INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS: ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Domingos de Jesus
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2019

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS: ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Domingos de Jesus
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Ana Isabel Fernandes

Outubro de 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar, aos meus pais, Abílio e Manuela, pelo esforço que fizeram para que pudesse realizar este sonho, pois sem eles nada seria possível. Por todo o amor, apoio e força que me deram ao longo destes cinco anos e ao longo de toda a vida, sem em momento algum duvidarem que este dia ia chegar. Por serem os meus grandes exemplos, e me tornarem naquilo que sou hoje, o meu grande obrigado.

Ao meu namorado, Rui, por me acompanhar há 8 anos, por ser o meu porto de abrigo, por me apoiar incondicionalmente, por estar sempre lá para partilhar sorrisos ou limpar lágrimas, por ser a pessoa que mais admiro no mundo. Por tudo e mais alguma coisa, obrigado meu amor.

À minha irmã e madrinha Mara, que é para mim uma segunda mãe, e à minha querida sobrinha e afilhada Matilde, por contribuírem para aquilo que sou hoje, por darem alegria aos meus dias e força para continuar.

A toda a minha restante família que de algum modo contribuiu para a pessoa que sou hoje, aos que cá estão para ver a minha vitória, e também aos que não estão mas que guardo com grande carinho no meu coração.

Às minhas amigas, Sofia, Maria e Daniela (os amigos são a família que escolhemos e eu sei que não podia ter escolhido melhor) que me dão apoio incondicional, que sempre se mantiveram presentes em todos os momentos e que se orgulham da pessoa que me tornei e de tudo o que conquistei e irei conquistar.

Às minhas colegas de turma Marisa e Andreia, por partilharem comigo estes 5 anos de sorrisos e alegrias, lágrimas e tristezas, bem como nervos à flor da pele, e mostrarem que a faculdade nos pode trazer amigos para a vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Isabel Fernandes, por todo o apoio, disponibilidade e paciência com que orientou este projeto.

Às restantes pessoas que fizeram parte deste percurso e não se encontram aqui mencionadas, obrigado.

Resumo

Apesar do vasto sucesso dos antibióticos na medicina moderna, o tratamento de infeções bacterianas enfrenta ainda desafios críticos.

Os antibióticos são, de facto, medicamentos essenciais. No entanto, apesar de todas as suas irrefutáveis vantagens, existem também problemas associados a estes medicamentos, dos quais se podem destacar concentrações subterapêuticas no local de infeção, efeitos secundários a nível sistémico e necessidade de administração frequente com consequente falta de adesão à terapêutica. Todas estas limitações associadas ao uso indiscriminado e extremamente difundido dos antibióticos têm conduzido à proliferação de bactérias extremamente resistentes.

Assim, torna-se imperativo criar novas soluções para contornar este problema. Uma forma de o fazer é através da incorporação de fármacos em sistemas de nanopartículas, que permitem melhorar o índice terapêutico do fármaco, ao mesmo tempo que contornam alguns mecanismos de resistência, permitem vetorizar o fármaco ao local de ação através de vetorização passiva ou ativa, atenuam os efeitos adversos verificados em alguns fármacos livres e permitem ainda a administração de vários fármacos em simultâneo.

Nesta monografia discute-se não só o estado atual da resistência bacteriana, as suas causas e mecanismos, mas também a incorporação de fármacos em nanopartículas orgânicas (lipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas e dendrímeros) e nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro e nanopartículas de prata), sistemas que constituem uma alternativa promissora no combate à resistência bacteriana.

Palavras-chave: Antibióticos; Resistência bacteriana; Sistemas de nanopartículas; Nanomedicina.

Abstract

Despite the vast success of antibiotics in modern medicine, the treatment of bacterial infections still faces critical challenges.

Antibiotics are, in fact, essential medicines. However, despite all their irrefutable advantages, there are also problems associated with these drugs, such as subtherapeutic concentrations at the site of infection, systemic side effects and the need for frequent administration with consequent lack of adherence to therapy. All of these limitations associated with the indiscriminate and widespread use of antibiotics have led to the proliferation of extremely resistant bacteria.

Thus, it is imperative to create new solutions to work around this problem. One way to do this is by incorporating drugs into nanoparticle systems, which improve the therapeutic index of the drug, while circumventing some resistance mechanisms, allowing the targeting of the drug to the site of action, through passive or active targeting,, mitigate the adverse effects of some free drugs and also allow the administration of several drugs simultaneously.

This monograph discusses not only the current state of bacterial resistance, its causes and mechanisms, but also the incorporation of drugs into organic nanoparticles (liposomes, polymeric nanoparticles, polymeric micelles and dendrimers) and inorganic nanoparticles (gold nanoparticles and silver nanoparticles), systems that provide a promising alternative in combating bacterial resistance.

Keywords: Antibiotics; Bacterial resistance; Nanoparticulate systems; Nanomedicine

Índice Geral

Resumo 1

Índice de Figuras 5

1. Introdução 13

2. Resistência bacteriana 17

2.1. Mecanismos de Resistência 22

3. Sistemas de Nanopartículas 25

3.1. Considerações gerais 25

3.2. Farmacocinética 28

3.2.1. Distribuição das nanopartículas 29

3.2.2. Eliminação 31

4. Nanopartículas orgânicas 33

4.1. Lipossomas 34

4.1.1. Classificação 35

4.1.2. Métodos de preparação 39

4.1.3. Vias de administração 41

4.1.4. Farmacocinética 42

4.1.5. Ação em bactérias intracelulares 45

4.1.6. Vantagens e desvantagens 46

4.1.7. Testes realizados em bactérias resistentes 47

4.1.8. Testes realizados em bactérias suscetíveis 49

4.1.9. Fármacos que beneficiam da abordagem 49

4.2. Nanopartículas poliméricas 52

4.2.1. Farmacocinética 55

4.2.2. Fármacos que beneficiam da abordagem 56

4.3. Micelas poliméricas 58

4.3.1. Métodos de preparação 59
4.3.2. Farmacocinética 59
4.3.3. Fármacos que beneficiam da abordagem 60
4.4. Dendrímeros 61
4.4.1. Tipos de dendrímeros 62
4.4.2. Métodos de preparação 63
4.4.3. Farmacocinética 64
4.4.4. Fármacos que beneficiam da abordagem 66
5. Nanopartículas inorgânicas 69
5.1. Nanopartículas de ouro (AuNP) 70
5.2. Nanopartículas de prata (AgNP) 71
6. Conclusões e perspetivas futuras 73
7. Referências Bibliográficas 75

Índice de Figuras

Figura 1 - Gráfico que permite comparar o aumento da resistência bacteriana (MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; VRE – *Enterococcus* resistentes à vancomicina; FQRP – *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas) e produção de novos antibióticos entre 1985 e 2012..... 14

Figura 2 - Ilustração dos principais sistemas de nanopartículas utilizados na veiculação de antibióticos: (a) Lipossomas; (b) Nanopartículas poliméricas; (c) Dendrímeros; (d) Nanopartículas inorgânicas..... 14

Figura 3 - Gráfico que retrata a evolução no consumo de antibióticos em ambulatório, por subclasse farmacológica, entre os anos de 2013 e 2017 (DDD – dose diária definida) 18

Figura 4 - Gráfico que retrata a evolução no consumo de antibióticos em meio hospitalar, por subclasse farmacológica, entre os anos de 2013 e 2017 (DDD – dose diária definida)..... 18

Figura 5- Mapa-mundo com previsão da mortalidade anual atribuível à resistência a antibióticos em 2050..... 20

Figura 6 - Figura ilustrativa dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana. Inclui exemplos de bombas de efluxo, enzimas que inativam o antibiótico através de alterações na sua estrutura, enzimas que degradam o antibiótico e alterações da permeabilidade da parede bacteriana que impede a entrada do antibiótico. 24

Figura 7 - Mecanismos de libertação controlada de fármacos em diferentes tipos de nanopartículas..... 27

Figura 8 - Mecanismos através dos quais antibióticos encapsulados em lipossomas penetram em células fagocitárias. A imagem mais à esquerda representa as várias fases de fagocitose: 1) adsorção à membrana celular; 2) internalização da membrana; 3) fusão da vesícula com o lisossoma; 4) degradação do lipossoma e libertação do fármaco. À direita encontram-se os outros processos através dos quais existe penetração de

antibióticos encapsulados por lipossomas, tais como a fusão, a troca lipídica e a endocitose 29

Figura 9 - Vetorização passiva vs vetorização ativa. Na figura mais à direita, é possível verificar uma vetorização passiva, onde as partículas tendem a extravasar passivamente através da vasculatura fragilizada, o que é característico dos tecidos inflamados (tecidos tumorais e/ou inflamados), e acabam por acumular devido ao efeito EPR. Neste caso, o fármaco pode ser libertado no meio extracelular e difundir através do tecido. Na figura à esquerda encontra-se representado o mecanismo de vetorização ativa. Neste, as nanopartículas são conjugadas com ligandos-alvo na sua superfície, que direcionam o fármaco diretamente ao local onde estes são necessários..... 30

Figura 10 - Figura demonstrativa do impacto do tamanho e forma das nanopartículas na sua eficácia como sistemas de veiculação de fármacos. Quanto menor a nanopartícula, maior a facilidade desta se movimentar através da vasculatura. 31

Figura 11 - Exemplos de nanopartículas orgânicas para aplicação em sistemas de veiculação de fármacos..... 33

