

André Filipe Oliveira Mendes de Azevedo

Desenvolvimento de um sistema terapêutico com bacteriófagos para administração por via inalatória, com recurso a nanoencapsulação, como modelo para tratamento de pneumonia bacteriana.



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa
2010

André Filipe Oliveira Mendes de Azevedo

Desenvolvimento de um sistema terapêutico com bacteriófagos para administração por via inalatória, com recurso a nanoencapsulação, como modelo para tratamento de pneumonia bacteriana.

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa
2010

Autor: André Filipe Oliveira Mendes de Azevedo

Orientador: Professor Doutor Victor M. Balcão

Co-orientador: Professora Doutora Carla Manuela Matos

Desenvolvimento de um sistema terapêutico com bacteriófagos para administração por via inalatória, com recurso a nanoencapsulação, como modelo para tratamento de pneumonia bacteriana.

O aluno

Trabalho apresentado à
Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Farmacêuticas

Resumo

A emergência de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos e a fraca penetração dos antibióticos em biofilmes bacterianos põe em ênfase a necessidade de alternativas seguras e eficazes para o tratamento antimicrobiano. A aplicação de bacteriófagos (ou fagos) estritamente líticos tem sido proposta como uma alternativa (ou complemento) aos antibióticos convencionais, permitindo a libertação dos predadores naturais das bactérias directamente no local de infecção. Provavelmente, a maior vantagem de terapias à base de fagos reside no facto dos fagos se replicarem directamente no local de infecção, tornando-se profusamente disponíveis onde são mais necessários. Quando comparados aos antibióticos, os fagos apresentam diversas vantagens relevantes: (i) concentrações permanentemente elevadas no local de infecção, aumentando na presença de bactérias (viáveis), sendo apenas eliminados após erradicação; (ii) compatibilidade total com os antibióticos; (iii) específicos contra bactérias alvo; (iv) maior penetração em biofilmes bacterianos, através da indução para produção de enzimas que hidrolizam a matriz polimérica dos biofilmes; e (v) enquanto as bactérias podem desenvolver resistência aos fagos, o isolamento e a produção em larga escala de novos fagos é bastante mais simples e económico do que desenvolver novos antibióticos. Emulsões água em óleo em água (A/O/A) são exemplos de emulsões em que pequenas gotas de água se encontram dispersas em partículas maiores de óleo que por sua vez se encontram dispersas numa fase aquosa contínua. Devido à sua estrutura interna compartimentalizada, estas emulsões apresentam vantagens para encapsulação em relação a emulsões simples O/A, como a capacidade para transportar moléculas tanto polar como não polar, e permitem um melhor controlo na libertação de moléculas terapêuticas. Neste trabalho de pesquisa, foi investigado o potencial do encapsulamento de um fago (ϕ -PVP-SE1) de espectro alargado capaz de infectar *Salmonella* e *E. coli*. A caracterização físico-química da formulação encapsuladora dos fagos incluiu a determinação do tamanho de partícula, distribuição de partícula e carga das partículas através da análise do Potencial Zeta, morfologia de superfície via SEM, eficiência de encapsulação e análise térmica via DSC. A actividade antimicrobiana das nanoemulsões produzidas foi também testada *in vitro*.

Abstract

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains and the weak penetration of antibiotics in bacterial biofilms put an emphasis in the need for safe and effective alternatives for antimicrobial treatments. The application of strictly lytic bacteriophages (or phages) has been proposed as an alternative (or complement) to conventional antibiotics, allowing release of the natural predators of bacteria directly to the site of infection. Probably, the major advantage of phage-based therapy lies in the fact that phages replicate directly in the site of infection, becoming profusely available where they are most needed. When compared to antibiotics, phages present many relevant advantages: (i) permanently high concentrations at the infection site, increasing in the presence of (viable) bacterial host, with elimination occurring only after eradication of the later; (ii) total compatibility with antibiotics; (iii) specificity against target-bacteria; (iv) higher penetration in bacterial biofilms, by inducing production of enzymes that hydrolyze biofilm polymeric matrix; and (v) while bacteria can develop resistance to phages, isolation and large-scale production of new lytic phages is much simpler and economical than developing a new antibiotic. Water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions are examples of emulsions, in which dispersions of small water droplets within larger oil particles are themselves dispersed in a continuous aqueous phase. Due to their compartmentalized internal structure, this emulsions present advantages over simple O/W emulsions for encapsulation, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a better control over releasing of therapeutic molecules. In the present research work, the potential of encapsulating a broad lytic spectrum phage (ϕ -PVP-SE1) able to infect enteric *Salmonella* and *E. coli* has been investigated. Physicochemical characterization of the optimized phage-encasing particle formulations encompassed determination of particle size, size distribution and particle charge, via Zeta potential analysis, surface morphology via SEM, encapsulation efficiency, and thermal analysis via DSC. The antimicrobial activity of the emulsions produced was also assessed *in vitro*.

Agradecimentos

Este trabalho monográfico dita o fim deste meu percurso académico. Gostaria então de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e incentivaram.

Ao meu orientador Professor Doutor Victor Balcão pela orientação e incentivo constante e incansável, pela disponibilidade que sempre demonstrou e por todo o conhecimento que disponibilizou.

À Professora Doutora Carla Manuela Matos e Professora Doutora Carla Moutinho pela disponibilidade e aconselhamento.

À Doutora Joana Azeredo do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia da Universidade do Minho pela disponibilização dos fagos utilizados e pelas análises antimicrobianas realizadas.

À Eng^a Madalena Vieira do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia da Universidade do Minho pela disponibilização dos aparelhos de medição do Potencial Zeta e tamanho de partícula e de análise de Calorimetria Diferencial de varrimento.

Ao Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pela disponibilização do Microscópio Electrónico Criogénico de Varrimento.

Ao Luis Miguel Castro pelo companheirismo e amizade demonstrado dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais por todo o apoio que demonstraram ao longo deste percurso académico.

À minha esposa Alexandra por todo o apoio e paciência ao longo deste percurso académico.

Índice

Resumo	5
Abstract	6
Agradecimentos	7
I - Hipótese	12
II - Objectivos	13
III - Introdução	14
1 - Pneumonia de origem bacteriana	14
i - Definição	14
ii - Fisiopatologia	15
iii - Sintomatologia	16
iv - Pneumonia adquirida na comunidade	16
v - Pneumonia adquirida em ambiente hospitalar	17
3 - Bacteriófagos	18
i - A descoberta dos bacteriófagos	18
ii - Classificação dos bacteriófagos	19
iii - Ciclo(s) de replicação fágico	21
iv - Mecanismo(s) de resistência bacteriana aos fagos	24
v - Mecanismos de sobrevivência dos fagos	25
vi - Limitações da utilização de fagos como agentes antimicrobianos	26
vii - Terapia fágica	27
4 - Aerossóis	29
i - Terapia de aerossol	29
ii - Factores limitantes	30
iii - Características físico - químicas	31

iv - Características do paciente	31
v - Sistemas de administração por aerossol	32
5 - Emulsões múltiplas	35
i - Estabilidade	36
ii - Formação da emulsão	37
IV - Materiais e métodos	39
1 - Bacteriófago	39
i - Preparação e purificação do fago	39
2 - Reagentes	40
3 - Equipamento analítico	40
4 - Preparação da emulsão encapsuladora do fago	41
5 - Avaliação dos efeitos do tempo de homogeneização, concentração do bacteriófago e força iónica da fase aquosa externa, para optimização da formulação	41
6 - Determinação do tamanho hidrodinâmico e Potencial Zeta	42
7 - Análise termal por calorimetria de varrimento diferencial	43
8 - Actividade antimicrobiana dos bacteriófagos e das emulsões	43
9 - Análise ao microscópio de varrimento electrónico criogénico	43
V - Resultados e discussão	45
1 - Microscopia electrónica de varrimento	45
2 - Optimização da formulação	46
3 - Tamanho hidrodinâmico e Potencial Zeta	47
4 - Actividade antimicrobiana	49
5 - Análise calorimétrica	49
6 - Nebulização	50

VI - Conclusão	51
Bibliografia	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação dos bacteriófagos.....	20
Figura 2 - Microfotografia de varrimento electrónico de um bacteriófago.....	21
Figura 3 - Mecanismo de adsorção do fago e injeção do ácido nucleico.....	22
Figura 4 - Ciclos Líticos e Lisogénicos de replicação fágica.....	23
Figura 5 - Inaladores pressurizados.....	33
Figura 6 - Inalador de pó seco.....	33
Figura 7 - Nebulizador de jacto de ar com compressor.....	34
Figura 8 - Imagem demonstrativa das diferentes fases de uma emulsão	36
Figura 9 - Fases de desestabilização de uma emulsão.....	37
Figura 10 - Microfotografia de microscopia electrónica da preparação fágica.....	40
Figura 11 - Partícula rodeada pelas diferentes camadas iónicas.....	42
Figura 12 - Microscópio electrónico de varrimento com câmara criogénica.....	44
Figura 13 - Microfotografia da estrutura da emulsão	45
Figura 14 - Microfotografia das nanovesículas lipídicas.....	46
Figura 15 - Evolução do tamanho hidrodinâmico das partículas.....	48
Figura 16 - Evolução do Potencial Zeta das partículas.....	48
Figura 17 - Termogramas.....	50

Lista de tabelas

Tabela 1 - Optimização do processo de produção das emulsões.....	47
--	----

I - Hipótese

A pneumonia bacteriana é uma infecção ou inflamação localizada nos pulmões, sendo causada por bactérias. A causa mais comum de pneumonia bacteriana em seres humanos adultos é uma bactéria chamada *Streptococcus pneumoniae*, podendo ser fatal. A emergência de estirpes bacterianas resistentes e a fraca penetração dos antibióticos em biofilmes bacterianos elevam a necessidade de opções seguras e eficazes de tratamento antimicrobiano. A aplicação de bacteriófagos (ou fagos) tem sido proposta como alternativa (ou complemento) aos antibióticos químicos convencionais, permitindo a libertação dos predadores naturais das bactérias directamente sobre tais biofilmes.

Emulsões lipídicas encapsulantes de fagos poderiam ser usadas como formas de veicular bacteriófagos estabilizando-os e protegendo-os do ataque do sistema imunitário, permitindo assim a sua nebulização. Assim os fagos seriam depositados directamente sobre a zona de infecção, eliminando as bactéria patogénicas.

II - Objectivos

Neste projecto de trabalho de conclusão de curso, pretende-se desenvolver um processo para a administração por via inalatória de um cocktail de fagos (sem endotoxinas), recorrendo a estratégias de encapsulação como formas de protecção dos fagos contra o sistema imunitário, para situações de infecção pulmonar. Como proof of concept para a nanoencapsulação, será utilizado no desenvolvimento experimental um cocktail de bacteriófagos líticos utilizado em desinfecção de alimentos. Assim, o cocktail fágico será encapsulado no interior de partículas, sendo estas depois suspensas numa solução isotónica à temperatura ambiente, com o objectivo de testar a viabilidade de administração por nebulização / aerosolização, como estratégia alternativa para o tratamento de infecções respiratórias por estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais.

III - Introdução

1 - Pneumonia de origem bacteriana

i - Definição

A pneumonia pode ser descrita como uma infecção nos pulmões, afectando os alvéolos pulmonares e tecidos circundantes e que pode ser causada por vários microorganismos. Milhões de pessoas em todo o mundo são afectadas por este tipo de infecção, sendo esta a sexta causa mais frequente de morte e a infecção (com desfecho mortal) mais adquirida nos hospitais. Nos países em vias de desenvolvimento, a pneumonia é a segunda causa de morte logo a seguir à desidratação causada por diarreia aguda (Manual Merck, 2008).

