyl isothiocyanate, against pathogenic aerobic bacteria**Alfredo Aires¹, Carla S. P. Dias^{1,2}, Eduardo A.S. Rosa¹, Maria José Saavedra²**¹CITAB-Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, Agronomy Department Universidade de Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal; ²CECAV-Veterinary and Animal Science Research Center, Veterinary Science Department, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Several reports have indicated that *Nasturtium officinale* R. Br. (watercress), of the family *Brassicaceae*, has been long used as traditional remedy and medicinal plant in East countries. The aim of this study was to

Biopolymeric matrices for the structural and functional stabilization of bacteriophages



Balcão, V.M.^{1,2,*}; Moreira, A.R.¹; Moutinho, C.G.^{1,2}; and Teixeira, J.A.²

¹ Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacêutica (GIBQB-CIAGEB), Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia n.º 296, P-4200-150 Porto, Portugal.

² IBB – Instituto para a Biotecnologia e a Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Guallar, P-4710-057 Braga, Portugal.
* email: vbalcão@ufp.edu.pt



Abstract

In the recent past years, bacteriophage research has experienced a renaissance due to their potential application in the pharmaceutical field, especially with the increase of bacterial resistance to antibiotics and the possibility to take part in new methods of early detection and diagnosis of bacterial infections. In that context, the structural and functional stabilization of bacteriophages using biopolymeric microporous hydrogels represents a promising research focus with a broad potential biomedical/pharmaceutical application. The scope of this work was to develop biopolymeric non-toxic phage-hydrogels of agar and sodium alginate, obtained at neutral pH and mild polymerization conditions. In order to offer adequate characteristics to the maintenance of phage's lytic activity, disc-like phage-hydrogels were prepared, with a phage and polymer concentration of 1.3×10^9 PFU/mL and 1.0% (w/w), respectively. Regarding the alginate hydrogels, CaCl₂ (22.5 mM) and GDL (48 mM) were also included in the formulation. Agar hydrogels were prepared naturally by gelification, as a function of temperature lowering, and alginate hydrogels were prepared by internal gelation. The matrices were inoculated with a suspension of susceptible (host) bacteria and incubated at 37 °C for 24h. Observation of bacterial lawn's lysis demonstrated that bacteriophages kept their lytic activity, being the method of physical entrapment able to promote their stabilization. Cryo-SEM analysis revealed that both types of phage-hydrogels present interconnected microporous network, which guarantees a facilitated access of the phages to the bacteria, ensuring an efficient lysis of the host bacteria present in the surface of the hydrogels. The developed hydrogels also present appropriate physical and chemical properties for a wider variety of applications in the field of pharmaceutical sciences, such as controlled release of (macro)molecules, cell immobilization and 3D support for tissue regeneration.

Experimental procedures

OPTIMIZATION OF GELIFICATION / POLYMERIZATION CONDITIONS IN THE DEVELOPMENT OF PHAGE-HYDROGEL MATRICES

In the development of hydrogels for the structural and functional stabilization of bacteriophage particles, five distinct biopolymers were evaluated, namely agar, sodium alginate, dextran, xanthan gum and polygalacturonic acid. However, preliminary assays produced promising results only for the first two polymers, which were then subsequently further explored in detail throughout the rest of the research work entailed herein. The procedures tested were derived, generally, from experimental protocols previously described in the scientific literature. As molds for the various hydrogel matrices, culture plates of 12 wells were utilized, and for every assay approximately 2.0 g of polymeric solution were transferred into every well.

Agar-based matrices. In the optimization of agar matrices, technical-grade agar was used, specific for microbiological assays, and concentrations of 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% and 3.0% (w/w) were tested. Agar solutions were prepared by heating deionized water up to ca. 85 °C. Agar, accurately weighed, was dispersed in the heated deionized water via magnetic stirring, and the dispersions thus obtained were subsequently boiled during a few seconds to allow for complete dissolution of the agar. Every solution was transferred into the wells of culture plates and, after a time period of ca. 30 minutes so as to allow for temperature lowering and gelification of the solutions, these were inverted and kept at 4 °C until use.