Figura 12 - Ilustração esquemática da formação espontânea de lipossomas: (a) fosfolípidos; (b) formação da bicamada lipídica; (c) formação do liposoma propriamente dito; (d) estrutura química da bicamada lipídica. 34

Figura 13 - Representação de encapsulação de fármacos em lipossomas: fármacos hidrofílicos encontram-se incorporados no núcleo aquoso enquanto fármacos hidrofóbicos se encontram encapsulados na bicamada lipídica.. 35

Figura 14 - Classificação de lipossomas com base no seu tamanho e número de lamelas. Pequenas vesículas unilamelares (SUV) apresentam um tamanho inferior a 100 nm, grandes vesículas unilamelares um tamanho compreendido entre 100 e 1000 nm, e vesículas unilamelares gigantes um tamanho superior a 1000 nm. As vesículas multilamelares apresentam várias bicamadas lipídicas, e as vesículas multivesiculares encapsulam várias vesículas mais pequenas no seu interior..... 36

Figura 15 - Representação da organização de um lipossoma e da bicamada lipídica... 37

Figura 16 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas: (A) Lipossomas convencionais - lipossomas constituídos por uma bicamada lipídica que pode ser composta por fosfolípidos catiónicos, aniónicos ou neutros e colesterol, rodeando um núcleo aquoso. Tanto a bicamada lipídica como o núcleo aquoso podem incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos respectivamente; (b) Lipossomas peguilados – lipossomas com a sua superfície estabilizada estericamente através da adição de polímeros hidrofílicos como PEG; (c) Lipossomas com ligandos-alvo – lipossomas que podem ter conjugados na sua superfície ligandos ativos como anticorpos, péptidos, e carbohidratos que permitem uma vetorização ativa; (d) Lipossomas teranósticos – lipossomas que podem incorportar características dos três tipos anteriores..... 39

Figura 17 - Figura ilustrativa dos métodos de preparação de lipossomas e diferentes métodos pós-formação para controlar o tamanho e distribuição dos mesmos. 40

Figura 18 - Algumas das técnicas de preparação para diferentes tipos de lipossomas categorizados por número de lamelas e tamanho. Vesiculas MLV podem ser transformadas em unilamelares por meios mecânicos. Abreviaturas: GUV – vesiculas unilamelares gigantes; LUV – vesiculas unilamelares grandes; SUV – vesiculas unilamelares pequenas. 41

Figura 19 - Interação lipossoma-célula. Os lipossomas carregados com o fármaco interagem com a célula ligando-se à sua superfície (A). A absorção pela membrana plasmática também pode ocorrer através de interações eletrostáticas (B). A veiculação do fármaco pode ocorrer de diferentes modos. Os lipossomas fundem com a membrana plasmática e libertam o fármaco dentro da célula (C). Após interação com a célula, a estrutura do lipossoma pode ser afetada e o fármaco acaba por ser libertado (D). Também a troca de lipidos ca bicamada lipidica do lipossoma com a membrana celular pode ocorrer (E). Os lipossomas podem ser internalizados por endocitose (F). Os endossomas podem fundir com os lisossomas (G), e neste caso o baixo pH induz a degradação da membrana do lipossoma e o fármaco é libertado. Por fim, os lipossomas também podem libertar o fármaco após fusão ou destabilização da vesícula endocítica (H)..... 43

Figura 20 - Diferentes tipos de nanopartículas poliméricas: de acordo com a sua organização estrutural as nanopartículas podem ser classificadas em nanocápsulas ou nanoesferas, podendo o fármaco ser encapsulado no seu interior, ou adsorvidos à sua superfície. 52

Figura 21 - Metabolização de PLGA, gerando dois produtos que são o ácido lático e o ácido glicólico, que são metabolizados e eliminados do organismo por métodos naturais como o ciclo de Krebs. 53

Figura 22 - Diferentes métodos de síntese de nanopartículas de PLGA. Estas partículas são essencialmente sintetizadas por difusão emulsão, evaporação de solvente e nanoprecipitação. 54

Figura 23 - Micela polimérica 58

Figura 24 - Figura ilustrativa de um dendrímero e das suas características estruturais. 61

Figura 25 - Representação das várias formas de transporte de fármacos em dendrímeros: na imagem mais à esquerda é possível verificar a incorporação do fármaco hidrofóbico no interior das cavidades dendríticas; na imagem central verifica-se o fármaco conjugado na superfície do dendrímero; por fim, na imagem mais à direita verifica-se o fármaco conjugado na superfície do dendrímero por meio de um espaçador 62

Figura 26 - Diferentes tipos de dendrímeros 63

Figura 27 - Representação esquemática dos métodos de síntese de dendrímeros: (a) Síntese divergente; (b) Síntese convergente.. 64

Figura 28 - Grupos funcionais conjugados na superfície dos dendrímeros..... 66

Figura 29 - Exemplos das nanopartículas inorgânicas mais utilizadas: (a) nanotubos de carbono; (b) quantum dot; (c) nanopartículas de ouro; (d) nanopartículas de sílica. 69

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Associação de dois ou mais antibióticos em sistemas de nanopartículas..... 27

Tabela 2 - Estudos que demonstram resultados da encapsulação de antibióticos em lipossomas. 51

Lista de abreviaturas[1]

BBB – Barreira hematoencefálica *(Blood Brain Barrier);*

CEPDC – Centro europeu de prevenção e controlo de doenças;

CNS – Sistema nervoso central *(Central Nervous System);*

DDD – Dose diária definida;

DNA – Ácido desoxirribonucleico *(Deoxyribonucleic acid)*;

EPR – Aumento de permeação e retenção *(Enhanced permeation and retention);*

CF – Fibrose quística *(Cystic fibrosis)*;

FDA – *Food and drug administration;*

FQRP – *Pseudomonas aeruginosa* resistente às fluoroquinolonas (*Fluoroquinolone-resistant Pseudomonas aeruginosa);*

GUV – Vesículas unilamelares gigantes *(Giant unilamellar vesicles);*

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*High-density lipoproteins)*;

IV – Intravenoso:

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low-density lipoproteins)*;

LUV – Vesículas unilamelares grandes *(Large unilamellar vesicles);*

MIC – Concentração mínima inibitória *(Minimum inhibitory concentration*);

MLV – Vesículas multilamelares *(Multilamellar vesicles);*

MPS – Sistema fagocítico mononuclear *(Mononuclear phagocyte system);*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina *(Methicillin-resistant staphylococcus aureus);*

NP – Nanopartícula;

PAC – Poli-alquil-cianoacrilatos;

PBMA – Polibutilmetacrilato;

PCL – Poli-ε-caprolactona;

PEG – Polietilenoglicol;

PLA – Ácido polilático;

PLS – Poliestireno;

PVP – Poli-vinil-pirrolidona;

SUV – Vesículas unilamelares pequenas (*Small unilamellar vesicles)*;

TB – Tuberculose;

ULV – Vesículas unilamelares *(Unilamellar vesicles);*

VRE – *Enterococcus* resistentes à vancomicina (*Vancomycin-resistant Enterococcus*).

[1] Optou-se por colocar algumas siglas na língua Inglesa com a sua tradução em Português.

1. Introdução

Desde a década de 1940, os antibióticos reduziram drasticamente a morbilidade e mortalidade associadas a infeções bacterianas (CDC, s.d.). Apesar do amplo sucesso desta classe farmacoterapêutica na medicina moderna, o tratamento de infeções bacterianas ainda enfrenta desafios críticos (Gao, Chen, Zhang, Zhang, & Zhang, 2018), uma vez que algumas bactérias têm vindo a desenvolver uma resistência clinicamente significativa a quase todos os antibióticos atualmente disponíveis (Sharma, Kumar Arya, Dua, Chhatwal, & Johri, 2012). Nos últimos anos, tem-se verificado a necessidade de usar concentrações cada vez mais elevadas de antibiótico para se obter efeito terapêutico em muitas estirpes comuns como *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Enterobacter e Escherichia coli*, instalando-se a preocupação com a possibilidade de reverter a uma era pré-antibiótica (Brooks & Brooks, 2014). Existem vários fatores que contribuem para este problema, tais como as concentrações sub-terapêuticas, que muitas vezes se verificam no local de infeção, a falta de adesão à terapêutica, que resulta muitas vezes de efeitos secundários a nível sistémico causados pelo antibiótico, bem como a necessidade de uma elevada frequência de administração. Estas limitações, juntamente com o seu uso indiscriminado (Kodish, 2018) (automedicação e prescrição inadequada) e extremamente difundido, têm conduzido à proliferação de bactérias altamente resistentes aos antibióticos (Kalhapure, Suleman, Mocktar, Seedat, & Govender, 2015).

Tal como refere o Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos, 2018:

> "O aumento da resistência aos antibióticos é um problema de importância crescente à escala mundial, sendo imprudente subestimar as implicações desta situação e o seu consequente impacto, tais como o aumento da morbilidade e mortalidade, aumento do tempo de internamento e dos custos em saúde."

Assim, com o avanço do grave problema de saúde pública que são as bactérias multirresistentes, é necessário discutir novas abordagens terapêuticas. Embora alguns novos antibióticos estejam a ser desenvolvidos, o ritmo a que estes vão sendo colocados no mercado é significativamente inferior à velocidade a que surgem novas resistências (Sharma et al., 2012) (Figura 1) e, por isso, é extremamente necessário que

haja uma expansão das opções práticas e clínicas para o controlo de infeções (Andersson, Hughes, & Kubicek-Sutherland, 2016).