Durante a última década, os pacientes hospitalares têm vindo a ser frequentemente diagnosticados com infecções por bactérias patogénicas multiresistentes aos antibióticos químicos (MDR - Multi-Drug Resistant), associadas a pneumonias adquiridas no ambiente hospitalar. Os principais factores responsáveis por este fenómeno incluem a utilização indevida de potentes antibióticos de administração oral, transferências prematuras dos pacientes do hospital para as suas residências, condições higiénicas deficientes, o envelhecimento generalizado da população como consequência do aumento da esperança média de vida, e terapias imunomoduladoras administradas extensivamente. O potencial envolvimento de tais agentes patogénicos MDR levou a uma revisão do sistema de classificação no qual a infecção pulmonar é caracterizada, sendo que este tipo de infecção passou a ser caracterizada como pneumonia adquirida na comunidade, ou pneumonia adquirida em ambiente hospitalar (nosocomial), e em que esta última se subdivide em pneumonia não associada a ventiladores e pneumonia associada a ventiladores. Este novo sistema de classificação da pneumonia tem sido uma mais valia no desenvolvimento empírico de estratégias de antibioterapia, contudo não isento de desvantagens. Por exemplo, nem todos os agentes patogénicos MDR estão associados a todos os factores de risco, pelo que este sistema de classificação representa a divisão de factores multirisco, e assim cada paciente deve ser considerado individualmente. Um paciente acamado, em estado vegetativo, que

necessita de alimentação assistida, tem um maior risco de apanhar pneumonia do que um paciente hospitalizado mas que se consiga alimentar e mover sozinho.

ii - Fisiopatologia

A pneumonia resulta da proliferação de microorganismos patogénicos a nível alvéolar e da resposta do hospedeiro a estes mesmos agentes patogénicos. Os microorganismos conseguem acesso ao tracto respiratório inferior de várias formas. Uma delas, e a mais comum, é a inalação de gotículas contaminadas, ocorrendo mais frequentemente durante o sono, principalmente nas pessoas idosas e em pacientes com níveis diminuídos de consciência. Uma outra forma de infecção pulmonar que resulta em pneumonia pode dar-se através da corrente sanguínea ou de migração até aos pulmões, directamente a partir de uma infecção vizinha, sendo que estas duas últimas formas raramente ocorrem.

Os factores mecânicos de protecção do hospedeiro, tais como os pêlos e os cornetos nasais, são de grande importância na protecção contra infecções respiratórias. Estes mecanismos conseguem reter partículas relativamente grandes, com mais de 10 µm de diâmetro, antes de estas atingirem o tracto respiratório inferior.

O ar inspirado é sujeito a turbulência nas passagens nasais e depois a mudanças de direcção abruptas à medida que passa através da faringe e se espalha pelas ramificações da árvore traqueobronquial.

As partículas de menor tamanho são retidas na árvore traqueobronquial, onde os agentes patogénicos são eliminados pelo movimento ciliar e pelos factores antibacterianos locais presentes no muco. O mecanismo ou reflexo de tosse oferece protecção contra a inalação destes microorganismos, e a adicionar a este mecanismo de defesa existe ainda a flora comensal aderida à mucosa da orofaringe que não permite a adesão de bactérias patogénicas, diminuindo assim grandemente o risco de pneumonia.

Quando tais microorganismos são suficientemente pequenos para atingir os alvéolos pulmonares, os macrófagos são extremamente eficientes na sua destruição, sendo estes últimos ainda assistidos por proteínas opsonizantes (proteínas que se ligam a partículas e células para aumentar a susceptibilidade à fagocitose). Se os agentes patogénicos não forem destruídos pelos macrófagos, são eliminados via movimento

mucociliar ou linfático. Apenas quando a capacidade dos macrófagos alveolares para fagocitar e destruir os microorganismos não é suficiente é que se manifesta a pneumonia.

iii - Sintomatologia

A tosse produtiva é um dos sintomas da pneumonia, sendo causada por um aumento de secreções purulentas. Estas secreções devem-se às quimiocinas que estimulam os neutrófilos (chamando-os ao local da infecção, neste caso os alvéolos pulmonares) a produzir leucocitose periférica com consequente aumento de secreções purulentas. A febre, sintoma normalmente presente nas respostas infecciosas, deve-se à libertação de mediadores da inflamação, como por exemplo a interleucina 1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral (TNF). Os mediadores da inflamação libertados pelos macrófagos, associados ao recrutamento de neutrófilos, criam um vazamento nos capilares alveolares resultando na libertação de fluídos para os alvéolos com consequente hipoxemia e alcalose, levando ao desenvolvimento de dispneia.

iv - Pneumonia adquirida na comunidade

A maior parte dos pacientes que adquirem pneumonia na comunidade têm idade superior a 50 anos e apresentam doenças crónicas tais como doença pulmonar obstrutiva crónica, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, diabetes, alcoolismo, imunossupressão e infecção por VIH.

Existe uma extensa lista de potenciais agentes etiológicos na pneumonia adquirida na comunidade (PAC) que inclui bactérias, vírus, fungos e protozoários. Hantavirus, metapneumovirus, coronavirus e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), são agentes patogénicos recentemente identificados como responsáveis neste tipo de infecção. Apesar do *Streptococcus pneumoniae* ser o agente etiológico mais comum da PAC, outros microorganismos têm de ser considerados por forma a diminuir tanto os factores de risco do paciente como a severidade da doença. As bactérias que mais tipicamente provocam pneumonia são *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* e bacilos gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae* e

Pseudomonas aeruginosa. Microorganismos atípicos incluem *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella* spp., e vírus tais como o vírus da Influenza, adenovírus e vírus sincicial respiratório (RSV). A frequência e importância de agentes patogênicos atípicos como *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* em pacientes fora do ambiente hospitalar e *Legionella* em pacientes hospitalizados, tem implicações importantes na terapia anti-pneumônica, uma vez que tais microorganismos são intrinsecamente resistentes a antibióticos β -lactâmicos e devem por isso ser tratados com macrólidos, fluorquinolonas ou tetraciclinas. A pneumonia causada por *S. aureus* é bem conhecida devido às complicações que provoca durante a infecção pelo vírus da Influenza. Contudo, recentemente, estirpes MRSA têm sido reportadas como sendo a causa primária de PAC (Lobo et al., 2010). A propagação de estirpes MRSA do ambiente hospitalar para a comunidade levou ao aparecimento de estirpes MRSA geneticamente distintas das primeiras e capazes de infectar indivíduos completamente saudáveis (Nakou et al., 2009).

v - Pneumonia adquirida em ambiente hospitalar

A pneumonia adquirida em contexto hospitalar está associada a uma elevada mortalidade (De Cock et al., 2009), e pode ser subdividida em pneumonia associada a ventiladores (PAV) e pneumonia não associada a ventiladores (PNAV).

Embora menos estudada que a PAV, a pneumonia adquirida em ambiente hospitalar em doentes não entubados (PNAV) é semelhante à PAV. A grande diferença está na maior frequência de agentes patogênicos não MDR e numa resposta imunitária mais eficaz por parte do hospedeiro, no caso da PNAV. Neste último caso, a baixa frequência de agentes patogênicos MDR permite, na maior parte das vezes, manter uma monoterapia ao contrário do que acontece no caso da PAV.

O diagnóstico em pacientes com PNAV é mais difícil do que em pacientes com PAV, muito devido à dificuldade em obter amostras do tracto respiratório inferior em indivíduos não entubados. Contudo, a melhor resposta imune em pacientes com PNAV, devido à baixa incidência de agentes patogênicos MDR, resulta numa mortalidade inferior à dos pacientes com PAV que tem associada uma elevada incidência de agentes

patogênicos MDR. Adicionalmente, o risco de insucesso da antibioterapia é mais alto em pacientes com PAV (De Cock et al., 2009).

Os agentes patogênicos mais comumente isolados em casos de PAV são *S. aureus* e bacilos Gram negativo tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter spp* (Chastre et al., 2002). No caso da PNAV é mais normal encontrar agentes patogênicos anaeróbios.

3 - Bacteriófagos

i - A descoberta dos bacteriófagos

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam única e exclusivamente bactérias. A história da descoberta dos bacteriófagos tem sido sujeita a longos debates pela comunidade científica, incluindo a controvérsia sobre quem realmente os descobriu. Ernest Hankin, um bacteriologista britânico, relatou em 1886 uma elevada actividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* nos rios Ganges e Jumna, na Índia. Hankin sugeriu que uma substância não identificada seria responsável por este fenómeno, limitando o avançar das epidemias de cólera. Dois anos mais tarde, o bacteriologista Russo Gamaleya observou um fenómeno similar enquanto trabalhava com *Bacillus subtilis*. Contudo, nenhum destes investigadores explorou estas descobertas. Só quase 20 anos após a observação de Hankin é que Frederick Twort, um bacteriologista Inglês, relatou um fenómeno idêntico ao de Hankin e avançou com a hipótese de que o mesmo poderia ser devido a um vírus. Em 1917, Felix d'Herelle, um microbiólogo Canadano, descobriu oficialmente os bacteriófagos (Sulakvelidze et al., 2001). Desde que se descobriu que estes vírus estritamente bacterianos destroem os seus hospedeiros enquanto se mantêm inócuos para os seres humanos, tem sido o sonho dos investigadores utilizá-los para tratar infecções bacterianas.

Utilizando técnicas experimentais comuns na época, Félix d'Herelle demonstrou a segurança na utilização de fagos como tratamento antibacteriano, ingerindo ele próprio uma preparação fágica para *Shigella dysenteriae*. Esta preparação fágica foi então posteriormente administrada em doentes com disenteria, conseguindo curá-los

com sucesso. Rapidamente, outros investigadores começaram a utilizar fagos para outros tratamentos, como por exemplo infecções cutâneas por *Staphylococcus*.

A comercialização de preparações fágicas terapêuticas para tratamento de infecções bacterianas em seres humanos iniciou-se em França por d'Herelle e nos Estados Unidos nos anos 40 pela empresa farmacêutica Eli Lilly. Contudo, devido aos resultados controversos e à promessa dos antibióticos químicos nos anos 40, o interesse nos fagos arrefeceu substancialmente.

Recentemente, o interesse pela terapia fágica como forma de controlar infecções bacterianas foi renovada, e isto deveu-se essencialmente à urgência em ultrapassar a emergência de resistências que muitas bactérias apresentam aos antibióticos químicos. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% de toda a mortalidade causada por infecções bacterianas deveu-se a bactérias multi-resistentes aos antibióticos.

ii - Classificação dos bacteriófagos

Actualmente, a classificação utilizada é a descrita por Ackerman e colaboradores (1992), tendo em conta a morfologia dos fagos e o tipo de ácido nucleico que contêm (ver Figura 1).

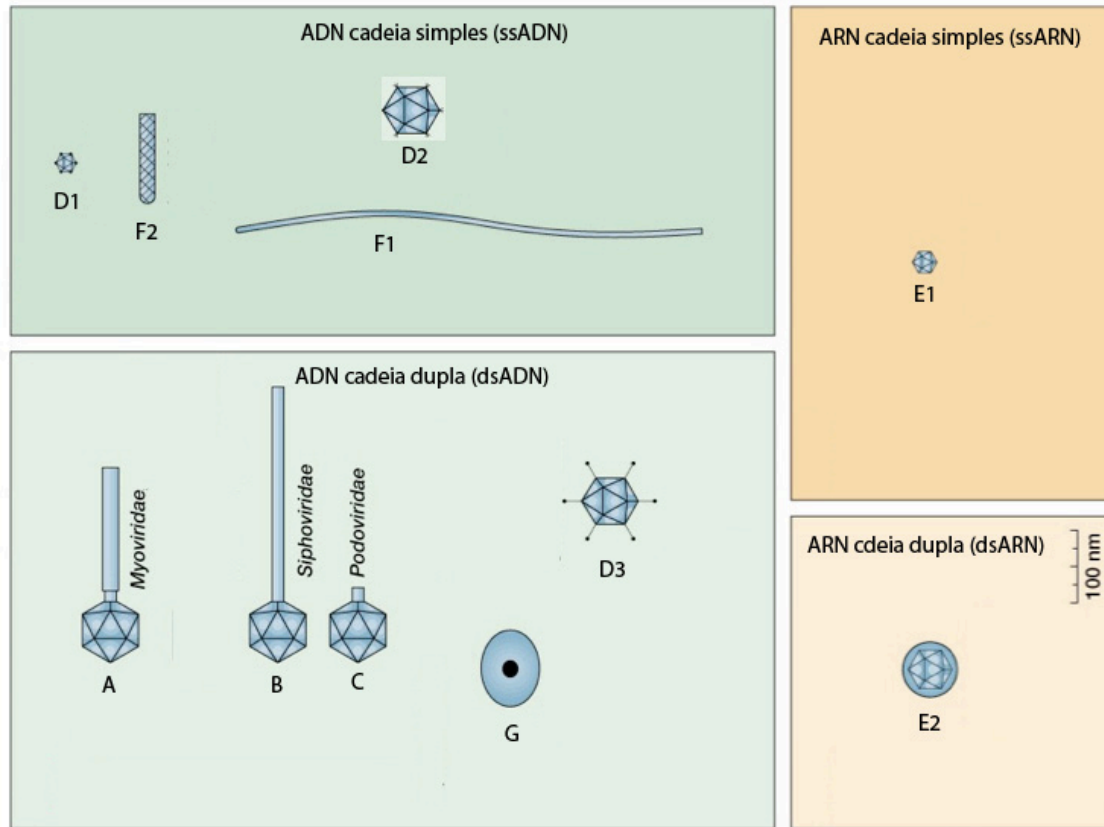


Figura 1 - Classificação dos bacteriófagos segundo a morfologia e tipo de ácido nucleico (fonte: http://www.snow.edu/kevins/Biol_2200_files/Prescott17_Viruses.pdf).