Sodium alginate-based matrices. For the development of sodium alginate hydrogels, two distinct conventional approaches were tested, namely the diffusion method and the internal gelification method (Donati and Paselli, 2009; Draget et al., 2009). In the diffusion method, the specific gelification of sodium alginate was tested with dihydrate calcium chloride (CaCl₂·2H₂O) and dihydrate calcium sulphate (CaSO₄·2H₂O). For that, sodium alginate solutions with increasing concentrations were prepared (0.5% - 3.0% (w/w)) by dissolving the polymer in deionized water (previously heated to ca. 85 °C). After obtaining homogeneous solutions, they were transferred into the wells of culture plates and precise amounts of calcium solutions were duly poured on top of them. Polymerization was allowed to proceed at room temperature for a period of ca. 24 h, and the matrices thus obtained subsequently kept at 4 °C.

PROPAGATION OF THE BACTERIOPHAGE BY INOCULATION OF A BACTERIAL CULTURE, PURIFICATION AND QUANTIFICATION

For propagation of the bacteriophage (DSM J0994, from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ), serial dilutions were prepared (10^{-1} - 10^{-7}) in phosphate buffer (PBS, pH 7.0), by transferring 100 µL of the bacteriophage suspension into 1.5 mL vials containing 900 µL PBS. In the same manner, a 1:10 dilution in NB medium of the *Pseudomonas aeruginosa* bacterial culture (DSM 19680, also from DSMZ) (previously inoculated) was also prepared. Into sterilized test tubes, 100 µL of every bacteriophage dilution was duly transferred together with 300 µL of the diluted bacterial suspension, carrying out double assays for every bacteriophage dilution. Finally, 4 mL of Nutrient Soft Agar (NSA with 5.7% (w/w) agar), previously melted and stabilized at 45 °C in a water-bath, were transferred into each one of the test tubes prepared previously. Following every addition of culture medium, the tubes were quickly homogenized (in a vortex) and their contents spread over a Petri dish with Nutrient Agar (NA with 1.5% (w/w) agar). Solidification of the soft agar layer was allowed to proceed for ca. 15-15 min, and the Petri dishes were incubated at room temperature for 24 to 48 hours. The several steps of this experimental procedure can be found schematically in Figure 1. Following the incubation period, the 4 culture plates corresponding to the highest phage concentrations (dilutions 10^{-1} and 10^{-2}) were selected and added with 5 mL PBS. These plates were isolated with Parafilm, so as to prevent eventual evaporations, and incubated at room temperature for ca. 3 hours.

The soft agar layers of the selected plates were fragmented with the aid of a sterile loop, and the fragments were collected together with the added PBS buffer in a sterile centrifuge tube. This mixture was centrifuged at 5500 rpm and 4 °C, to promote deposition of the agar. The supernatant was carefully transferred into a sterile 20 mL-syringe and filtered using a filter with 0.22 µm-diameter pores, into a sterile Falcon tube. This bacteriophage suspension constituted the stock-solution of phage, and was kept at 4 °C. This procedure is schematically depicted in Figure 2.

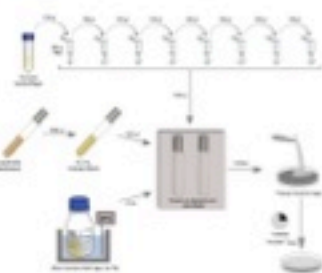


Figure 1. Schematic representation of the procedures involved in the propagation of the bacteriophage.

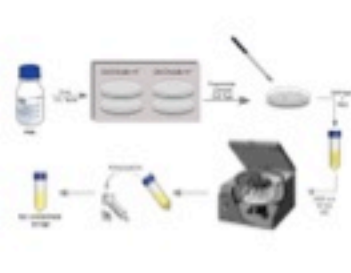


Figure 2. Preparation of the bacteriophage stock-solution.