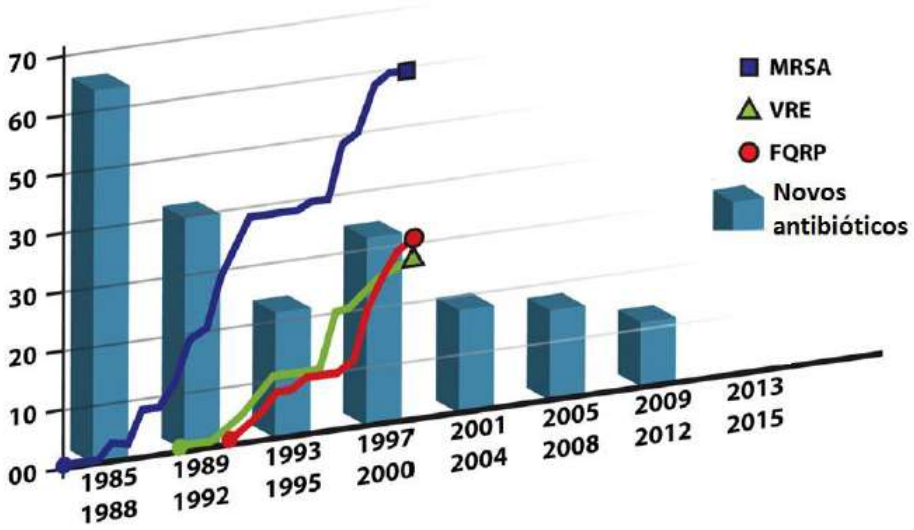

Figura 1 - Gráfico que permite comparar o aumento da resistência bacteriana (MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; VRE – *Enterococcus* resistentes à vancomicina; FQRP – *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas) e produção de novos antibióticos entre 1985 e 2012. Adaptado de Nunes (2015).

Deste modo, é importante agir rapidamente e estabelecer como prioridade formas de contornar este problema, o que significa que não basta apenas desenvolver novas moléculas antibióticas, mas que é também crucial criar alternativas para aumentar a efetividade das moléculas já existentes. Um exemplo dessa nova abordagem antibiótica é a incorporação de fármacos em sistemas de nanopartículas, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanopartículas inorgânicas, que ultimamente têm recebido uma atenção significativa (Figura 2) (Gao, Thamphiwatana, Angsantikul, & Zhang, 2014).

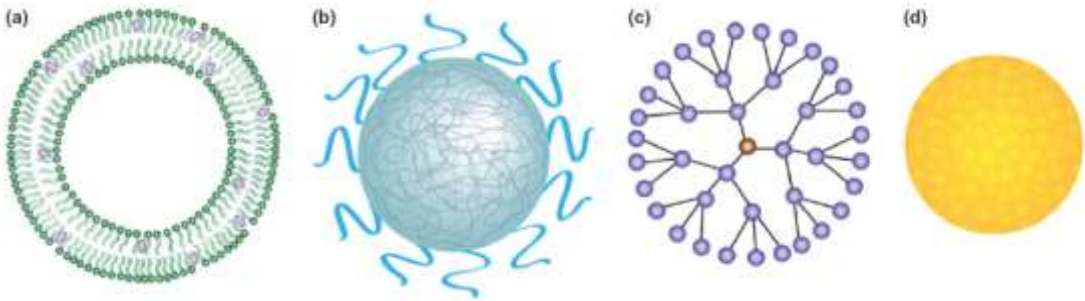

Figura 2 - Ilustração dos principais sistemas de nanopartículas utilizados na veiculação de antibióticos: (a) Lipossomas; (b) Nanopartículas poliméricas; (c) Dendrímeros; (d) Nanopartículas inorgânicas (Gao et al., 2014).

Segundo Gao et al. (2018), estes sistemas apresentam vantagens como o aumento da solubilidade do fármaco, reduzida captação pelo sistema imunitário, modulação das características de libertação do fármaco, vetorização aos locais específicos de infeção e administração de vários fármacos em simultâneo. Face a todas estas vantagens, estes sistemas são então capazes de melhorar o perfil farmacocinético e o índice terapêutico do antibiótico quando comparados com este livre, minimizando assim os efeitos secundários, aumentando a adesão à terapêutica e reduzindo o índice de resistência bacteriana (Huh & Kwon, 2011), evitando que a humanidade venha a enfrentar um futuro sem medicamentos indispensáveis para a cura de infeções potencialmente fatais.

2. Resistência bacteriana

Nos últimos anos, a resistência bacteriana, ou seja, a capacidade que as bactérias possuem de resistir aos efeitos de um ou mais antibióticos utilizados no seu tratamento e de continuar a proliferar na presença de doses consideradas terapêuticas (Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos, 2018), aumentou exponencialmente a nível mundial, tendo-se atingido uma "nova era pré-antibiótica", onde a sociedade é colocada em perigo todos os dias através das mais simples atividades (Rios et al., 2016).

As causas para o surgimento e disseminação da resistência bacteriana são complexas e impulsionadas por diversos fatores interligados entre si (WHO, 2001). Entre esses fatores destacam-se a automedicação, a prescrição e o uso inadequados dos antibióticos, sendo estes utilizados excessiva e indiscriminadamente pela população (Rios et al., 2016). Exemplo disso é o uso frequente que se verifica de antibióticos no tratamento de gripes e constipações comuns, bem como de outras infeções do trato respiratório, que são na sua grande maioria causadas por vírus, nos quais os antibióticos não exercem qualquer efeito. Nas últimas décadas, tem também sido observado um aumento do uso de antibióticos, em grande parte, causado pelo aumento do número de pessoas que necessitam de cuidados de saúde, como resultado do envelhecimento da população e o consequente aumento de doenças crónicas e infeções associadas aos cuidados de saúde (Rios et al., 2016). A Figura 3 mostra o consumo de diversos antibióticos em ambulatório (serviços de urgência, serviços de atendimento permanente, cuidados de saúde primários, cuidados continuados, consultórios privados e similares) entre os anos de 2013 e 2017. Da mesma, conclui-se que a classe mais consumida foi a dos antibióticos beta-lactâmicos e penicilinas, havendo um aumento no consumo ao longo destes anos.

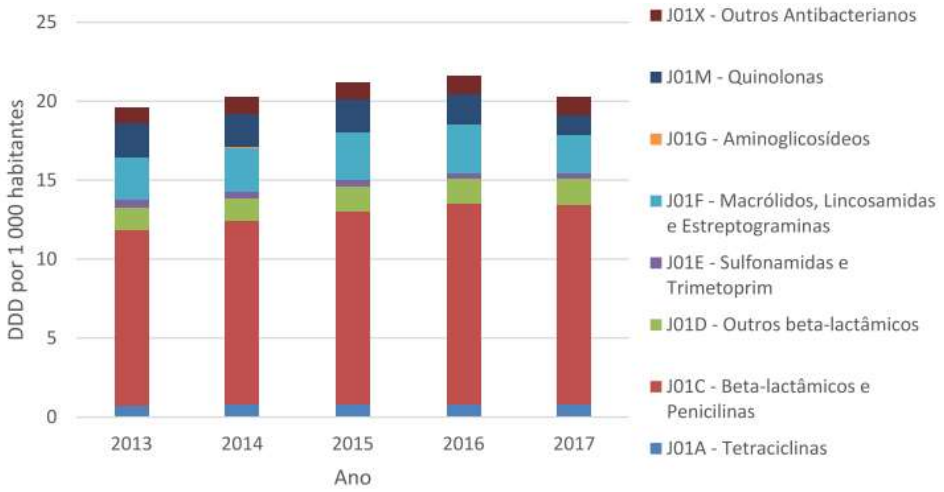

Figura 3 - Gráfico que retrata a evolução no consumo de antibióticos em ambulatório, por subclasse farmacológica, entre os anos de 2013 e 2017 (DDD – dose diária definida) (Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos, 2018).

Embora o maior uso de antibióticos ocorra na comunidade, a intensidade de uso nos hospitais é significativamente maior, o que lhes confere um papel particularmente importante na contenção da resistência bacteriana (WHO, 2001). Assim, é crucial desenvolver abordagens que permitam melhorar o uso dos antibióticos e reduzir a incidência e a disseminação de infeções nosocomiais, o que exigirá treino e alocação de recursos para uma vigilância eficaz, controlo de infeções e apoio terapêutico. Da leitura da Figura 4, é possível concluir que o consumo global de antibacterianos em meio hospitalar reduziu entre os anos de 2013 e 2017, principalmente devido à redução do consumo de quinolonas e aminoglicosídeos, o que é um aspeto positivo.