De acordo com o sistema de classificação de Ackerman et al. (1992), os fagos encontram-se divididos em 6 grupos com base na morfologia e tipo de ácido nucleico. Os fagos podem possuir genoma de ADN, de cadeia simples (ssADN) ou cadeia dupla (dsADN), ou ARN, de cadeia simples (aaARN) ou cadeia dupla (dsARN).

Os fagos dsADN podem possuir cauda contrátil (A), não contrátil (B) e cauda curta (C). Podem ainda ser fagos sem cauda (D3) e pleomórficos protegidos por um invólucro lipídico (G).

Os fagos incluídos nos grupos D1, D2, F1 e F2, apesar de apresentarem genoma de ADN em cadeia simples são bastante diferentes, os do grupo D (D1 e D2) são icosaédricos enquanto que os do grupo F (F1 e F2) são filamentosos.

Os fagos do grupo E são icosaédricos com ARN em cadeia simples (E1) ou dupla (E2).

Cerca de 96% de todos os fagos estudados até hoje possuem cauda e encontram-se divididos em 3 grandes famílias. Cerca de 60% apresenta cauda longa não contrátil

pertencendo à família Siphoviridae, 25% apresenta uma cauda contráctil pertencendo à família Myoviridae e os que possuem uma cauda curta não contráctil pertencem à família Podoviridae.

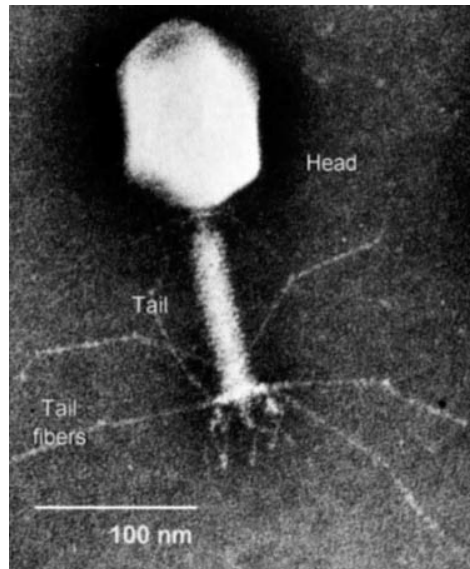


Figura 2 - Microfotografia de varrimento electrónico de um bacteriófago, para fins de estrutura e orientação geral (fonte: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Keogh/bacteriophage2.jpg>).

iii - Ciclo(s) de replicação fágica

Os fagos não têm metabolismo próprio, sendo por isso parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando de uma célula hospedeira para se replicarem.

O ciclo de replicação fágica inclui várias etapas sequenciais, nomeadamente a adesão do fago à célula permissiva (hospedeira), a injeção do ácido nucleico do fago na célula bacteriana hospedeira, a expressão e replicação do ácido nucleico no citoplasma da célula hospedeira, a formação de novas partículas fágicas e a libertação dos novos viriões fágicos recentemente formados.

Os bacteriófagos reconhecem os hospedeiros através de proteínas presentes nas suas cápsides, que se ligam a receptores (normalmente proteínas ou carboidratos) específicos presentes na parede celular das bactérias permissivas. Os viriões, que têm de

penetrar a parede celular, estão equipados com caudas contrácteis que injectam o ácido nucleico através da parede celular da bactéria hospedeira (ver Figura 3).

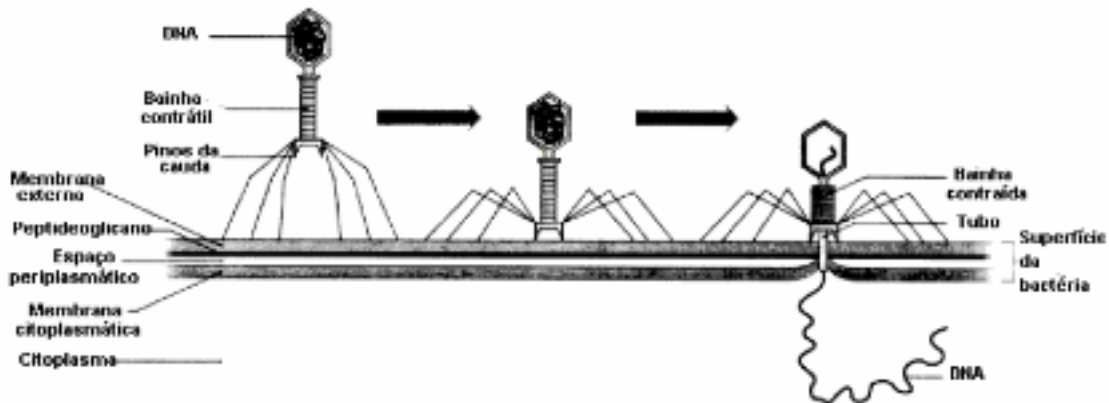


Figura 3 - Mecanismo de adsorção do fago e injeção do ácido nucleico (Pelczar et al., 1993).

Após a penetração da parede celular bacteriana e injeção do ácido nucleico no citoplasma da bactéria, dependendo do tipo de fago, ou este se reproduz imediatamente e destrói a célula hospedeira em ciclos de replicação de 30 minutos, sendo este denominado fago lítico, ou se reproduz mais tarde integrando o seu ácido nucleico no genoma da bactéria hospedeira (tornando a bactéria ainda mais virulenta), sendo este denominado fago lisogénico. Alguns fagos replicam-se apenas pelo ciclo lítico, outro utilizam os dois ciclos para se replicarem (ver Figura 4).

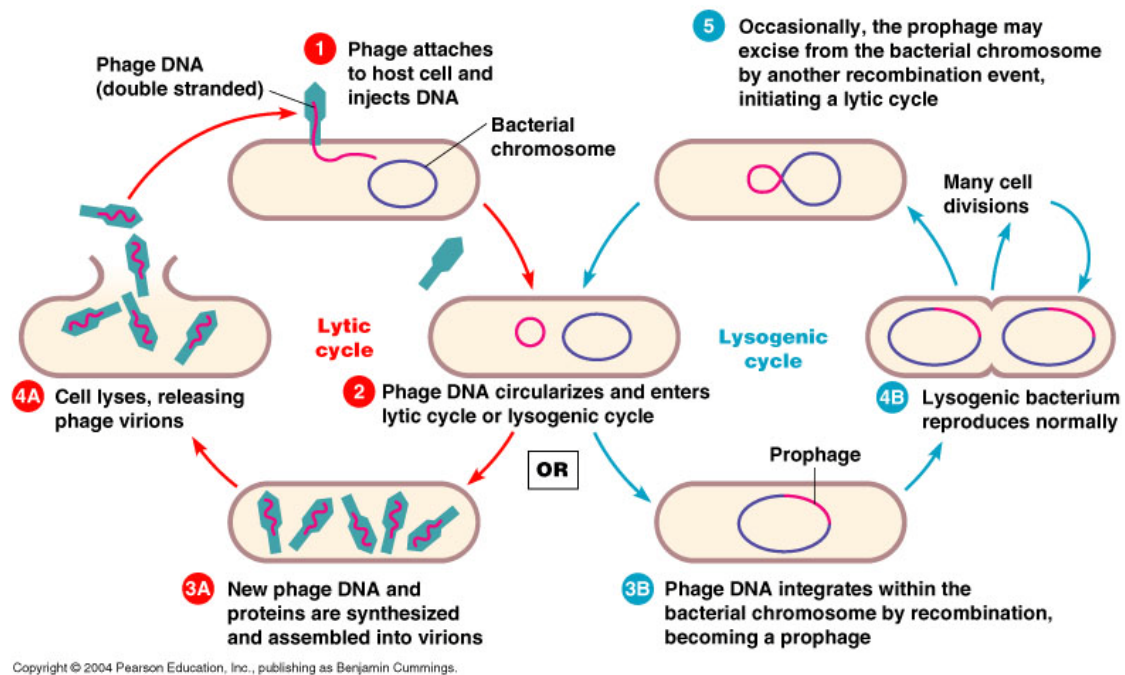


Figura 4 - Ciclos lítico e lisogénico de replicação dos fagos (fonte: <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/img012.jpg>).

Ciclo lítico

Um fago que apenas se reproduz segundo o ciclo lítico é denominado de virulento. Uma vez que o fago injecta o seu ácido nucleico na célula bacteriana hospedeira, esse ácido nucleico apodera-se da maquinaria de síntese da célula. Este processo inclui duas etapas:

i) O genoma viral contém uma sequência promotora que atrai a ARN-polimerase do hospedeiro. Numa fase inicial, os genes virais adjacentes a este promotor são transcritos. Estes genes normalmente codificam para proteínas que inibem a transcrição do hospedeiro, estimulam a replicação do genoma viral e estimulam a replicação tardia dos genes. Enzimas nucleases digerem o cromossoma do hospedeiro, fornecendo nucleotídeos para a síntese do genoma viral.

ii) Na fase tardia, os genes virais tardios que codificam para as proteínas da cápside viral e as que provocam a lise da parede celular, são transcritos por forma a libertar os viriões.

Esta sequência de eventos de transcrição é cuidadosamente controlada. A lise prematura da parede celular antes dos viriões estarem prontos para a libertação pararia a infecção. Todo o processo desde a adesão e infecção até à lise da bactéria hospedeira e libertação da progenia de viriões demora cerca de 30 minutos.

Raramente existe a infecção por dois fagos ao mesmo tempo. Uma vez iniciado o ciclo infeccioso, não existe tempo para uma infecção adicional e, em alguns casos, há a produção de uma proteína inicial que previne mais infecções.

Ciclo lisogénico

No entanto, nem todas as infecções fágicas resultam em lise celular bacteriana. Alguns fagos parecem simplesmente desaparecer das culturas bacterianas após a infecção, deixando a bactéria imune a ataques de outros fagos da mesma estirpe. Estas bactérias infectadas por fagos que não são líticos são chamadas de bactérias lisogénicas, e os fagos são designados por temperados.

As bactérias lisogénicas contêm um fago inactivo, denominado profago, integrado nos seus genomas, que pode manter-se inactivo durante várias divisões celulares. Contudo, uma bactéria lisogénica pode ser induzida a activar este profago, normalmente devido a algum tipo de stress. Esta activação resulta num ciclo lítico em que o profago deixa o genoma do hospedeiro e se replica.

Esta capacidade de saltar entre ciclos lisogénico e lítico é de grande utilidade para o fago, uma vez que optimiza a produção fágica. Quando a célula hospedeira se replica rapidamente o fago mantém-se lisogénico, mas quando a célula hospedeira se encontra sob stress ou está danificada o profago é libertado do seu estado inactivo e o ciclo lítico prossegue.

iv - Mecanismo(s) de resistência bacteriana aos fagos

No decurso da sua evolução, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência aos fagos que, por sua vez, desenvolveram formas de ultrapassar estes mecanismos.

A multiplicação fágica depende da adesão do fago à parede celular bacteriana, da injeção do seu material genético para o citoplasma bacteriano e sua replicação, transcrição e síntese proteicas.

A adsorção pode ser bloqueada por alteração dos receptores virais ou pelo seu revestimento com camadas mucilaginosas. Se a adsorção for bem sucedida, a infecção pelo genoma fágico pode ainda ser bloqueada. Após a entrada do genoma fágico no citoplasma bacteriano, endonucleases do sistema de restrição e modificação vão entrar em acção hidrolizando-o. Isto pode ser levado a cabo através de duas actividades enzimáticas: i) através da restrição do ADN fágico por uma endonuclease de restrição citoplasmática, e ii) através da metilação do ADN bacteriano por uma metilase, protegendo-o contra a acção da própria endonuclease de restrição (Duckworth et al., 1981).

v - Mecanismos de sobrevivência dos fagos

Como foi referido anteriormente, um dos mecanismos de resistência das bactérias aos fagos consiste na destruição do ADN fágico por endonucleases de restrição. Contudo, estes mecanismos de resistência são frágeis, uma vez que as moléculas de ADN fágico podem escapar à acção das endonucleases, podendo ser metiladas e tornar-se resistentes à acção destas enzimas. No decurso da sua evolução, os fagos desenvolveram estratégias que lhes permitem resistir à acção dos sistemas de restrição e modificação diminuindo os locais de restrição do seu genoma, utilizando nucleotídeos com bases modificadas e/ou invulgares, sintetizando metilases de ADN e co-factores que inibem a actividade das endonucleases de restrição das bactérias.