INCORPORATION OF THE BACTERIOPHAGE WITHIN THE SELECTED (OPTIMIZED) BIOPOLYMERIC FORMULATIONS

The structural and functional stabilization of the bacteriophage within the biopolymeric matrices consisted in including the phage particles in the optimized formulations before their gelification/polymerization. Therefore, samples of the bacteriophage stock-solution were added to both polymeric formulations in a concentration of 1.0% (w/w), corresponding to approximately 1.3×10^9 PFU/mL. Independently of the formulation, the bacteriophage was added after sterilization of the polymeric solutions, so as to prevent inactivation of the phage. In the case of the agar formulation, the bacteriophage was added to the sterilized agar solution containing the antimicrobial agent, thermostabilized at 48 °C, immediately before being transferred into the molds (after being gently homogenized in a vortex). In the case of the sodium alginate formulation, the bacteriophage was equally added to the sterilized suspension of sodium alginate, calcium carbonate and antimicrobial agent, together with the recently prepared GDL solution, and gently homogenized in a vortex before being transferred into the molds. The final composition of the sodium alginate and agar formulations containing the bacteriophage, both qualitatively and quantitatively, can be found in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1. Final composition of the sodium alginate matrices with stabilized bacteriophage particles.

	% (w/w)	m (g)
Bacteriophage	1,0	~0,02 (20 µL)
Nipagin® M	0,1	0,0020
Sodium alginate	1,5	0,0300
CaCO ₃	0,225	0,0045
GDL	0,855	0,0171
Deionized water	96,32	1,9264
Total	100 %	2 g

Table 2. Final composition of the agar matrices with stabilized bacteriophage particles.

	% (w/w)	m (g)
Bacteriophage	1,0	~0,02 (20 µL)
Nipagin® M	0,1	0,0020
Agar	1,5	0,0300
Deionized water	97,4	1,9480
Total	100 %	2 g

Table 3. Experimental conditions tested for evaluating the structure of the biopolymeric matrices, bacterial growth and maintenance of viability of the stabilized bacteriophage particles.

Matrix	Temperature	Time	Viability
Agar	37 °C	24h	+
Agar	37 °C	48h	+
Agar	37 °C	72h	+
Agar	37 °C	96h	+
Agar	37 °C	120h	+
Agar	37 °C	144h	+
Agar	37 °C	168h	+
Agar	37 °C	192h	+
Agar	37 °C	216h	+
Agar	37 °C	240h	+
Agar	37 °C	264h	+
Agar	37 °C	288h	+
Agar	37 °C	312h	+
Agar	37 °C	336h	+
Agar	37 °C	360h	+
Agar	37 °C	384h	+
Agar	37 °C	408h	+
Agar	37 °C	432h	+
Agar	37 °C	456h	+
Agar	37 °C	480h	+
Agar	37 °C	504h	+
Agar	37 °C	528h	+
Agar	37 °C	552h	+
Agar	37 °C	576h	+
Agar	37 °C	600h	+
Agar	37 °C	624h	+
Agar	37 °C	648h	+
Agar	37 °C	672h	+
Agar	37 °C	696h	+
Agar	37 °C	720h	+
Agar	37 °C	744h	+
Agar	37 °C	768h	+
Agar	37 °C	792h	+
Agar	37 °C	816h	+
Agar	37 °C	840h	+
Agar	37 °C	864h	+
Agar	37 °C	888h	+
Agar	37 °C	912h	+
Agar	37 °C	936h	+
Agar	37 °C	960h	+
Agar	37 °C	984h	+
Agar	37 °C	1008h	+
Agar	37 °C	1032h	+
Agar	37 °C	1056h	+
Agar	37 °C	1080h	+
Agar	37 °C	1104h	+
Agar	37 °C	1128h	+
Agar	37 °C	1152h	+
Agar	37 °C	1176h	+
Agar	37 °C	1200h	+
Agar	37 °C	1224h	+
Agar	37 °C	1248h	+
Agar	37 °C	1272h	+
Agar	37 °C	1296h	+
Agar	37 °C	1320h	+
Agar	37 °C	1344h	+
Agar	37 °C	1368h	+
Agar	37 °C	1392h	+
Agar	37 °C	1416h	+
Agar	37 °C	1440h	+
Agar	37 °C	1464h	+
Agar	37 °C	1488h	+
Agar	37 °C	1512h	+
Agar	37 °C	1536h	+
Agar	37 °C	1560h	+
Agar	37 °C	1584h	+
Agar	37 °C	1608h	+
Agar	37 °C	1632h	+
Agar	37 °C	1656h	+
Agar	37 °C	1680h	+
Agar	37 °C	1704h	+
Agar	37 °C	1728h	+
Agar	37 °C	1752h	+
Agar	37 °C	1776h	+
Agar	37 °C	1800h	+
Agar	37 °C	1824h	+
Agar	37 °C	1848h	+
Agar	37 °C	1872h	+
Agar	37 °C	1896h	+
Agar	37 °C	1920h	+
Agar	37 °C	1944h	+
Agar	37 °C	1968h	+
Agar	37 °C	1992h	+
Agar	37 °C	2016h	+
Agar	37 °C	2040h	+
Agar	37 °C	2064h	+
Agar	37 °C	2088h	+
Agar	37 °C	2112h	+
Agar	37 °C	2136h	+
Agar	37 °C	2160h	+
Agar	37 °C	2184h	+
Agar	37 °C	2208h	+
Agar	37 °C	2232h	+
Agar	37 °C	2256h	+
Agar	37 °C	2280h	+
Agar	37 °C	2304h	+
Agar	37 °C	2328h	+
Agar	37 °C	2352h	+
Agar	37 °C	2376h	+
Agar	37 °C	2400h	+