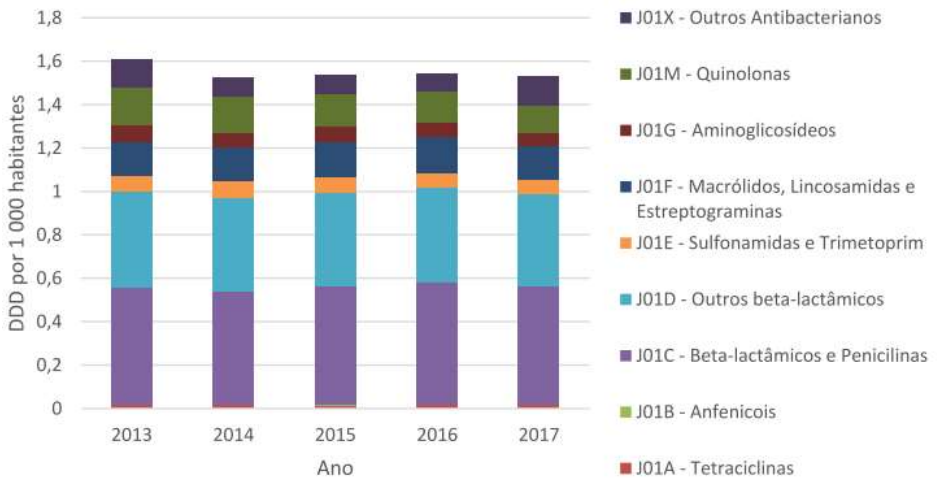

Figura 4 - Gráfico que retrata a evolução no consumo de antibióticos em meio hospitalar, por subclasse farmacológica, entre os anos de 2013 e 2017 (DDD – dose diária definida) (Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos, 2018).

Também o uso excessivo de antibióticos na agricultura e criação de gado torna a situação ainda mais alarmante, uma vez que induz a seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos (Fair & Tor, 2014). Neste campo, estima-se que aproximadamente 20% das infeções resistentes sejam transmitidas pela indústria alimentar, que são fortemente influenciadas pelo abuso de antibióticos na criação de gado (Hutnick & Pokorski, 2018). Outros fatores com influência na disseminação da resistência bacteriana são também a penetração deficiente do antibiótico no tecido isquémico, a toxicidade sistémica associada ao mesmo (a administração sistémica muitas vezes não é eficaz, uma vez que não permite atingir concentrações teciduais suficientes para eliminar as bactérias antes de incorrer em efeitos colaterais graves, como lesões renais e hepáticas) e a baixa adesão à terapêutica por parte do paciente (Brooks & Brooks, 2014). Importa também salientar o não cumprimento de medidas preventivas do controlo de infeções, como a correta lavagem das mãos e o isolamento de pacientes com infeções resistentes, bem como o aumento de procedimentos invasivos, com elevado risco de infeção por bactérias resistentes (Nunes, 2015).

Todos estes atos cada vez mais comuns não atingem os resultados terapêuticos esperados e conduzem ao desenvolvimento de estirpes bacterianas multirresistentes, algumas delas resistentes a todos os antibióticos disponíveis. Por esta razão, melhorar o uso desta classe farmacoterapêutica é uma prioridade para controlar o surgimento e disseminação da resistência (WHO, 2001), uma vez que se podem gerar situações críticas, dada a escassez de alternativas terapêuticas (Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos, 2018), ou em alguns casos até a inexistência das mesmas (Scorciapino, Serra, Manzo, & Rinaldi, 2017).

Só no ano de 2014, 210 000 pessoas morreram de tuberculose resistente a antibióticos, a qual é apenas uma de muitas doenças que se está a tornar incurável (Kodish, 2018). Em alguns países, até 50% dos casos de bacteriémia causados por *Klebsiella pneumoniae*, são resistentes aos carbapenemes − a classe mais potente de antibióticos (Kodish, 2018), utilizados como reserva hospitalar.

Atualmente, todos os anos morrem cerca de 700 000 pessoas devido a bactérias resistentes (Ghosh, Sarkar, Issa, & Haldar, 2019). Tal como é possível verificar através da Figura 5, estima-se que no ano de 2050 este número possa mesmo atingir os 10 milhões de mortes a nível mundial, com a Europa a situar-se nas 390 000 mortes. Parecendo 2050 um futuro relativamente distante, importa referir que falamos apenas de 30 anos, para que a mortalidade associada à resistência bacteriana aumente cerca de

catorze vezes. Estes números colocam-nos uma questão importante: terão os antibióticos o seu "tempo contado"?

Figura 5- Mapa-mundo com previsão da mortalidade anual atribuível à resistência a antibióticos em 2050 (Fernandes, Silva, Cruz, & Paiva, 2016).

Ora, esta situação como será de esperar, irá traduzir-se num impacto significativo a nível da economia dos países, uma vez que implicará tratamentos, hospitalizações e mortes. O Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (CEPCD) estabelece que, anualmente, 25 000 pessoas morrem de infeções causadas por bactérias multirresistentes e acrescentou ainda que estes custam cerca de 1,5 mil milhões de euros em serviços adicionais de saúde e perdas de produtividade por ano para a Europa (Rios et al., 2016). Além disso, microrganismos resistentes no ambiente hospitalar resultam em infeções hospitalares que são caras de controlar e extremamente difíceis de erradicar (WHO, 2001). Cada vez mais, isso resulta em escolhas difíceis: gastar dinheiro em medicamentos inúteis mas de custo inferior, usar medicamentos mais eficazes, porém mais dispendiosos ou aumentar os gastos com assistência médica de modo a apostar na prevenção (WHO, 2001).

Perante esta situação, estratégias de veiculação de fármacos para contornar as consequências da administração sistémica de antibióticos, tais como o desenvolvimento de resistências a múltiplos fármacos, toxicidade sistémica e aumento dos custos de saúde, são necessárias urgentemente (Brooks & Brooks, 2014).

Provavelmente, não existe uma solução completamente eficaz para travar a resistência bacteriana, pelo menos enquanto o uso de antibióticos for inevitável e feito de maneira incorreta (Nunes, 2015). Assim sendo, é importante sensibilizar as pessoas através da orientação da comunidade geral sobre o uso apropriado de antibióticos, a importância da adesão à terapêutica, a importância de medidas para prevenir a infeção, imunização, controlo de vetores, correta lavagem das mãos, higiene alimentar, incentivar o comportamento de procura de cuidados de saúde adequados e informados, aconselhar alternativas adequadas aos antibióticos para o alívio dos sintomas e desestimular o início do tratamento pelo paciente (WHO, 2001). Não menos importante é educar todos os membros dos cuidados de saúde, essencialmente prescritores, sobre a importância do uso correto dos antibióticos e a contenção da resistência bacteriana, promoção de programas educacionais de graduação e pós-graduação direcionados para o diagnóstico preciso e o controlo de infeções comuns a todos os profissionais de saúde, incluindo médicos veterinários (WHO, 2001). Assim, podem-se destacar medidas como a criação de programas de controlo de infeção, com base em boas práticas de higiene, estabelecimento de comités de terapêutica hospitalar que supervisionem o uso de antibióticos, desenvolvimento e atualização regular de diretrizes para tratamento de infeções e profilaxia, monitorização do uso de antibióticos (neste campo inclui-se a diminuição da automedicação, da disponibilidade do medicamento sem receita médica, do uso abusivo e irracional no ambulatório e em doentes hospitalizados, e dos antibióticos para uso veterinário e industria alimentar), incluindo quantidade e padrões de uso (WHO, 2001).

Aliado a isto, está claramente a necessidade não só de novos antibióticos, mas também a melhoria dos já existentes (Stebbins, Ouimet, & Uhrich, 2014). A descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos são as estratégias fulcrais no combate à resistência bacteriana, com especial necessidade de antibióticos com estruturas químicas que atuem em novos alvos terapêuticos, pois assim têm uma menor probabilidade de serem sensíveis a mecanismos de resistências preexistentes. Deste modo, enquanto por um lado se reúnem esforços para desenvolver novos antibióticos, por outro procura-se potenciar a eficácia de antibióticos já existentes, através de estratégias de veiculação de fármacos, utilizando nanotransportadores (Nunes, 2015). Atualmente, já vários fármacos, tais como a vancomicina, tobramicina, amoxicilina, gentamicina, cefamandol, cefalotina, e carbenicilina foram incorporados em sistemas de nanopartículas (Brooks & Brooks, 2014).

2.1. Mecanismos de Resistência

Atualmente podem ser consideradas 5 grandes classes de antibióticos: (1) os inibidores da síntese da parede bacteriana (o peptidoglicano é o alvo mais comum – a sua síntese pode ser inibida pelos antibióticos beta-lactâmicos [penicilinas, monobactamos, cefalosporinas, carbapenemes] e glicopéptidos [vancomincina]); (2) os ativos sobre a membrana celular (por exemplo as polimixinas); (3) os inibidores da síntese proteica (tetraciclinas, nitrofuranos, macrólidos [eritromicina, claritromicina], aminoglicosídeos [gentamicina], cloranfenicol, acido fusídico); (4) os inibidores dos ácidos nucleicos (é o caso das quinolonas [exemplo: ciprofloxacina]) e (5) os inibidores da síntese de ácido fólico (sulfonamidas e trimetoprim) (Nunes, 2015; Santos, Figueiredo, Azevedo, Braeckmans, & De Smedt, 2018).

O desenvolvimento de resistência ocorre, pelo menos, em três passos: a bactéria adquire genes de resistência, esses genes resistentes são expressos e de seguida ocorre uma seleção apenas de bactérias que produzem esses genes (Pelgrift & Friedman, 2013). Esses genes codificam vários mecanismos que permitem que os microrganismos resistam aos efeitos inibitórios de antibióticos específicos, mecanismos esses que oferecem resistência a outros antibióticos da mesma classe e, às vezes, a várias classes diferentes (WHO, 2001), atuando através da ligação a uma macromolécula biológica específica do microrganismo em causa e inibindo o crescimento bacteriano (bacteriostático) ou levando à morte celular (bactericida) (Hutnick & Pokorski, 2018).