Sem a presença de células hospedeiras os fagos não conseguem sobreviver, pelo que alguns fagos desenvolveram estratégias alternativas aos ciclos normais de replicação, tais como os ciclos “live-and-let-live”, ou mutaram alterando as proteínas da cápside permitindo assim a ligação a novos receptores à superfície das paredes celulares das bactérias.

A presença de um fago temperado leva à síntese de um repressor lisogénico, tornando a bactéria lisogénica imune à infecção por fagos do mesmo grupo. A presença de um profago leva ainda à síntese de moléculas que alteram as proteínas de superfície

da parede celular bacteriana tornando-as resistentes à injeção dos genomas fágicos. Através de mecanismos denominados de “infecção abortiva”, que actuam no início das primeiras etapas de replicação, fagos temperados e plasmídeos residentes podem inibir a multiplicação de fagos super-infectantes, conseguindo manter assim uma concentração bacteriana constante e suficiente para o desenvolvimento fágico (mecanismo “live-and-let-live”).

vi - Limitações da utilização de fagos como agentes antimicrobianos

Apesar de todas as propriedades inerentes aos fagos líticos parecerem favorecer o seu uso clínico, estes ainda não são uma alternativa completamente estabelecida aos antibióticos devido a diversos factores. Destes, o insucesso no estabelecimento de provas rigorosas da eficácia da utilização de fagos em terapêutica antimicrobiana é um dos factores mais importantes que interferiu na valorização e disseminação generalizada da terapia fágica. Isto, porque não foram realizados estudos controlados com placebos. Felix d’Herelle realizou vários estudos clínicos com fagos sem incluir um grupo de pacientes placebo, utilizando nos seus estudos apenas pessoas com infecções de natureza bacteriana. Falhas semelhantes eram comuns durante a história inicial da terapia fágica, e como tal os resultados obtidos eram controversos.

Devido à elevada especificidade dos fagos para um determinado hospedeiro bacteriano, muitos dos resultados negativos que se obtêm podem ser devidos a falhas na selecção de fagos estritamente líticos específicos para a bactéria alvo. Este problema pode ser facilmente ultrapassado (i) determinando a susceptibilidade dos agentes etiológicos da infecção antes de se aplicar a terapia fágica (Perepanova et al., 1995), ou (ii) usando um cocktail fágico que lise a maioria das estirpes do agente etiológico (Chernomordik, 1989).

Segundo alguns investigadores (Merril et al., 1996), a clearance dos fagos do paciente pelo sistema reticuloendotelial pode ser um potencial problema porque pode diminuir o número de fagos para um nível que não é suficiente para combater a bactéria causadora da infecção. Para resolver este problema os investigadores usaram uma estratégia de selecção natural, para seleccionar fagos com maior capacidade para se manterem na corrente sanguínea de ratos conseguindo assim elucidar os mecanismos

responsáveis por esta propriedade dos fagos, o que contribuiu para melhor se perceberem os mecanismos de interação entre fagos e bactérias.

O desenvolvimento de anticorpos pelo paciente, após a administração repetida de fagos, é outro possível problema que pode impedir a eficácia dos fagos na lise da(s) bactéria(s) alvo, tendo sido bem documentado por alguns investigadores (Kucharwicz-Krukowska et al., 1987). Em teoria, o desenvolvimento de anticorpos não deveria ser um obstáculo durante o tratamento inicial de infecções bacterianas agudas, pois a cinética da acção dos fagos é bem mais rápida do que a capacidade do hospedeiro humano em produzir anticorpos.

Os tratamentos fágicos iniciais utilizavam preparações de fagos pouco purificadas, contaminadas com lisados bacterianos incluindo endotoxinas, que poderiam ter contrariado o efeito dos fagos. A purificação destas preparações fágicas pode ser conseguida através de cromatografia de troca iónica, ultracentrifugação com cloreto de céσιο e outras técnicas modernas de purificação proteica (Bogovazova et al., 1992).

Uma outra preocupação relacionada com o uso terapêutico de fagos estritamente líticos prende-se com a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana aos fagos. A resistência bacteriana aos fagos vai desenvolver-se sem qualquer sombra de dúvida mas, segundo alguns investigadores (Carlton, 1999), a taxa de desenvolvimento de resistência aos fagos é dez vezes inferior à taxa de desenvolvimento de resistência aos antibióticos químicos convencionais. Mais importante, quando ocorre uma determinada resistência a um fago, deve ser possível isolar rapidamente um novo fago activo e estritamente lítico contra a bactéria alvo resistente.

Adicionalmente, não é claro como é que determinados fagos conseguiriam eliminar infecções causadas por agentes patogénicos intracelulares, em que as bactérias se replicam no interior das células humanas estando por isso inacessíveis aos fagos (Carlton, 1999).

vii - Terapia fágica

A emergência de estirpes bacterianas resistentes e a fraca penetração dos antibióticos em biofilmes bacterianos elevam a necessidade de opções seguras e eficazes de tratamento antimicrobiano. A utilização de bacteriófagos estritamente líticos

tem sido proposta como alternativa ou complemento aos antibióticos químicos convencionais, permitindo a libertação dos predadores naturais das bactérias directamente sobre estas.

Uma das grandes vantagens da antibioterapia com fagos relativamente aos antibióticos químicos convencionais reside no facto dos primeiros se replicarem directamente no local da infecção, ficando disponíveis em abundância onde são mais necessários. Quando comparados com os antibióticos, os fagos apresentam outras vantagens relevantes: (i) forte permeabilidade tecidual; (ii) concentração permanentemente elevada no foco da infecção, aumentando continuamente na presença do hospedeiro bacteriano; (iii) a sua eliminação do foco da infecção ocorre apenas após erradicação da bactéria hospedeira; (iv) são totalmente compatíveis com os antibióticos; (v) são extremamente específicos contra a bactéria-alvo; (vi) apresentam uma capacidade superior de penetração nos biofilmes bacterianos, induzindo a produção de enzimas que hidrolizam a matriz polimérica do biofilme; (vii) a fagoterapia de infecções bacterianas localizadas é altamente eficaz; (viii) embora as bactérias possam desenvolver resistência aos fagos, o processo de isolar novos fagos líticos é muito mais simples e económico do que desenvolver um novo antibiótico; e (ix) a fagoterapia é significativamente mais económica do que a terapia antibiótica, tanto no desenvolvimento como na produção em larga escala (Sulakvelidze et al., 2001).

Há um variado número de meios pelos quais podemos distinguir as terapias fágicas. Primeiro, os fagos podem ser administrados topicamente, oralmente, directamente sobre os tecidos corporais ou sistemicamente. Uma segunda forma em que as terapias diferem é na forma de entrega dos fagos, com a administração de fagos livres como forma mais usual de entrega, ou então bactérias infectadas com fagos como meios de entrega dos fagos a agentes patogénicos intracelulares (Broxmeyer et al., 2002). Finalmente, a capacidade lítica natural dos fagos pode ser explorada, ou então os fagos podem ser alterados geneticamente para entregar genes não fágicos que codifiquem para a síntese de agentes antibacterianos específicos (Westwater et al., 2003).

Adicionalmente, o uso antecipado de fagos no controlo de infecções bacterianas em culturas pode prevenir a infecção de plantas e sementes. Os bacteriófagos têm sido considerados, por exemplo, para o controlo de infestações por *Salmonella* em fruta colhida (Leverentz et al., 2001). A utilização da terapia fágica que teve mais sucesso e

que já se encontra implementada na prática, tem sido no controlo de agentes patogénicos em peixes.

Directivas recentes da “Food and Drug Administration”, nos Estados Unidos, para combater a propagação de microorganismos resistentes aos antibióticos envolvem a abolição do uso profilático de fármacos antimicrobianos desenvolvidos para uso humano, em animais. Para evitar a contaminação de produtos alimentares com *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7, está a ser aconselhado o uso da terapia fágica no mercado de animais vivos. No mesmo sentido, os fagos poderiam ser usados para limpar o ambiente em aviários e unidades de processamento de plantas, reduzindo assim a probabilidade de infecção de animais.

4 - Aerossóis

i - Terapia de aerossol

Entende-se por aerossol o conjunto de um sistema coloidal em que partículas sólidas ou líquidas, de diâmetro compreendido entre 10-50 μm , se encontram dispersas num gás. É, portanto, um sistema constituído por uma fase dispersante gasosa, na qual partículas sólidas ou líquidas estão suspensas.

A terapia de aerossol refere-se à entrega de um determinado composto terapêutico no organismo através da via respiratória, numa forma aerossolisada. Apesar do tracto respiratório oferecer uma grande área de absorção, a grande maioria dos aerossóis é desenvolvida para uso tópico.

As terapias inalatórias têm sido usadas desde tempos imemoriais, e podem ter tido a sua origem nas preparações de *Datura* (planta muitas vezes confundida com a flor de Lírio) há cerca de 4000 anos na Índia. Em finais do século XVIII e durante o século XIX, os inaladores em barro eram populares para a inalação de ar conduzido através de infusões de plantas e outros ingredientes. Atomizadores e nebulizadores foram desenvolvidos em meados de 1800 em França, a pensar na indústria de perfumes e na moda de inalar água termal em SPAs (sigla abreviada para *Sanus Per Aquam* - saúde pela água). Por volta do século XX, pós combustíveis e cigarros de estramónio (da família das Solanáceas, classificada como *Datura stramonium*) eram populares para o

tratamento da asma e outras complicações pulmonares. Logo após a descoberta da utilidade da epinefrina no tratamento da asma, foram desenvolvidos nebulizadores facilmente transportáveis assim como nebulizadores de compressor. O marketing criado pela empresa Riker Laboratories, em 1956, com o lançamento de inaladores pressurizados para epinefrina, foi um marco decisivo para o desenvolvimento de moléculas com administração por via inalatória (Anderson, 2005).

A grande vantagem no uso dos aerossóis reside na entrega de elevadas concentrações de compostos terapêuticos directamente na zona alvo, com baixo risco de efeitos colaterais sistémicos. Desta forma, consegue produzir-se uma resposta terapêutica com uma dose menor de fármaco do que se este fosse administrado por via sistémica. Uma outra vantagem desta forma de administração de compostos farmacêuticos é a rapidez com que estes chegam ao local de acção intencionada. Antibióticos e bacteriófagos podem ser administrados localmente em doentes com infecções pulmonares, como no caso de pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes imunocomprometidos.

ii - Factores limitantes

A deposição do aerossol é conseguida através de três mecanismos-chave, o impacto da inércia, sedimentação e difusão. Estes três mecanismos reagem de forma diferente dependendo do agente terapêutico utilizado e do local de acção na árvore pulmonar.

O impacto da inércia é o principal mecanismo responsável pela deposição de partículas com tamanho superior a 3 μm , que atingem o tracto respiratório superior. Aerossóis cujas partículas apresentam tamanho compreendido entre 1 μm a 3 μm são sujeitos a sedimentação gravitacional. O mecanismo dominante para partículas mais pequenas, de tamanhos inferiores a 0.5 μm , a difusão através de movimento Browniano.

A quantidade de agente terapêutico descarregado no local de acção depende ainda das propriedades físico-químicas do aerossol e de factores inerentes ao próprio paciente, que incluem a capacidade de ventilação, estado das vias respiratórias e mecanismos pulmonares.

iii - Características físico-químicas

A deposição do aerossol depende de características tais como, diâmetro das partículas, densidade, carga eléctrica, higroscopia, forma e velocidade do aerossol. Estas características dependem, por sua vez, do agente terapêutico utilizado, da formulação escolhida e do aparelho produtor de aerossol.

O factor mais importante na entrega de um determinado composto terapêutico nos pulmões é o tamanho de partícula. Uma partícula com diâmetro superior a $5\mu\text{m}$ é filtrada e retida no tracto respiratório superior. Partículas com tamanho inferior a $2\mu\text{m}$ são consideradas ideais, visto que conseguem atingir o tracto respiratório inferior.

As características físico-químicas do agente terapêutico desempenham também um papel muito importante na penetração do aerossol. Agentes higroscópios tendem a aumentar de tamanho em contacto com humidade, o que pode afectar a eficácia da entrega do agente terapêutico.