Conclusions

The major goal of this research work was the development of suitable hydrogels to achieve the structural and functional stabilization of a bacteriophage, having used as model the bacteriophage DSM J0994 (from DSMZ) with specific lytic action against the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19680 (also from DSMZ), aiming at a potential future application at the level of bacterial detection systems. For this purpose, two biopolymeric matrices were optimized, namely based on agar and on sodium alginate, into which a suspension of said bacteriophage was incorporated. The microbiological assays performed with its specific bacterial host, demonstrated maintenance of the lytic viability of the bacteriophage particles following their immobilization within the biopolymeric matrices, which was proven by the occurrence of lysis in the microbial lawn produced at the surface of solid matrices (production of phage lysis plaques). Analysis of the hydrogels by cryo-SEM revealed the existence of a microporous structure with appropriate characteristics for the protection of the bacteriophage particles, without restricting, however, the easy access to its specific bacterial host, so as to promote its lysis. Stabilization of the phage particles can also be correlated to the change in the thermodynamical conditions of the surrounding environment of each phage particle, since the movement of the solvent molecules in their nanoneighborhood was seriously reduced by the gelification effect of the polymeric matrix. The gelification/polymerization conditions proved to be innocuous and did not interfere with the biological activity of the phage or the bacterial host, allowing the successful structural and functional stabilization of the former entity. These matrices will likely find a potential application both in the detection of a wide variety of bacterial contaminations, adopting the stabilized phage for that matter, and as controlled release systems in the therapy of superficial bacterial infections, likewise changing the thickness of the biopolymeric matrices.

(CRYO) SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSES

Hydrogel matrices were analyzed for microstructural and morphological characteristics via Cryo-SEM. Briefly, hydrogel samples were prepared for analysis as follows: (a) samples were cut into thin layers; (b) samples were mounted in an appropriate (aluminum) support inserted into a gold-coated plate; (c) the gold-coated plate was then duly fixed in a transfer stick and the support containing the sample was immersed in liquid nitrogen (ultra nitrogen); (d) the sample was then transferred under vacuum into the SEM preparation chamber (also under vacuum and maintained cold via addition of liquid nitrogen) and, once inside the chamber, the deep-frozen sample was fractured, and (f) undergoes sublimation (during 90s to 300s) by gently increasing the temperature from -140 °C to ca. -90 °C, and was sputter coated with AuPd (during 20s). Finally, the sample was transferred into the SEM chamber for microscopy analysis.

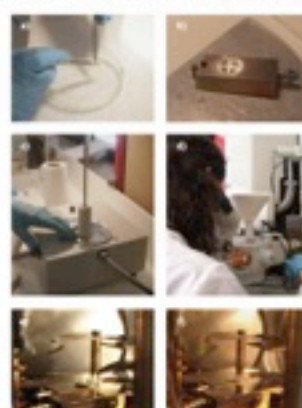


Figure 3. Preparation of hydrogel samples for cryo-SEM analysis.