Tal como se sabe, a resistência pode ser inata, quando depende das propriedades biológicas da bactéria (por exemplo, *E. coli* apresenta resistência intrínseca à vancomicina), ou adquirida, baseando-se na aquisição de genes de resistência, mutação do ácido desoxirribonucleico (DNA), ou combinação de ambos (Khameneh, Diab, Ghazvini, & Fazly Bazzaz, 2016). Dentro dessas classificações gerais, as bactérias podem modificar o antibiótico por meio de vários mecanismos (Figura 6) (Brooks & Brooks, 2014), tais como:

A) Alterações no DNA (Zazo, Colino, & Lanao, 2016), onde a resistência aparece através da expressão de genes específicos que conferem resistência à bactéria (Santos et al., 2018).

B) Alteração na permeabilidade (Zazo et al., 2016). Ao limitar o número ou alterar o tamanho das aberturas na parede celular, as bactérias resistentes podem impedir que os antibióticos entrem na célula, diminuindo assim a sua concentração no local de ação e tornando-os incapazes de exercer o seu efeito (Nunes, 2015; Hutnick & Pokorski, 2018). Exemplo deste mecanismo são as bactérias Gram-negativas, que por possuírem uma camada externa (membrana), podem usar essa membrana para impedir seletivamente a entrada de antibióticos.

C) Desenvolvimento de bombas de efluxo, que conduz à diminuição da concentração intracelular de fármaco (Rios et al., 2016), o que é especialmente importante quando o antibiótico atua a nível intracelular, pois não se atinge a concentração necessária à atividade antibacteriana (Nunes, 2015). É o caso da *Pseudomonas aeruginosa,* que pode produzir bombas de efluxo para expulsar do seu interior vários antibióticos como fluoroquinolonas, beta-lactâmicos, cloranfenicol, macrólidos e aminoglicosídeos (Khameneh et al., 2016).

D) Ativação de enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação do fármaco (Zazo et al., 2016), que modificam ou degradam quimicamente o antibiótico, tornando-o inativo (Rios et al., 2016). Por exemplo, bactérias *Klebsiella pneumoniae* produzem enzimas chamadas carbapenamases, que inativam os carbapenemes e a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos.

E) Biofilmes, compostos por matrizes poliméricas formadas por polissacáridos capazes de proteger o microrganismo dos antibióticos. Estes atuam dificultando a penetração de antibióticos no biofilme (o que limita o acesso ao alvo terapêutico), mudanças no material genético entre biofilmes, e alterações no metabolismo das bactérias (Khameneh et al., 2016; Forier et al., 2014).

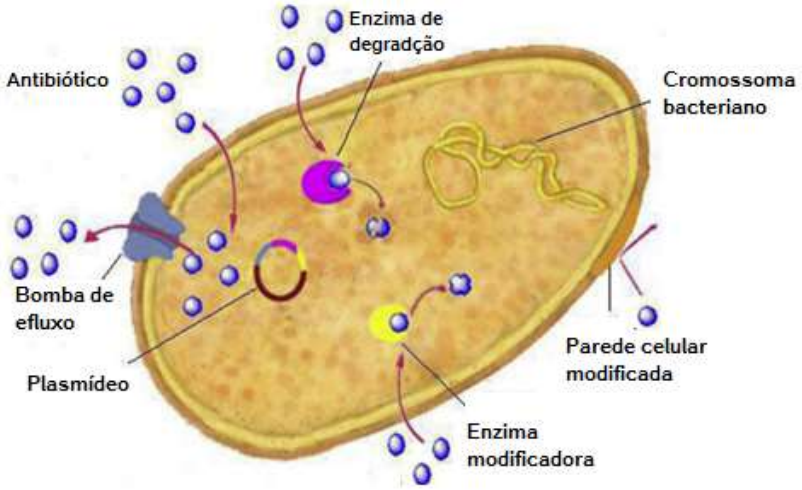

Figura 6 - Figura ilustrativa dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana. Inclui exemplos de bombas de efluxo, enzimas que inativam o antibiótico através de alterações na sua estrutura, enzimas que degradam o antibiótico e alterações da permeabilidade da parede bacteriana que impede a entrada do antibiótico. Adaptado de Khameneh et al. (2016).

3. Sistemas de Nanopartículas

3.1. Considerações gerais

Nos últimos anos, o uso de polímeros biomédicos tem ganho um destaque notório na comunidade científica devido às suas propriedades únicas, que permitem melhorar a veiculação de fármacos e reforçar a terapêutica antibiótica, auxiliando no combate à resistência (Hutnick & Pokorski, 2018), cada vez mais difícil de superar.

Nanopartículas são definidas pela literatura como aquelas cujo diâmetro varia entre 1 e 1000 nm (Harbison, Bourgeois, & Johnson, 2015; Kumar, Jalodia, Kumar, & Gautam, 2017), podendo ser utilizadas em dispositivos médicos, sistemas de veiculação de fármacos e sistemas de diagnóstico (Zazo et al., 2016). Embora a oncologia seja atualmente a principal área de aplicação dos sistemas de nanopartículas, estes também têm sido amplamente utilizados em áreas como a infeciologia, doenças do sistema nervoso central (CNS), doenças cardiovasculares e patologias oculares, entre outras.

O uso de sistemas de nanopartículas é particularmente interessante para infeções devido às falhas nos tratamentos causadas por resistências bacterianas e pela falta de novos fármacos em desenvolvimento, o que torna escassas as alternativas terapêuticas. Paralelamente, muitas bactérias estão localizadas intracelularmente em estado ativo ou latente, o que dificulta o acesso a vários fármacos e consequentemente condiciona a sua eficácia (Zazo et al., 2016).

Não obstante o seu papel crucial na saúde pública, importa ressalvar que os antibióticos também acarretam inúmeras desvantagens que condicionam o seu uso. Algumas dessas desvantagens são os efeitos adversos associados aos mesmos, uma vez que muitas das vezes são necessárias doses elevadas de fármaco para se obter efeito terapêutico, em que benefício nem sempre supera os riscos (Rizvi & Saleh, 2018); a degradação enzimática (Rizvi & Saleh, 2018); rápido aparecimento e evolução de resistências; baixo índice terapêutico; mecanismo de ação pouco específico e vias de administração menos convenientes (Sharma et al., 2012). Tudo isto condiciona a eficácia do tratamento muitas vezes devido à baixa adesão por parte do paciente.

De facto, devido ao seu pequeno tamanho e grande área de superfície, os sistemas de nanopartículas vêm contornar os problemas mencionados, uma vez que permitem reconhecer, ligar e veicular fármacos aos tecidos patológicos específicos com frequência e doses reduzidas e com libertação espacial e temporal controladas (Figura

7), de modo a minimizar ou evitar os efeitos colaterais induzidos pelos fármacos isolados em tecidos saudáveis (Lombardo, Kiselev, & Caccamo, 2019); apresentam maior solubilidade e, portanto, maior biodisponibilidade (Rizvi & Saleh, 2018; Resort & Hp, 2009) (o que permite utilizar diferentes vias de administração, como a via oral, ocular, subcutânea ou transdérmica (Zazo et al., 2016)); possuem maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), entrar no sistema pulmonar e ser absorvidos pelas *tight junctions* das células endoteliais da pele (Rizvi & Saleh, 2018); permitem otimizar as características físico-químicas dos medicamentos, facilitando o seu uso na prática clínica e a sua administração através de vias mais confortáveis para o paciente, resultando numa maior adesão à terapêutica (Kumar et al., 2017) e consequente diminuição da probabilidade de desenvolver resistências; são capazes de transportar diferentes fármacos numa única formulação (Tabela 1) (Zazo et al., 2016; Dawar et al., 2013; Resort & Hp, 2009) com o objetivo de ampliar o espetro antibiótico, gerar efeitos sinérgicos e neutralizar a resistência (dado que farmacocinéticas, biodistribuições, perfis de toxicidade e propriedades de transporte de membranas entre diferentes fármacos comprometem a sinergia dos fármacos *in vivo* (Gao et al., 2014)) sendo extremamente úteis no combate a inúmeras infeções, como por exemplo *Helicobacter pylori*, cujo tratamento é baseado em combinações de fármacos (Zazo et al., 2016); permitem uma vetorização específica (Dawar et al., 2013) (por exemplo, antibióticos potentes como a claritromicina podem ser veiculados aos pulmões após encapsulação, permitindo direcionar elevadas doses diretamente ao pulmão e minimizando os seus efeitos sistémicos (Hadinoto & Cheow, 2014)); aumento do tempo de permanência na circulação sanguínea (Gao et al., 2014); veiculação intracelular para impedir o desenvolvimento de bactérias resistentes a fármacos (Brooks & Brooks, 2014) (Pelgrift & Friedman, 2013), dado que aumentam concentrações de fármaco intracelular até 10 vezes (Zazo et al., 2016); melhor interação com os alvos terapêuticos (Lee, Yun, & Park, 2015).

Todas estas vantagens permitem um aumento da eficácia aliado a uma diminuição dos efeitos adversos (Lombardo et al., 2019), permitindo reutilizar antibióticos que não eram utilizados devido à falta de eficácia e segurança (Hutnick & Pokorski, 2018; Zhao & Jiang, 2013).