Micropartículas com formas mais aerodinâmicas tendem a ter maior capacidade de penetração. A velocidade a que o aerossol é descarregado também afecta a fracção de agente terapêutico entregue no tracto respiratório inferior. Se o aerossol for descarregado a uma velocidade muito elevada, tende a ficar depositado na orofaringe.

iv - Características do paciente

A capacidade ventilatória e o estado das vias respiratórias do paciente são factores que influenciam a entrega eficaz do agente terapêutico. Quanto maior o volume de inalação, maior a probabilidade das partículas serem transportadas para um local mais profundo dos pulmões. Por isso, os pacientes são sempre instruídos a inspirar profundamente com a activação do aparelho inalatório, não sendo recomendado expirar rapidamente visto que poderia levar ao colapso temporário de algumas vias respiratórias diminuindo assim a entrega do aerossol. A capacidade de sustentar a respiração é também de grande importância para maximizar a entrega do agente terapêutico, uma vez que aumenta a penetração, e o número, de partículas nos pulmões. A coordenação do movimento de inspiração com a activação do mecanismo de aerossol é também de

grande importância. A descoordenação destes dois movimentos pode levar à perda da maior parte do agente terapêutico.

v - Sistemas de administração por aerossol

Os aerossóis terapêuticos podem ser gerados e administrados através de nebulizadores, inaladores pressurizados ou ainda por inaladores de pó seco. Os nebulizadores e os inaladores pressurizados são considerados dispositivos activos, pois conseguem gerar o aerossol independentemente do esforço do paciente. Por sua vez, os inaladores de pó seco podem ser activos ou passivos, sendo que estes últimos requerem uma sucção vigorosa por parte do paciente.

Inaladores pressurizados

Estes são os inaladores mais usados, consistindo num fármaco em forma micronizada num propelente sob pressão. Quando o sistema é activado, o propelente fica exposto à pressão atmosférica, levando à aerossolização do agente terapêutico. À medida que viaja através do ar, o aerossol aquece levando à evaporação do propelente, reduzindo assim o tamanho das partículas para o tamanho desejado.

Os propelentes usados para gerar os aerossóis foram alvo de alguma controvérsia, uma vez que os propelentes à base de CFC's (clorofluorcarbonetos) foram proibidos devido ao impacto negativo que têm na camada atmosférica de ozono. Apesar dos produtos farmacêuticos poderem usar estes CFC's, foram desenvolvidos novos propelentes como o HFA (hidrofluoroalcano). O HFA contém o agente terapêutico em solução, ao contrário do CFC que continha o agente terapêutico em suspensão. Os inaladores à base de HFA produzem partículas mais pequenas e o aerossol é gerado a uma velocidade mais baixa, diminuindo a deposição de partículas na orofaringe.

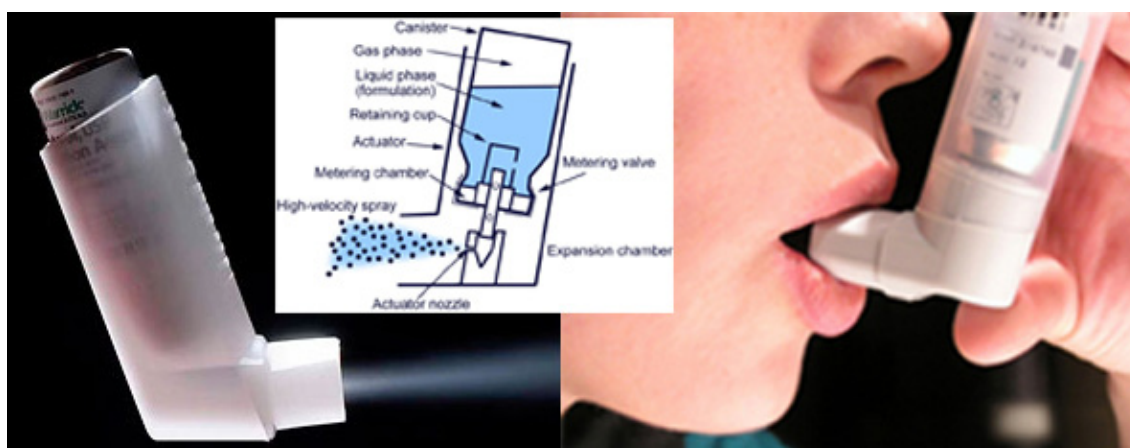


Figura 5 - Inaladores pressurizados (fontes:

<http://www.health.state.mn.us/asthma/images/0608bsasthmainhalers.jpg>;

[http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/clinical_procedures/79926-79929-1413366-](http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/clinical_procedures/79926-79929-1413366-1525496.jpg)

<http://jpn.icicom.up.pt/imagens/ciencia/asma.jpg>).

Inaladores de pó seco

Estes inaladores consistem de um pó farmacologicamente activo, como um fino agregado micronizado, numa câmara inalatória. Estes agregados são convertidos em aerossol através da força inalatória que o paciente exerce na câmara do inalador. Este tipo de inaladores tem a desvantagem de não poder ser usado por pacientes que não conseguem exercer uma força inalatória suficiente para formar o aerossol.



Figura 6 - Inalador de pó seco (fonte: <http://www.aafa.org/pictures/dpi.jpg>).

Nebulizadores

Existem 2 tipos de nebulizadores, o nebulizador de jacto de ar e o ultrasónico. Os nebulizadores a jacto de ar utilizam gás comprimido para gerar um aerossol de gotas líquidas. Um gás é acelerado através de um pequeno orifício que atravessa um tubo capilar cheio de líquido, causando uma queda de pressão no orifício do capilar que por sua vez faz com que a solução contendo o agente terapêutico, que se encontra num pequeno reservatório, seja forçada através do capilar pela pressão atmosférica. O líquido é então transformado num aerossol heterodisperso.

Os nebulizadores ultrasónicos produzem partículas de aerossol através de vibração de alta frequência. Estes nebulizadores têm a vantagem de administrar um grande volume de aerossol num curto período de tempo. É, no entanto, importante assegurar que são suficientemente potentes para produzir aerossóis com tamanho de partículas apropriado para uma eficiente deposição pulmonar. Os nebulizadores ultrasónicos apresentam no entanto as desvantagens de desnaturar medicamentos à base de péptidos devido às temperaturas elevadas que geram, serem pouco eficientes na nebulização de suspensões, normalmente produzirem partículas demasiado grandes, e serem muito caros.



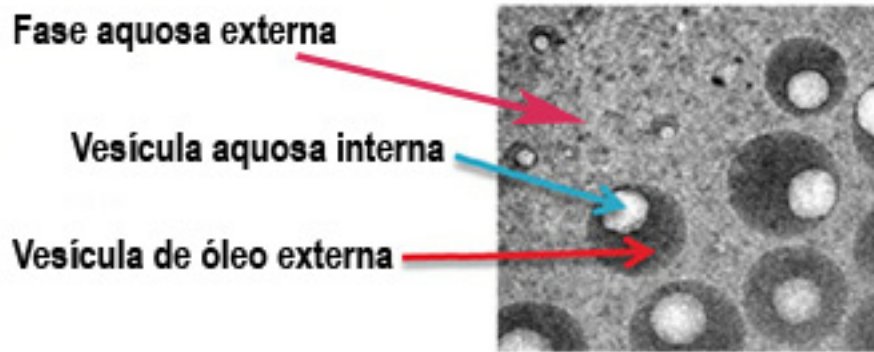
Figura 7 - Nebulizador de jacto de ar com compressor (fonte: catálogo Medcare (http://www.medcare.pt/NEB_C130.pdf)).

5 - Emulsões múltiplas

As nanoemulsões foram introduzidas e descritas na literatura por Hoar e Shulman (1943), ao descreverem sistemas formados espontaneamente quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensioactivo iónico misturado com um álcool de cadeia carbonada média. Contudo, o termo nanoemulsão só foi utilizado em 1959 por Schulman e colaboradores

Devido à sua estrutura interna compartimentalizada, as emulsões múltiplas apresentam importantes vantagens sobre as emulsões simples óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O) para a encapsulação de biomoléculas, tais como a capacidade de transportar tanto moléculas polares como moléculas não polares, e um maior controlo sobre a libertação das moléculas terapêuticas. (Pays, 2002) (Davis, 1998) (Hanson, 2008).

As emulsões múltiplas são sistemas heterogéneos, em que dois líquidos imiscíveis são misturados e estabilizados por agentes emulsificantes. Estas emulsões podem ser do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). Nos sistemas A/O/A, pequenas vesículas aquosas são retidas no interior de vesículas lipídicas maiores que por sua vez estão dispersas numa fase aquosa (externa) contínua. O sistema A/O/A tem vantagens relativamente ao sistema O/A/O visto que o primeiro tem água na sua fase externa, permitindo por isso uma maior gama de aplicações. As emulsões múltiplas possuem várias vantagens, destacando-se a biocompatibilidade, e são completamente biodegradáveis. Podem ser usadas para reter compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos, para direccionamento de fármacos, para mascarar sabores desagradáveis conferidos por algumas moléculas bioactivas, para prolongar a libertação de um determinado ingrediente activo, para melhorar a dissolução ou solubilização de materiais insolúveis, como protecção de moléculas activas sensíveis ou como escape (propriedades “stealth”) ao sistema imunitário. Apesar das potencialidades das emulsões múltiplas, a sua utilização tem sido limitada devido à instabilidade termodinâmica que apresentam (Schmidts, 2009).



Figura

8 - Imagem demonstrativa das diferentes fases de uma emulsão múltipla do tipo A/O/A.

i - Estabilidade

A estabilidade das emulsões depende fundamentalmente de três fenômenos: sedimentação e formação de creme, floculação e ruptura da emulsão devido à coalescência das partículas.

A sedimentação e formação de creme resultam da diferença de densidades entre as diferentes fases da emulsão, sendo que na sedimentação as partículas são mais densas que a fase mais líquida e na formação de creme as partículas são menos densas. A floculação das partículas não provoca necessariamente a sua sedimentação, mas pode facilitar o processo. A colisão entre as partículas pode levar à sua floculação e coalescência, resultando na ruptura da emulsão, isto é, a fase dispersa torna-se numa fase contínua, separada do meio de dispersão por uma única fase. A separação de fases de uma emulsão pode ocorrer apenas alguns segundos após a sua preparação ou demorar vários anos, dependendo da formulação adoptada e da sua preparação (Prista et al., 1995).

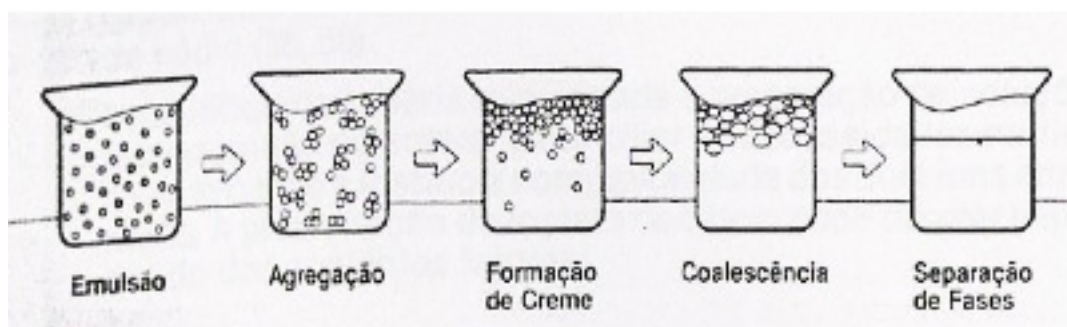


Figura 9 - Fases de desestabilização de uma emulsão (adaptado de Kfoury (1988)).

O método mais comum de formulação é o método de emulsificação em duas etapas, em que uma emulsão primária A/O ou O/A é preparada e depois emulsificada num excesso de fase aquosa ou oleosa por forma a produzir uma emulsão do tipo A/O/A ou O/A/O, respectivamente.

Na preparação de emulsões múltiplas devem-se usar dois agentes emulsionantes. No caso das emulsões A/O/A deve-se usar um agente emulsionante lipofilo, para estabilizar a emulsão primária A/O, e um agente emulsionante hidrofilo, para estabilizar a emulsão secundária O/A, resultando assim numa emulsão A/O/A estabilizada. Nas emulsões O/A/O deve-se usar um agente emulsionante hidrofilo, para estabilizar a emulsão primária O/A, e um agente emulsionante lipofilo, para estabilizar a emulsão secundária A/O, resultando assim numa emulsão O/A/O estabilizada. (Jiao, 2003).

ii - Formação da emulsão

Quando se misturam dois líquidos imiscíveis com agitação constante, as duas fases tendem a formar vesículas dispersas de um dos líquidos no seio do outro. Quando se pára a agitação, as vesículas coalescem e os líquidos separam-se. Assim, considera-se o tempo de vida da emulsão como o tempo decorrido desde o tempo em que os líquidos estão completamente homogeneizados, até à sua total separação.