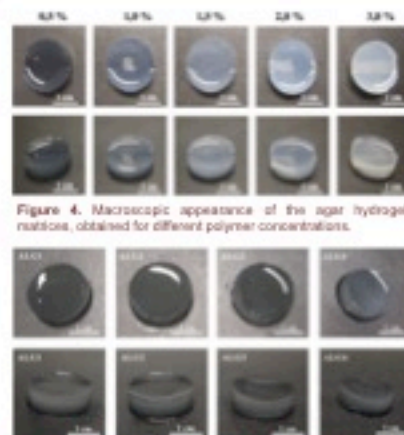


Figure 4. Macroscopic appearance of the agar hydrogel matrices, obtained for different polymer concentrations.

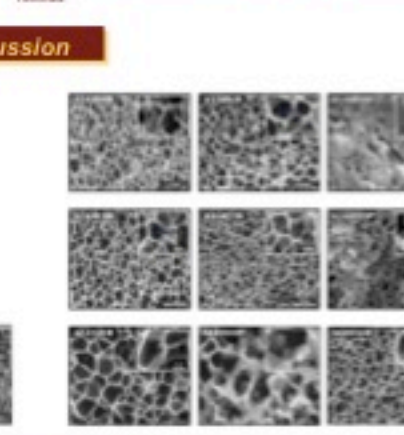


Figure 5. Macroscopic appearance of the sodium alginate hydrogel matrices, obtained through the internal gelification method.

Experimental results and discussion

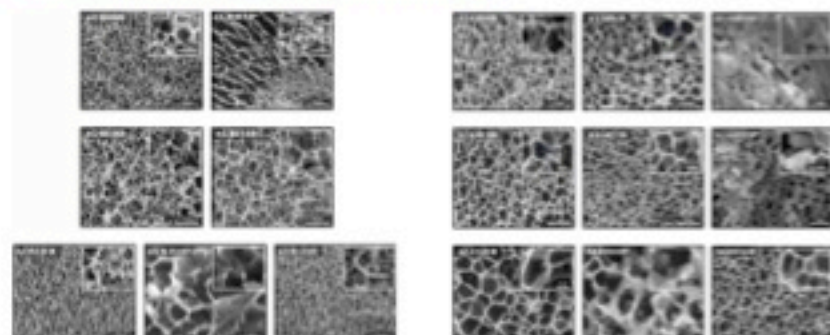


Figure 6. Cryo-scanning electron microphotographs of the agar matrices (left picture) and of the sodium alginate matrices (right picture), with various of the experimental conditions utilized in terms of addition of antimicrobial agent, incorporation of bacteriophage particles, and bacterial inoculation of the matrix surface, after deep-freezing, sublimation, freezing and sputter coating with gold/palladium.

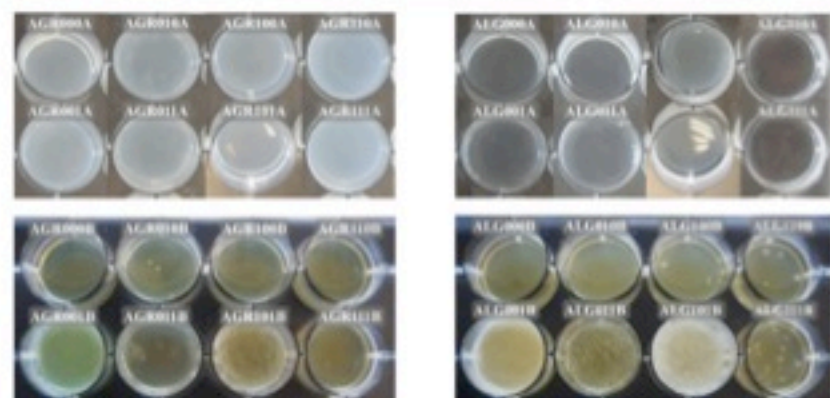


Figure 7. Macroscopic appearance of the bacterial lawn (*P. aeruginosa* DSM19680) formed over the agar hydrogel matrices, following incubation at 37 °C during 24h.

Figure 8. Macroscopic appearance of the bacterial lawn (*P. aeruginosa* DSM19680) formed over the sodium alginate hydrogel matrices, following incubation at 37 °C during 24h.