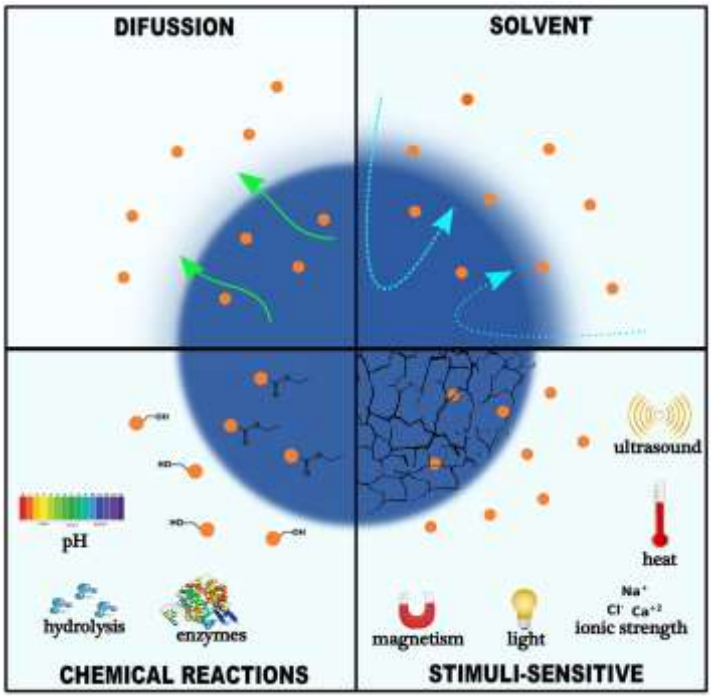

Figura 7 - Mecanismos de libertação controlada de fármacos em diferentes tipos de nanopartículas (Patra et al., 2018).

Tabela 1 - Associação de dois ou mais antibióticos em sistemas de nanopartículas. Adaptado de Gao et al (2014).

Sistema de NP	Formulação	Fármacos utilizados	Bactéria alvo
Lipossomas	DPPC, DMPG e colesterol	Gálio e gentamicina	*P. aeruginosa*
	DSPC e colesterol	Bi-EDT e tobramicina	*P. aeruginosa e Burkholderia cenocepacia*
	Lipossomas peguilados	Daptomicina e claritromicina	MRSA
	PG, PC e colesterol	Claritromicina e ofloxacina	*Mycobacterium avium*
	PC, SA e colesterol	Ciprofloxacina e vancomicina	MRSA
	PC, PEG-DSPE e colesterol	Gentamicina e ceftazidima	*Klebsiella pneumoniae*
	DPPC e colesterol	Isoniazida e rifampicina	*Mycobacterium tuberculosis*
	PC, PE, SA e colesterol	Amoxicilina trihidratada e citrato de bismuto ranitidina	*Helicobacter pylori*
	PAA, PAH, PC e colesterol	Amoxicilina e metronidazol	*H. pylori*
Nanopartículas poliméricas	PLGA	Rifampicina e azitromicina	*Chlamydia trachomatis e Chlamydia pneumoniae*
	PLGA	Rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol	*Mycobacterium tuberculosis*
	Alginato de sódio e quitosano	Rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol	*Mycobacterium tuberculosis*
	Quitosano e ácido glutâmico	Amoxicilina, claritromicina e omeprazol	*H. pylori*

DPPC – Dipalmitolfosfatidilcolina; **DMPG** – Dimiristolfosfatidilglicerol; **DOPE**: Dioleolfosfatidil etanolamina; **DOTAP**: 1,2-Dioleoloxi-3-trimetilamonio-propano; **DSPC** – Diestearolfosfatidilcolina; **DSPE** – 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **DPPC** – Dipalmitolfosfatidilcolina; PG – fosfatidilglicerol; PE - fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PLGA – ácido polilático co-glicólico); PAA – ácido poliacrílico; **PAH** – cloridrato de polialilamina; **SA** – estearilamina; **MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Apesar das suas qualidades irrefutáveis, é preciso também ter alguns cuidados com os sistemas de nanopartículas, pois estes apresentam também desvantagens como acumulação em tecidos e órgãos quando administrados por via intravenosa; elevada exposição sistémica a medicamentos administrados topicamente; nanotoxicidade (pulmão, rim, fígado, cérebro, células germinativas, metabólica, etc.) e falta de técnicas de caracterização que não sejam afetadas pelas propriedades das nanopartículas (Huh & Kwon, 2011).

De igual importância é evitar o reconhecimento destas partículas pelo sistema imunitário, de modo a que permaneçam mais tempo na circulação sanguínea exercendo assim o seu efeito (Rizvi & Saleh, 2018). Quanto mais hidrofóbica é uma nanopartícula, mais provável é que seja eliminada devido à maior ligação aos componentes sanguíneos, logo, parece lógico presumir que tornar a sua superfície hidrofílica possa vir a aumentar o seu tempo de circulação (Rizvi & Saleh, 2018). De facto, o revestimento das nanopartículas com polímeros como o polietilenoglicol (PEG) ou tensioativos diminui a opsonização. O PEG é um polímero hidrofílico e relativamente inerte que, quando incorporado na superfície das nanopartículas, dificulta a ligação destas às proteínas plasmáticas (opsonização), evitando assim a sua eliminação da circulação uma vez que não são detetadas pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS) (Rizvi & Saleh, 2018; Kawakami & Hashida, 2014).

3.2. Farmacocinética

O comportamento farmacocinético dos sistemas de nanopartículas depende de muitos aspetos. As características físico-químicas das nanopartículas (NP) e dos ligandos utilizados afetam a captação, devendo-se levar em conta que a sua toxicidade crónica é influenciada pela via de eliminação (Zazo et al., 2016).

Uma vez no local de ação, as nanopartículas devem ser capazes de libertar o fármaco para que este possa exercer o seu efeito (Zazo et al., 2016). Dependendo do tipo de nanopartícula utilizada, a libertação do fármaco dar-se-á de modo diferente (Rizvi & Saleh, 2018).

3.2.1. Distribuição das nanopartículas

Existem duas formas diferentes através das quais o fármaco se dirige ao local de ação: a vetorização passiva e a vetorização ativa (Hutnick & Pokorski, 2018).

A vetorização ativa ocorre quando o sistema de nanopartículas é conjugado a um ligando específico (Rizvi & Saleh, 2018), que favorece as interações com a membrana celular, aumentando assim o reconhecimento das nanopartículas pelas células alvo (Zazo et al., 2016). Estes podem ligar-se diretamente à superfície da nanopartícula ou fazê-lo por meio de um espaçador. Assim, o ligando é escolhido dependendo da sua estabilidade e seletividade em relação às células-alvo.

A vetorização passiva baseia-se na capacidade das células do sistema fagocítico mononuclear reconhecerem substâncias estranhas ao organismo (Zazo et al., 2016). A captação dessas substâncias pode ocorrer através de diferentes mecanismos, dependendo essencialmente do tamanho da partícula em questão. Quanto menores os sistemas, mais lenta a taxa de captação pelas células fagocitárias, mais rápida a biodistribuição devido à rápida dissolução, e maior a facilidade em alcançar o sistema linfático. O mecanismo mais frequente é a endocitose, devido ao pequeno tamanho típico dos sistemas de nanopartículas, o que pode afetar a libertação, a biodistribuição e a absorção. A endocitose consiste nas seguintes fases: adsorção à membrana celular; internalização da vesícula; fusão dos endossomas com os lisossomas (principal local onde se alojam as bactérias intracelulares), formando fagolisossomas; por fim, os enzimas lisossomais convertem os lípidos em ácidos gordos, levando à libertação dos fármacos, como representado na Figura 8.

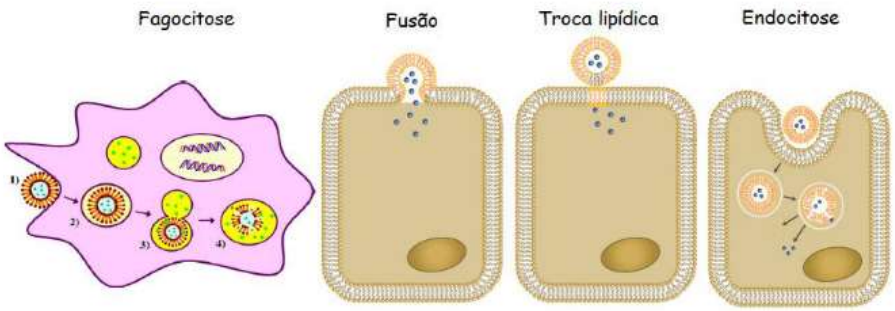

Figura 8 - Mecanismos através dos quais antibióticos encapsulados em lipossomas penetram em células fagocitárias. A imagem mais à esquerda representa as várias fases de fagocitose: 1) adsorção à membrana celular; 2) internalização da membrana; 3) fusão da vesícula com o lisossoma; 4) degradação do lipossoma e libertação do fármaco. À direita encontram-se os outros processos através dos quais existe penetração de antibióticos encapsulados por lipossomas, tais como a fusão, a troca lipídica e a endocitose (Nunes, 2015).

Este tipo de vetorização é possível devido à permeabilidade reduzida resultante do processo inflamatório, e é aqui que o efeito de maior permeação e retenção (EPR) tem sido amplamente aplicado (Lee et al., 2015). O efeito EPR resulta do aumento da permeabilidade da vasculatura que suporta os tecidos patológicos (tumores e tecidos inflamados) e do défice de drenagem que estes apresentam. De facto, nestes locais, existem desregulações na angiogénese e/ou aumento da expressão e ativação de fatores de permeabilidade produzidos por bactérias como protéases e lipopolissacáridos que geram poros que podem ir de 300 a 4700 nm. Isto permite que as nanopartículas extravasem e acumulem nas regiões infetadas (Sercombe et al., 2015; Gao et al., 2014; Hutnick & Pokorski, 2018).