Embora a energia mecânica de agitação seja importante para a dispersão, não é suficiente, pois apenas vence a barreira da tensão superficial enquanto durar a agitação. A forma mais fácil de estabilizar o sistema é diminuindo a tensão superficial, por forma a reduzir a energia livre derivada da expansão da área superficial (Oliveira, 2004). Neste campo, os agentes tensioactivos têm um papel importante na estabilização das emulsões. No entanto, a grande maioria destes compostos não consegue diminuir a tensão interfacial ao ponto de contrariar toda a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área superficial. Por isso, as emulsões são normalmente consideradas como sistemas termodinamicamente instáveis, sendo no seu desenvolvimento

tecnológico constantemente procuradas formas para retardar, o maior tempo possível, a separação de fases. (Pianovski et al., 2008).

O tipo de emulsão que se forma durante a homogeneização depende do volume relativo de fases e da natureza do agente emulsionante (tensioactivo). Quanto maior o volume de um determinado líquido, maior é a probabilidade deste se tornar no meio de dispersão, mas não acontece necessariamente isto, visto que também tem de se ter em conta o agente emulsionante.

Dependendo da natureza dos agentes emulsionantes, estes podem favorecer tanto a formação de emulsões O/A como A/O. As emulsões O/A podem, por vezes, ser convertidas em emulsões A/O. Esta capacidade dos agentes emulsionantes para promoverem a formação de uma determinada emulsão, A/O ou O/A, deve-se essencialmente à sua natureza anfifílica, que é definida por uma escala denominada Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) (Pasquali et al., 2008). Este sistema EHL representa a relação entre os grupos lipofílicos e hidrofílicos constituintes de moléculas tensioactivas. O sistema de Griffin traduz as propriedades hidrofílicas e lipofílicas dos tensioactivos em termos de uma escala numérica, segundo a qual são atribuídos a estas substâncias valores de EHL que vão de 1 a 50, sendo que quanto maiores forem os valores na escala mais hidrofílicas são as substâncias (Prista et al., 1995).

IV - Materiais e métodos

1 - Bacteriófago

No trabalho de investigação e desenvolvimento efectuado o bacteriófago utilizado foi o phi PVP-SE1, um fago de espectro alargado capaz de infectar *Salmonella* entérica e *E. coli*, tendo sido isolado da água de esgoto de um aviário. Análise DLS (Dynamic Laser Scattering) de uma suspensão aquosa (ultrapura) deste bacteriófago revelou um tamanho de partícula médio de cerca de 65.2 nm.

i - Propagação e purificação do fago

Os bacteriófagos foram propagados por imersão de tiras de papel de filtro estéreis em alíquotas de preparação stock de fago e espalhadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro (Plastiques - Gosselin, Borre, France) sobre uma camada de top agar (com uma camada inferior de LB agar), que continha a respectiva bactéria hospedeira. As placas foram então encubadas durante a noite a 37 °C. Após incubação, 3 mL de solução tampão SM (Tris, sal e gelatina) foram adicionados a cada placa tendo as mesmas sido incubadas novamente durante a noite a 4 °C. Esta solução foi recuperada de cada placa e centrifugada (x9000 g, 10 min.) por forma a remover a bactéria. Um volume de clorofórmio foi adicionado a 4 volumes de sobrenadante para remover células bacterianas ou restos celulares que tenham permanecido no sobrenadante. Esta mistura foi então agitada e centrifugada (x9000 g, 10 min.), e o sobrenadante foi retirado e filtrado usando um filtro para seringa PES de 0,22 µm da Tpp-Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Switzerland) e armazenado a 4 °C até ser necessário.

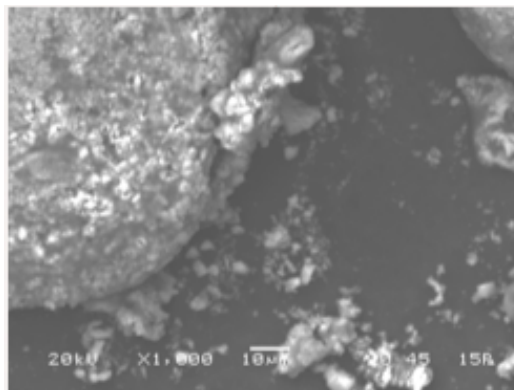


Figura 10 - Microfotografia de microscopia electrónica de varrimento da preparação fágica (bacteriófago Phi-PVP-SE1) liofilizada (fonte: autor).

2 - Reagentes

Softisan 100™ foi adquirido à Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburgo, Alemanha). $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi adquirido à Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Lutrol F68™ e Lutrol F127™ foram gentilmente oferecidos pela BASF Chemtrade GmbH (Ludwigshafen, Germany). Precirol ATO5 (glicerol distearato) e compritol 888ATO (glicerol dibehenato) foram gentilmente oferecidos pela Gattefossé SAS (Saint Priest, França). Glicerol (anidro) foi adquirido à Fluka (Steinheim, Alemanha). Tween 80 foi adquirido à Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). HCl (37%, m/m) comercial e NaCl foram adquiridos à Vaz Pereira (Lisboa, Portugal). A Lecitina de Soja foi adquirida à Acofarma (Barcelona, Espanha).

3 - Equipamento analítico

O Potencial Zeta e o Tamanho Hidrodinâmico das partículas da emulsão foram determinados num Zetasizer (modelo Nanoseries Nano-ZS) da Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Reino Unido). Os estudos calorimétricos foram realizados num DSC (Differential Scanning Calorimeter) da Shimadzu (Kyoto, Japão), que continha um detector (DSC-50) e um analisador térmico (TA-501). A análise por crio-microscopia electrónica de varrimento (Cryo-SEM) das emulsões lipídicas foi realizada num microscópio electrónico de varrimento da JEOL (modelo JSM 6301F, Tokyo, Japão), acoplado a um Ion Sputter-Coater JSC1100 (JOEL, Tokyo, Japão), a um sistema de microanálise por raios-X (INCA 350 Energy) via espectrometria de energia dispersa (SEM/EDS) da Oxford Instruments GmbH (Wiesbaden, Alemanha), e a um sistema de transferência criogénica da Gatan Inc. (modelo Alto 2500, Pleasanton CA, EUA). Os estudos de nebulização foram realizados com um nebulizador compressor medcare NEB-C130 e um nebulizador ultrasónico medcare NEB-747 gentilmente oferecidos por Paulo Ferreira & Santos, Lda.

4 - Preparação da emulsão contendo bacteriófago encapsulado

A produção das emulsões (água-em-óleo-em-água, A/O/A) com bacteriófagos encapsulados foi realizada num dispersor de alta performance (UltraTurrax, modelo T25D, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha) sob aquecimento (cerca de 39 °C), sendo que o liofilizado de bacteriófagos foi previamente dissolvido na fase aquosa interna e depois disperso no lípido fundido (Softisan) seguido de homogeneização (10 min a 10000 rpm). A fase aquosa externa foi depois adicionada ao que se seguiu um novo ciclo de homogeneização (10 min a 10000 rpm). A fase aquosa interna era constituída por HCl 10 mM, Tween 80 e bacteriófago phi-PVP-SE1 purificado (com concentrações a variar desde 5 mg até 10 mg). A fase oleosa intermédia continha glicerol, softisan e lecitina de soja. Finalmente, a fase aquosa externa continha Lutrol F68 (ou F127), água ultrapura e NaCl 10 mM. Foram também produzidas partículas de controlo (sem bacteriófagos) e armazenadas durante 92 dias nas mesmas condições.

5 - Avaliação dos efeitos do tempo de homogeneização, concentração do bacteriófago e força iónica da fase aquosa externa, para optimização da formulação

A estabilidade das emulsões foi avaliada pela produção de emulsões com variações no tempo de homogeneização (5, 8 e 10 min), concentração de bacteriófago (5 até 10 mg), e força iónica (NaCl 1, 10 e 100 mM) da fase aquosa externa.

6 - Determinação do Tamanho Hidrodinâmico e do Potencial Zeta

Cada partícula dispersa numa solução está rodeada de iões de carga oposta. Esta camada de iões é designada de camada fixa. Externamente à camada fixa, existem composições variadas de iões de polaridades opostas, formando uma espécie de nuvem. Esta área é denominada de camada dupla difusa, sendo que toda esta área é neutra. Quando uma carga eléctrica é aplicada à solução onde as partículas estão dispersas, estas são atraídas para o eléctrodo de polaridade oposta, acompanhadas pela camada fixa e por parte da camada dupla difusa. O Potencial Zeta é considerado como sendo o

potencial eléctrico da camada fixa, em que à medida que o Potencial Zeta se aproxima de zero, as partículas tendem a agregar (Buszewski et al., 2010) (Schultz et al., 2008).

Quando se aplica um campo eléctrico à dispersão de partículas, estas movem-se. Esta mobilidade pode ser definida como a velocidade de uma partícula por unidade de campo eléctrico, e é determinada com a aplicação do campo eléctrico e medindo a sua velocidade média. Os resultados obtidos permitem determinar o tamanho hidrodinâmico das partículas.

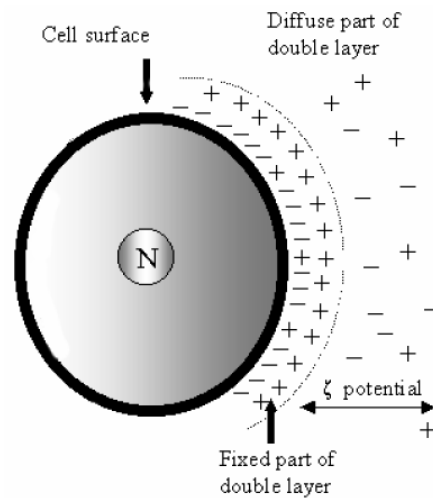


Figura 11 - Partícula rodeada pelas diferentes camadas iónicas (fonte: <http://nanobiomed.s.wordpress.com/>).

7 - Análise térmica por calorimetria de varrimento diferencial

Para cada ensaio calorimétrico, foram pesados cerca de 10 mg de emulsão (usando uma microseringa) directamente no interior de uma cápsula de alumínio de alta pressão (Shimadzu, P/N 557 201-53090, 64U3670609), que foi posteriormente devidamente selada por pressão. Foi também preparada uma cápsula de alumínio de referência apenas com ar selado no seu interior. As amostras foram depois aquecidas

desde a temperatura ambiente até 100 °C a uma taxa constante de 5 °C/min, período durante o qual a quantidade de calor absorvido pelas amostras foi registado.

8 - Actividade antimicrobiana dos bacteriófagos e das emulsões

A actividade antimicrobiana foi avaliada após um simples procedimento laboratorial. Num tubo de ensaio, adicionou-se às partículas encapsulantes dos fagos 1000 µL de cloróformio, para extrair os bacteriófagos encapsulados. A suspensão resultante foi levemente agitada em vortex durante 5 segundos e centrifugada a x9000 g durante 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante aquoso foi imediatamente recuperado e submetido a um teste antimicrobiano. 100 µL de suspensão bacteriana de *Salmonella enteritidis* com crescimento durante a noite a 37 °C foi adicionada a 3 mL de top agar. Após uma leve agitação, o top agar adicionado de suspensão bacteriana foi transferido para um placa de Petri de 90 mm de diâmetro previamente preparada com 10 mL de bottom agar, e deixou-se solidificar. Aplicaram-se então sobre o top agar 5 µL da amostra de sobrenadante contendo fagos recuperada anteriormente, deixando-se secar. Incubou-se então a placa de Petri a 37 °C durante a noite.

9 - Análise por (cryo-)microscopia de varrimento electrónico (cryo-SEM/SEM)

As emulsões contendo bacteriófagos encapsulados foram analisadas por SEM e cryo-SEM, por forma a obter as suas características microestruturais e morfológicas. As amostras de emulsões foram preparadas para análise da seguinte forma: (i) as amostras foram colocadas num suporte de alumínio apropriado inserido numa placa revestida a ouro; (ii) a placa revestida a ouro foi depois devidamente fixada numa barra de transferência; (iii) o suporte contendo a amostra foi submerso em azoto líquido (nitrogen slush); (iv) a amostra foi depois transferida sob vácuo para a câmara de preparação do microscópio electrónico de varrimento (SEM), que também se encontrava sob vácuo e se mantinha fria através da adição de azoto líquido; (v) dentro da câmara, a amostra congelada foi fracturada, e submetida a sublimação durante 90s a 300s, aumentando lentamente a temperatura de -140 °C até cerca de -90 °C, tendo depois sido revestida com 100-200 Å de Au/Pd, durante 20s, sob forte vácuo (0,5 atm)

entre 20-30 mA a 2.5 kV; (vi) finalmente, a amostra foi transferida para a câmara de análise microscópica do SEM. As amostras foram analisadas no CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) com um microscópio de varrimento electrónico da JEOL a operar a 5-15kV, com um ângulo de incidência de 30°, acoplado a microanálise por raio X.