A Figura 9 esquematiza os mecanismos de vetorização ativa e passiva.

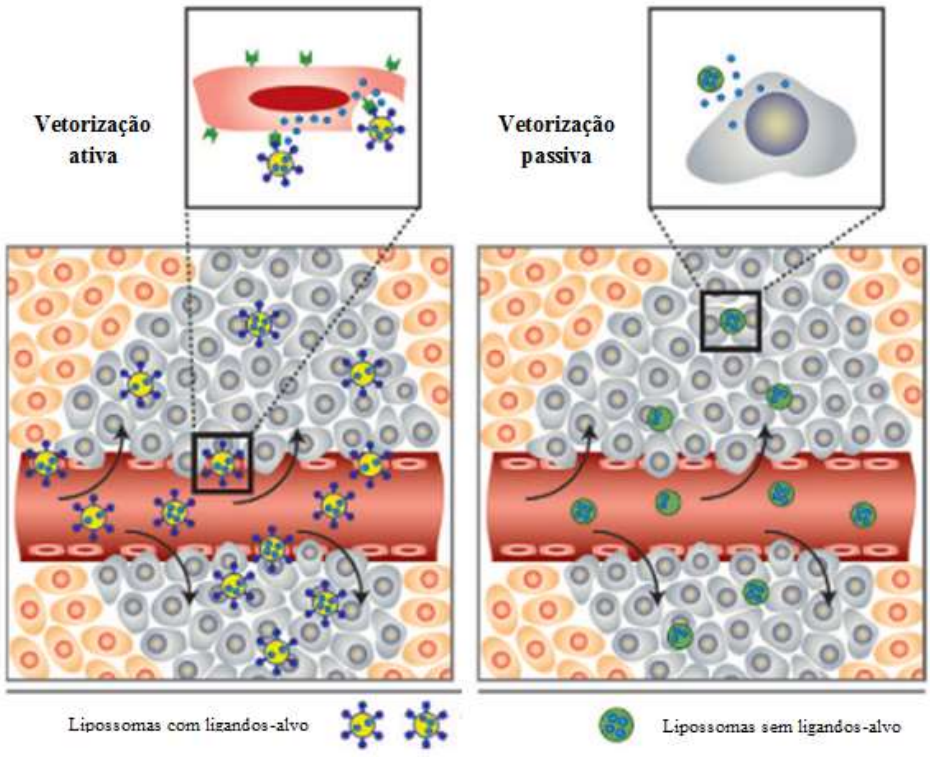

Figura 9 - Vetorização passiva vs vetorização ativa. Na figura mais à direita, é possível verificar uma vetorização passiva, onde as partículas tendem a extravasar passivamente através da vasculatura fragilizada, o que é característico dos tecidos inflamados (tecidos tumorais e/ou inflamados), e acabam por acumular devido ao efeito EPR. Neste caso, o fármaco pode ser libertado no meio extracelular e difundir através do tecido. Na figura à esquerda encontra-se representado o mecanismo de vetorização ativa. Neste, as nanopartículas são conjugadas com ligandos-alvo na sua superfície, que direcionam o fármaco diretamente ao local onde estes são necessários. Adaptado de Resort & Hp (2009).

3.2.2. Eliminação

Após a libertação completa do fármaco, caso o sistema de nanopartículas não tenha sido degradado, este deve sair da célula (Zazo et al., 2016), sendo o tamanho da nanopartícula determinante na sua eliminação. Dado que os sistemas vascular e linfático são responsáveis pela eliminação de substâncias estranhas, este é outro fator que deve ser pensado no sistema de nanopartículas ideal, uma vez que tem sido demonstrado que as partículas de 200 nm ou maiores tendem a ativar o sistema linfático e são removidas da circulação mais rapidamente (Rizvi & Saleh, 2018). A taxa de exocitose depende principalmente da composição da nanopartícula, dos ligandos e das propriedades da superfície. Nanopartículas carregadas positivamente têm uma taxa lenta de exocitose, uma vez que se aglomeram intracelularmente (Zazo et al., 2016). Por outro lado, os sistemas de nanopartículas peguilados têm a menor taxa de exocitose uma vez que têm muito poucas interações com proteínas intracelulares. A excreção das nanopartículas raramente ocorre pela urina e acontece somente quando estas apresentam tamanhos inferiores a 5 nm. Nanopartículas maiores são reabsorvidas e retidas na rede de colagénio da membrana basal glomerular, onde são absorvidas por macrófagos. A Figura 10 exemplifica a influencia do tamanho da nanopartícula na facilidade desta se movimentar através da vasculatura. NP menores que 200 nm são excretadas principalmente pela bílis; esse processo é lento e saturável e, portanto, existe sempre a possibilidade de ocorrer acumulação (Zazo et al., 2016).

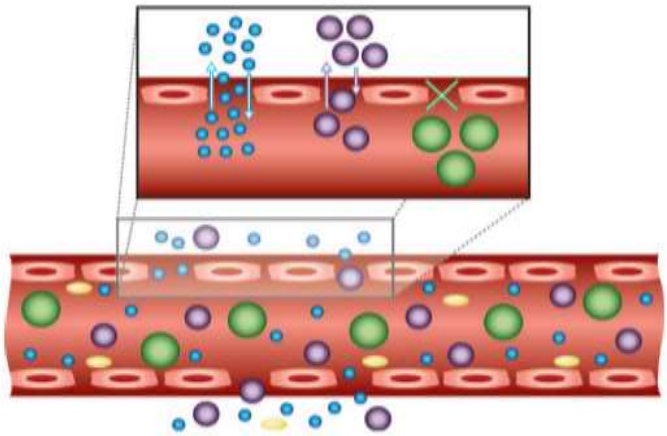

Figura 10 - Figura demonstrativa do impacto do tamanho e forma das nanopartículas na sua eficácia como sistemas de veiculação de fármacos. Quanto menor a nanopartícula, maior a facilidade desta se movimentar através da vasculatura. Adaptado de Resort & Hp (2009).

4. Nanopartículas orgânicas

As nanopartículas orgânicas são o tipo de nanopartículas mais estudadas e podem ser divididas em duas classes, as nanopartículas anfifílicas e que se formam espontaneamente e as nanopartículas de síntese (Zazo et al., 2016). Dentro das anfifílicas, encontram-se as micelas, as vesículas, os lipossomas e as nanopartículas lipídicas sólidas, enquanto as de síntese englobam os dendrímeros e os nanotubos de carbono (Lombardo et al., 2019) (Figura 11).

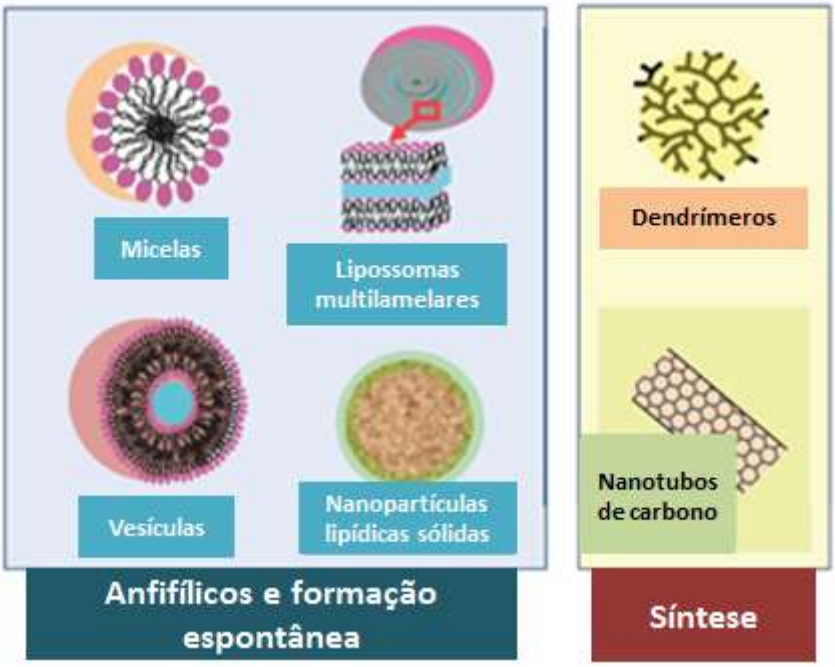

Figura 11 - Exemplos de nanopartículas orgânicas para aplicação em sistemas de veiculação de fármacos. Adaptado de Lombardo et al (2019).

4.1. Lipossomas

Os lipossomas são o tipo de nanopartícula mais estudado e utilizado até aos dias de hoje para a veiculação de fármacos (Huh & Kwon, 2011; Bozzuto & Molinari, 2015).

Embora a oncologia seja a área mais explorada para os lipossomas, sendo o primeiro composto veiculado por lipossomas aprovado pela FDA a doxorrubicina (Doxil®) em 1995 (Nunes, 2015), também a área da infeciologia tem sido bastante beneficiada com este tipo de sistemas (Bulbake, Doppalapudi, Kommineni, & Khan, 2017).