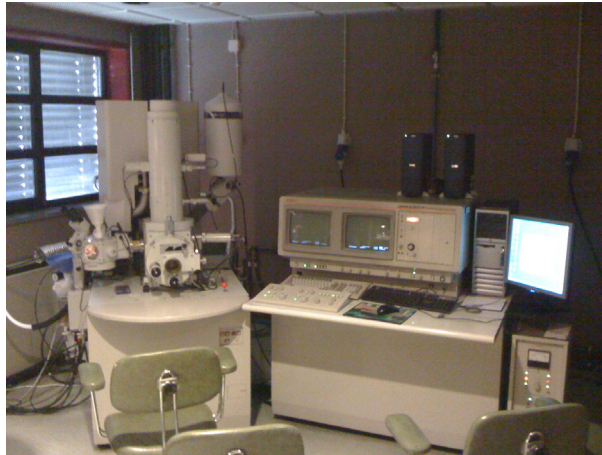


Figura 12 - Microscópio electrónico de varrimento com câmara criogénica (fonte: autor; imagem obtida no CEMUP).

V - Resultados e discussão

1 - Microscopia electrónica de varrimento

Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento das emulsões encapsulando os bacteriófagos, com magnificações de 15000x e de 20000x, podem ser encontradas nas figuras 13 e 14, respectivamente. As microfotografias da superfície exposta das emulsões após fracturação (ver Figura 13) mostram a estrutura matricial do

poloxâmero desenvolvida durante o processo de produção e a homogeneidade de distribuição dos diâmetros das partículas.

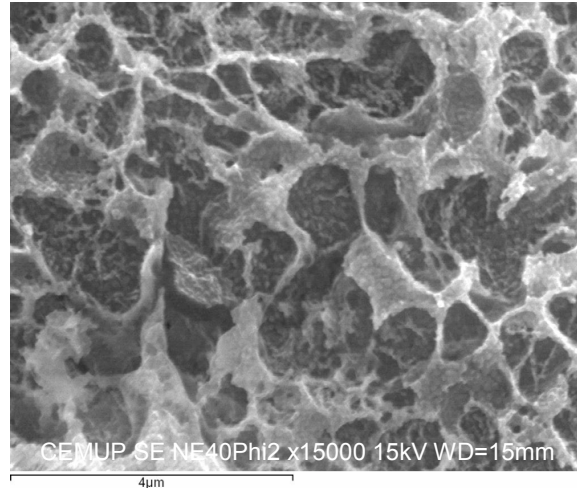


Figura 13 - Microfotografia da estrutura da nemulsão com bacteriófago phi-PVP-SE1 encapsulado, obtidas por cryo-SEM (fonte: autor; imagem obtida no CEMUP).

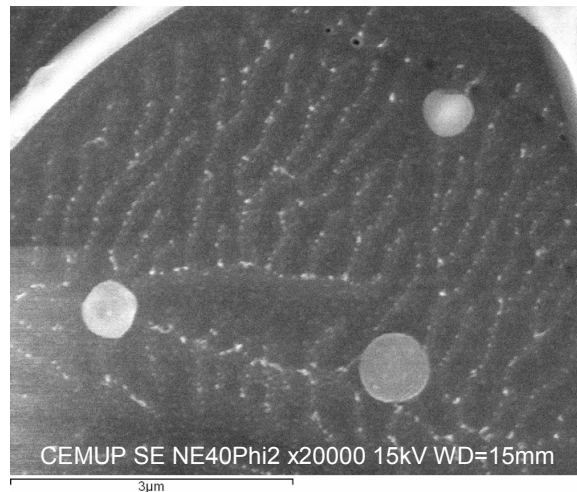


Figura 14 - Microfotografia das partículas com bacteriófago phi-PVP-SE1 encapsulado, obtidas por cryo-SEM (fonte: autor; imagem obtida no CEMUP).

2- Otimização da formulação

Para produzir uma formulação óptima, foram estudadas várias variáveis tais como a natureza do lípido, a concentração do poloxâmero, a concentração de lecitina de

soja, o tempo de homogeneização e a concentração de bacteriófago (ver tabela 2). Uma maior concentração de fago não provocou qualquer alteração no Potencial Zeta mas aumentou a capacidade antibacteriana da emulsão. A adição de um electrólito (cloreto de sódio) ou HCl à fase aquosa externa levou a um aumento do Potencial Zeta (de valores negativos para próximos de zero), presumivelmente devido à acumulação de iões adsorvidos à superfície das partículas levando a uma notável separação de fases. A adição de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à fase interna (para estabilizar o bacteriófago), retirando o HCl, e a substituição do Lutrol F-68 por Lutrol F-127 levou a uma notória separação de fases logo a seguir à preparação da emulsão, pelo que a utilização destes dois compostos ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Lutrol F-127) foi descartada.

Tabela 1 - Optimização do processo de produção das emulsões, com vista à obtenção de uma formulação óptima.

Parametros da formulação	Condições iniciais	Com NaCl na fase aquosa externa	Com HCl na fase aquosa externa	Com mais 25% de lecitina	Com mais 25% de Lecitina e Tween 80	Com mais 25% de tween	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na fase aquosa interna	Com mais 25% de tween e 100% de Bacteriófago	FORMULAÇÃO OPTIMIZADA
Velocidade de homogeneização (rpm)	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	
Fase aquosa interna	Bacteriófago	0.002%	0.01%	0.01%	0.002%	0.003%	0.002%	0.01%	
	HCl (0,010M)	2.50%	2.50%	2.50%	2.50%	2.50%	0%	2.50%	
	Tween 80	0.03%	0.02%	0.02%	0.03%	0.04%	0.03%	0.02%	
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0%	0%	0%	0%	0.00%	0%	2.50%	
Fase oleos	Softisan 100™	1.30%	1.30%	1.30%	1.25%	1.27%	1.27%	1.25%	
	Lecitina de Soja	0.12%	0.12%	0.12%	0.18%	0.17%	0.13%	0.12%	
	Glicerol	12.50%	12.50%	12.50%	12.50%	12.50%	12.50%	12.50%	
Fase aquosa externa	Poloxamero (Lutrol F68)	0.99%	1%	1%	0.99%	1.27%	1%	1%	
	Água ultra pura	82.56%	80.04%	80.05%	82.55%	82.24%	82.56%	82.60%	
	HCl (0,010M)	0%	2.50%	0%	0%	0%	0%	0%	
	NaCl (0,010M)	0%	0%	2.50%	0%	0%	0%	0%	

3 - Tamanho hidrodinâmico e Potencial Zeta

A principal razão para se medir o Potencial Zeta reside na previsão da estabilidade coloidal, que depende da interacção entre partículas. O Potencial Zeta é portanto uma tentativa para quantificar estas interacções, sendo uma medida das forças repulsivas entre partículas; como a maioria dos sistemas aquosos coloidais é estabilizado via repulsão electrostática, quanto maiores forem as forças repulsivas entre partículas mais baixa será a probabilidade para estas se agregarem, levando a uma maior estabilidade do sistema coloidal. O tamanho de partícula foi medido através de DLS (Dynamic Laser light Scattering), que é capaz de medir partículas com tamanho entre 5

nm a 3 μ m. O tempo de homogeneização óptimo foi de 10 minutos a 10000 rpm, obtendo-se assim partículas com tamanho entre 85 nm e 200 nm (ver Figura 15). O armazenamento da emulsão otimizada durante quase 3 meses à temperatura ambiente levou a um aumento do Potencial Zeta, presumivelmente devido à concentração de iões na interface das partículas (ver Figura 16). O tamanho de partícula, ao fim de quase 3 meses de armazenamento teve um súbito aumento, tendo sido atribuído à agregação e/ou coalescência de partículas. O Tween 80 (surfactante não-iónico e emulsificante) foi seleccionado como excipiente adequado visto que, quando duplicada a sua quantidade, o potencial zeta diminuiu (para valores mais afastados de zero). Em emulsões de água em óleo (A/O), como é o caso das partículas produzidas, existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o tamanho da cadeia de ácidos gordos, e uma correlação negativa com a constante dielétrica do agente emulsificante (Tween 80). Aumentando o peso molecular, como acontece com o Softisan 100™ e baixando a constante dielétrica (usando Tween 80), indica uma maior hidrofobicidade, levando a uma maior impregnação da interface e a uma emulsão mais estável, o que está de acordo com a estabilidade prolongada da emulsão desenvolvida.

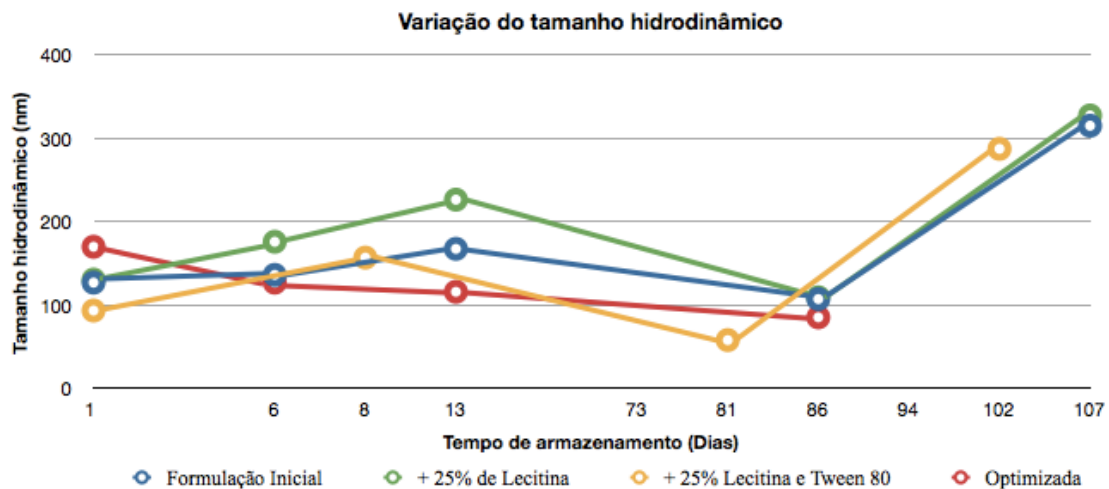


Figura 15 - Evolução do tamanho hidrodinâmico das partículas com bacteriófago encapsulado, durante o processo de otimização com vários excipientes.

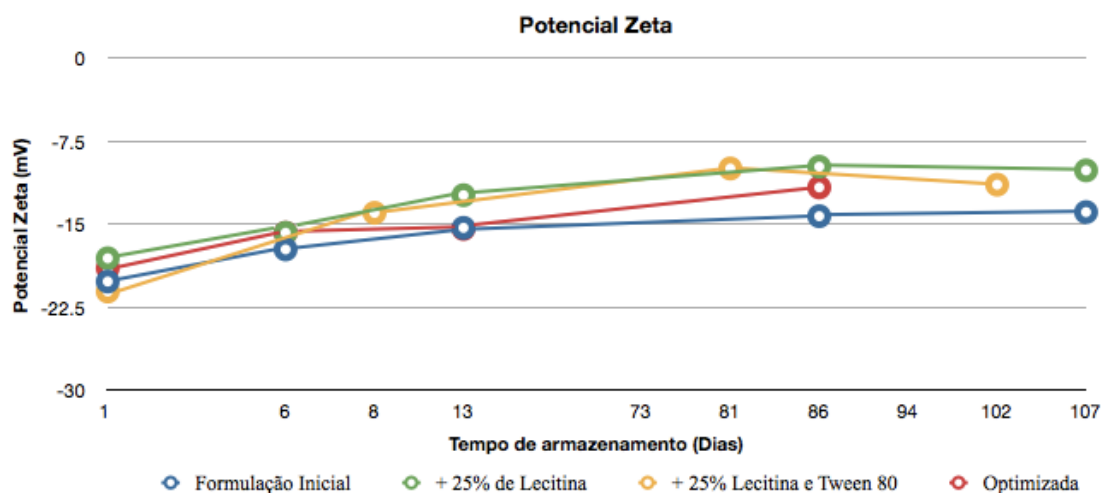


Figura 16 - Evolução do Potencial Zeta das partículas com bacteriófago encapsulado, durante o processo de otimização com vários excipientes.

4 - Actividade antimicrobiana

O liofilizado de bacteriófagos reconstituído em tampão SM demonstrou actividade lítica, como seria de esperar. No entanto, a actividade antibacteriana das emulsões com bacteriófagos encapsulados estava dependente de diversos factores. O baixo pH da fase interna poderia ser um dos factores limitantes da actividade antibacteriana, mas os bacteriófagos phi-PVP-SE1 só demonstram alguma sensibilidade a pH 2 e as emulsões produzidas apresentavam um pH interno de 2,31, não sendo os bacteriófagos afectados por este pH. A velocidade de homogeneização também não terá sido um dos factores limitantes dessa actividade uma vez que vários investigadores reportaram que não há perda de viabilidade dos fagos com velocidades de homogeneização de 14000 rpm, e neste procedimento apenas se utilizaram velocidades de homogeneização de 10000 rpm. A temperatura a que os fagos estiveram sujeitos durante a preparação da emulsão também não foi um dos factores de limitação da actividade antibacteriana das emulsões, uma vez que a temperatura máxima do procedimento desenvolvido é de aproximadamente 39 °C e os bacteriófagos usados foram isolados do tracto intestinal de galinhas, onde a temperatura ronda os 41°C. A baixa concentração de bacteriófagos utilizados para a produção nas partículas poderia ser o factor limitante, e realmente, nas primeiras análises antimicrobianas, em que se

usou uma concentração fágica de aproximadamente 5 mg, obteve-se uma acção antibacteriana fraca. Mas após duplicar a concentração de fago, para aproximadamente 10 mg, observou-se acção antibacteriana marcada.

5 - Análise calorimétrica

A análise das emulsões por calorimetria de varrimento diferencial forneceu uma visão do estado e grau de cristalinidade, e comportamento de fusão e cristalização dos materiais cristalinos como as partículas produzidas. A introdução de Tween 80 em quantidades superiores levou a uma diminuição do pico de temperatura de fusão (de 88 °C e absorção de 0,182 J/mg da emulsão inicial, para cerca de 79,2 °C e absorção de 0,509 J/mg da emulsão otimizada), denotando um alargamento do intervalo de temperaturas de fusão na emulsão otimizada, com um aumento da área do pico de absorção de energia superior a 64 %. A compatibilidade entre a maior quantidade de Tween 80 e outros componentes da fase aquosa interna pode ser atribuída a ligações de hidrogénio e a uma energia da rede cristalina mais baixa, e isto teve um impacto notável no perfil de fusão da emulsão otimizada (ver Figura 17).

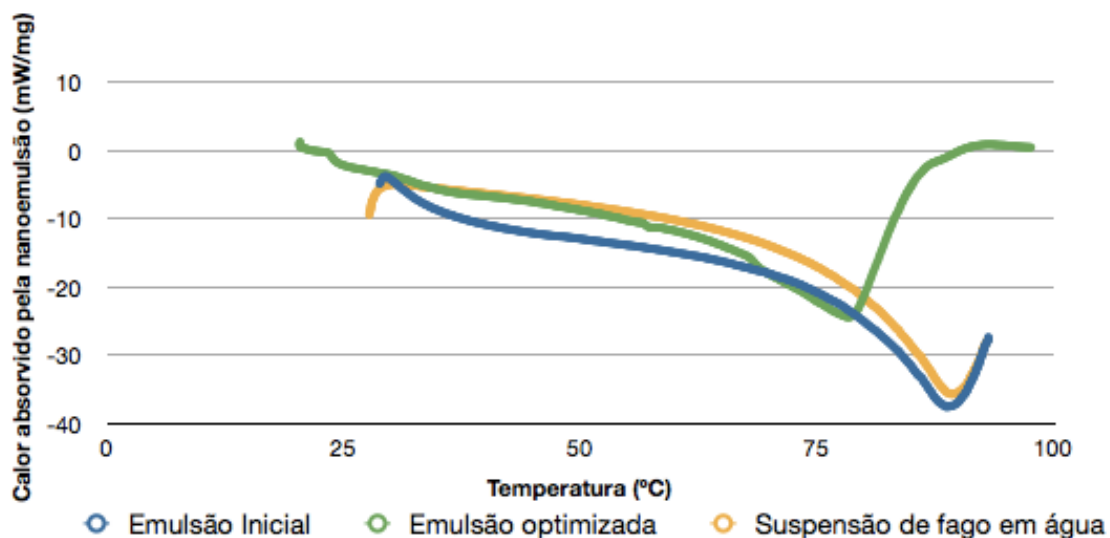


Figura 17 - Termogramas das emulsões produzidas com bacteriófagos encapsulados e de bacteriófagos em suspensão em água ultrapura.

6 - Nebulização

Foram testados dois tipos de nebulizadores para a administração da emulsão produzida. Um nebulizador compressor medcare NEB-C130 e um nebulizador ultrasónico medcare NEB-747. Nenhum destes nebulizadores foi eficaz na nebulização da formulação produzida, o que pode estar relacionado com a composição lipídica da emulsão. Devido ao processo de nebulização os lípidos presentes na formulação ficaram retidos à saída do copo de nebulização, comprometendo assim a estabilidade e viabilidade dos bacteriófagos.

VI - Conclusão

Neste trabalho de investigação pretendeu-se desenvolver uma emulsão contendo partículas capazes de encapsular fagos, mantendo assim a sua estabilidade e natureza antimicrobiana.

A observação macroscópica das emulsões optimizadas com o incremento de um polímero semicristalino (Tween 80) não mostrou separação de fases nem aderência às paredes do reservatório, mesmo após um tempo de armazenamento prolongado à temperatura ambiente.

A formulação optimizada apresentou partículas com um tamanho hidrodinâmico médio de cerca de 114 nm e um Potencial Zeta de cerca -13 mV, que se mantiveram estáveis durante um período de armazenamento de cerca de 3 meses.

Os bacteriófagos encapsulados pelas emulsões não mostraram actividade lítica nos primeiros testes devido às baixas concentrações de fagos usadas. Após aumentada a concentração de fagos em 5 e 10 vezes já foi conseguida a actividade lítica dos bacteriófagos encapsulados.

O aumento da concentração de Tween 80 levou a uma diminuição significativa do pico térmico de absorção de energia (de 88 °C com uma absorção de 0.182 J/mg na emulsão de partida para cerca de 79,2 °C com uma absorção de 0.509 j/mg na emulsão optimizada), denotando um alargamento do perfil de fusão na emulsão optimizada, com um aumento de área do pico de absorção de energia acima dos 64 %.

Em emulsões A/O/A (como é o caso desta formulação), existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o comprimento da cadeia dos ácidos gordos dos lípidos utilizados e uma correlação negativa com a constante dieléctrica do agente emulsificante. Utilizando um lípido de peso molecular superior (como é o caso do Softisan 100™, com cadeias de ácidos gordos C₁₀ - C₁₈) e diminuindo a constante dieléctrica (utilizando o Tween 80) permitiu uma maior hidrofobicidade das partículas,

levando a uma maior impregnação da interface e a uma emulsão mais estável, o que está em pleno acordo com a estabilidade a longo prazo observada nesta formulação.

A nebulização da emulsão produzida não foi eficaz devido à retenção dos lípidos no copo de nebulização. A alternativa mais eficaz para administração desta formulação por forma a depositar os bacteriófagos no local de infecção seria a utilização de inaladores pressurizados com gás propelente. Infelizmente não me foi possível testar este tipo de dispositivo devidos aos custos elevados necessários para a sua produção.

Bibliografia

Anderson, P. J. (2005). History of aerosol therapy: liquid nebulization to MDIs to DPIs. *Respir Care*, 50(9), pp. 1139-1150.

Beer, M. H. et al. (2003). *The Merck manual of Medical Information*. Nova Iorque, Pocket Books.

Bogozova, G.G. et al. (1992). Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from klebsiella bacteriophages. *Zh Mikrobial Epidemiol immunobiol.* (3), pp. 30-33.

Broxmeyer, L. et al. (2002). Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis*, 186(8), pp. 1155-1160.

Buszeweski, B. et al. (2010). Zeta potential determinations, a new way of stationary phases characterization for liquid chromatography. *J Sep Sci.* 33(11), pp.1529-1537.

Carlton, R.M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warz)*, 47(5), pp. 267-274.

Chastre, J. e J. Y. Fagon (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(7), pp. 867-903.

Chernomordik, A. B. (1989). Bacteriophage and their therapeutic-prophylactic use. *Med Sestra*, 48(6), pp. 44-47.

Davis, S.S. et al. (1987) Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.* 149, pp. 51-64.

De Cock, E. et al. (2009). Cost-effectiveness of linezolid vs vancomycin in suspected methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia in Germany. *Infection*, 37(2), pp. 123-132.

Duckworth, D. H. et al. (1981). Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements. *Microbiol Rev*, 45(1), pp. 52-71.

Fauci et al. (2008). *Harrison's: Principles of internal medicine*. Nova Iorque, McGraw-Hill.

Gales, A. C. et al. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, 32(2), pp. 146-155.

Golshahi, L. et al. (2008). Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 21(4), pp. 351-360.

Hanson J.A. et al. (2008) Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides. *Nature* 455, pp. 85-88.

Hoar, T. P.; Schulman, J. H. (1943). *Nature*, 153, p. 102.

Jiao, J.; Burgess, D.J. (2003). Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *APPS PharmSci*, 5(1):E7

Kfauri, M. F. (1988). *Terapia Nutricional Parenteral: alguns aspectos importantes*. Brasil, SP.

Kucharewicz-Krukowska, A., Slopek, S. (1987). Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 35(5), pp. 553-561.

Lee, S. C., C. et al. (1999). Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 20(3), pp. 205-207.

Leverentz, B. et al. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot*, 64(8), pp. 1116-1121.

Lobo, L. J. et al. (2010). Expanded Clinical Presentation of Community-acquired MRSA Pneumonia. *Chest*.

Mcphee, S. J. (1997). *Pathofisiologia de Doença: An introduction to clinical medicine*. Nova Iorque, Appleton and Lange.

Merril, C. R. et al. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(8), pp. 3188-3192.

Nakou, A. et al. (2009). MRSA as a cause of community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*, 34(5), pp. 1013-1014.

Oliveira, A. G. et al. (2004). Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de libertação de fármacos. *Quim. Nova*, pp. 131-138.

Pasquali, R. C. et al. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *Int J Pharm*, 356, pp. 44-51.

Pays K. et al. (2002) Double emulsions: how does re-lease occur? *J. Control. Release*. 79, pp. 193-205.

Pelczar, M. J., Chan E. C. S., Krieg N. R. (1993). Microbiology-Concepts and applications. Nova Iorque, McGraw.Hill.

Perepanova, T. S. et al. (1995). The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic diseases. Urol Nefrol (Mosk), (5), pp. 14-17.

Pianovski, A. R. et al. (2008). Development and evaluated of O/W/O multiple emulsions stability containing pequi oil (Caryocar brasiliense). Rev. Bras.. Farm., 89(2), pp. 155-159

Prista, L. N. et al. (1995). Tecnologia Farmacêutica. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Schmitz, P., Martin, K. J., Miller, D. D. (2008). Internal medicine: just the facts. Nova Iorque, McGraw-Hill.

Schmidts, T. et al. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. J Colloid Interface Sci, 338(1), pp. 184-192.

Schulman, J. H., Staekenius, W.; Prince, L. M. J. (1959). Phys. Chem, 63, p. 1677.

Schultz, N. et al (2008). Zeta potential measurements as a diagnostic tool in enzyme immobilization. Colloids surf B Biointerfaces. 66(1), pp. 39-44.

Sousa C., J. (2001). Antibióticos Antibacterianos. Lisboa, Publicações Farmácia Portuguesa.

Sulakvelidze, A. et al. (2001). Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. Antimicrob Agents Chemother, 47(4), pp. 1301-1307.

<http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/img012.jpg>

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Keogh/bacteriophage2.jpg>

<http://www.health.state.mn.us/asthma/images/0608bsasthmainhalers.jpg>

http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/clinical_procedures/79926-79929-1413366-1525496.jpg

<http://jpn.icicom.up.pt/imagens/ciencia/asma.jpg>

<http://www.aafa.org/pictures/dpi.jpg>

http://www.medcare.pt/NEB_C130.pdf

<http://nanobiomed.wordpress.com/>