Estes sistemas foram descobertos em 1960 por *Alec D Bangham* na universidade de *Cambridge*, e consistem numa ou mais bicamadas lipídicas concêntricas de origem natural ou sintética (Bozzuto & Molinari, 2015; Immordino, Dosio, & Cattel, 2006; Sharma et al., 2012; Allen & Cullis, 2013), que espontaneamente formam estruturas enclausuradas que rodeiam um ambiente interno aquoso (Figura 12) (Jesorka & Orwar, 2008; Nunes, 2015) e cujo tamanho para aplicação médica ronda os 50 – 450 nm (Bozzuto & Molinari, 2015). Cada uma dessas bicamadas lipídicas contém lípidos anfipáticos, como a fosfatidilcolina (carga neutra), o ácido fosfatídico, o fosfatidilglicerol, a fosfatidilserina, a fosfatidiletanolamina ou a estearilamina (Jesorka & Orwar, 2008), incluindo também geralmente o colesterol para estabilizar o lipossoma por aumento da rigidez da membrana (Pelgrift & Friedman, 2013).

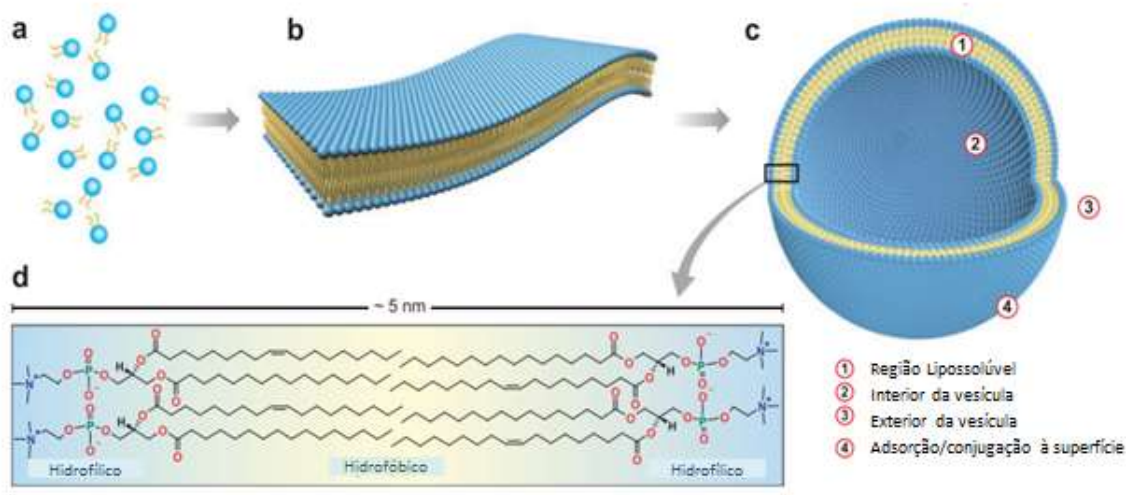

Figura 12 - Ilustração esquemática da formação espontânea de lipossomas: (a) fosfolípidos; (b) formação da bicamada lipídica; (c) formação do liposoma propriamente dito; (d) estrutura química da bicamada lipídica. Adaptado de Jesorka & Orwar (2008).

Os lipossomas parecem então ser o sistema de veiculação de fármacos ideal, não só devido à sua semelhança com as membranas biológicas, à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e vetorização para locais específicos (Nunes, 2015) mas também devido à sua capacidade de incorporar vários tipos de substâncias (Bozzuto & Molinari, 2015), uma vez que permitem incorporar tanto fármacos hidrofílicos no seu compartimento aquoso (ex.: isoniazida), como hidrofóbicos na bicamada lipídica (ex.: rifampicina), como mostra a Figura 13 (Huh & Kwon, 2011; Akbarzadeh et al., 2013; Gao et al., 2014). Ao estarem encapsulados em lipossomas, as moléculas de fármaco ficam protegidas de enzimas, soluções alcalinas, sais biliares, flora intestinal, radicais livres, oxidação e degradação (Akbarzadeh et al., 2013; Bozzuto & Molinari, 2015).

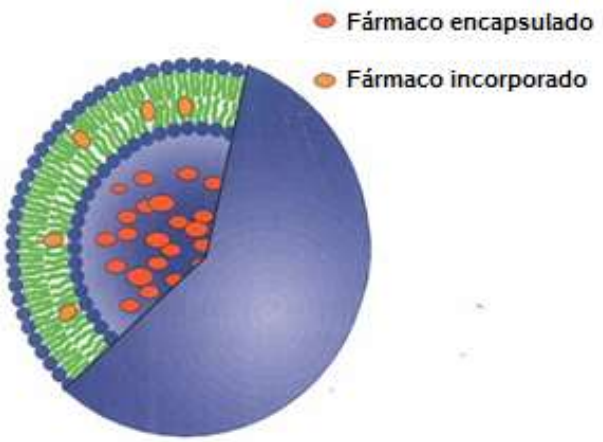

Figura 13 - Representação de encapsulação de fármacos em lipossomas: fármacos hidrofílicos encontram-se incorporados no núcleo aquoso enquanto fármacos hidrofóbicos se encontram encapsulados na bicamada lipídica. Adaptado de Brandl (2001).

4.1.1. Classificação

Os lipossomas podem ser classificados com base no número de lamelas, tamanho e método de preparação (Immordino et al., 2006). Quanto ao número de lamelas, i.e. número de bicamadas lipídicas que compõem o lipossoma, estes podem ser divididos em vesiculas unilamelares (ULV) quando compostos apenas por uma bicamada lipídica

(usados essencialmente na encapsulação de fármacos hidrofílicos), ou vesiculas multilamelares (MLV) quando compostos por múltiplas bicamadas concêntricas (melhor para fármacos hidrofóbicos) (Bozzuto & Molinari, 2015; Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). As ULV podem ainda ser classificadas quanto ao seu tamanho: destacando-se as pequenas vesículas unilamelares (SUV; de tamanho inferior a 100 nm), as grandes vesículas unilamelares (LUV; de tamanho superior a 100 nm e inferior a 1000 nm) e as gigantes vesículas unilamelares (GUV; quando o seu tamanho é superior a 1000 nm), conforme apresentado na Figura 14 (Nunes, 2015; Lombardo et al., 2019).

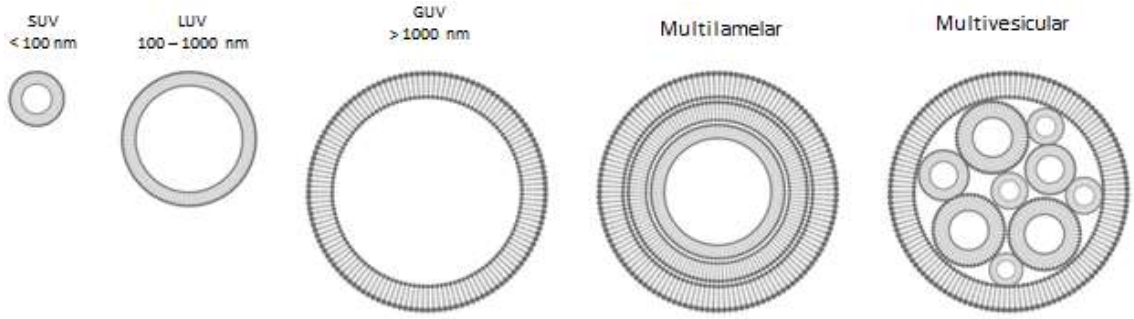

Figura 14 - Classificação de lipossomas com base no seu tamanho e número de lamelas. Pequenas vesículas unilamelares (SUV) apresentam um tamanho inferior a 100 nm, grandes vesículas unilamelares um tamanho compreendido entre 100 e 1000 nm, e vesículas unilamelares gigantes um tamanho superior a 1000 nm. As vesículas multilamelares apresentam várias bicamadas lipídicas, e as vesículas multivesiculares encapsulam várias vesículas mais pequenas no seu interior. Adaptado de Van Swaay & Demello (2013).

O tamanho dos lipossomas influencia a sua farmacocinética, distribuição aos tecidos e *clearance* (Sharma et al., 2012; Kraft et al., 2014; Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). Lipossomas com tamanhos superiores a 100-150 nm são frequentemente absorvidos pelas células fagocitárias ou permanecem nos tecidos por um período prolongado, acumulando-se no baço e no fígado para uma eventual eliminação. Assim, para evitar a captação pelo MPS e prolongar o tempo de circulação sanguínea, a maioria dos lipossomas e nanopartículas lipídicas são projetados com diâmetros de 50 a 100 nm para potenciar ao máximo os seus efeitos, uma vez que lipossomas e nanopartículas lipídicas abaixo de 50-80 nm sofrem uma depuração pelo MPS significativamente menor (Kraft et al., 2014).

Assim sendo, os lipossomas tornam-se então uma alternativa promissora para a veiculação de antibióticos devido às suas propriedades únicas. As suas propriedades podem ainda divergir, sendo os lipossomas divididos em quatro grandes grupos: lipossomas convencionais, lipossomas *stealth*, lipossomas com ligandos-alvo e lipossomas teranósticos, uma combinação dos três tipos anteriores (Nunes, 2015).

Os lipossomas convencionais foram a primeira geração de lipossomas (Sercombe et al., 2015) e são o tipo de vesículas mais utilizado, apesar das estruturas relativamente instáveis, da reduzida capacidade de transporte e encapsulação, para além dos problemas relacionados com a biodistribuição e vetorização (Nunes, 2015). Estes consistem numa bicamada lipídica composta por fosfolípidos catiónicos, aniónicos ou neutros e colesterol, este último utilizado para conferir estabilidade, rodeando um núcleo aquoso (Figura 15 e Figura 16A) (Sercombe et al., 2015).

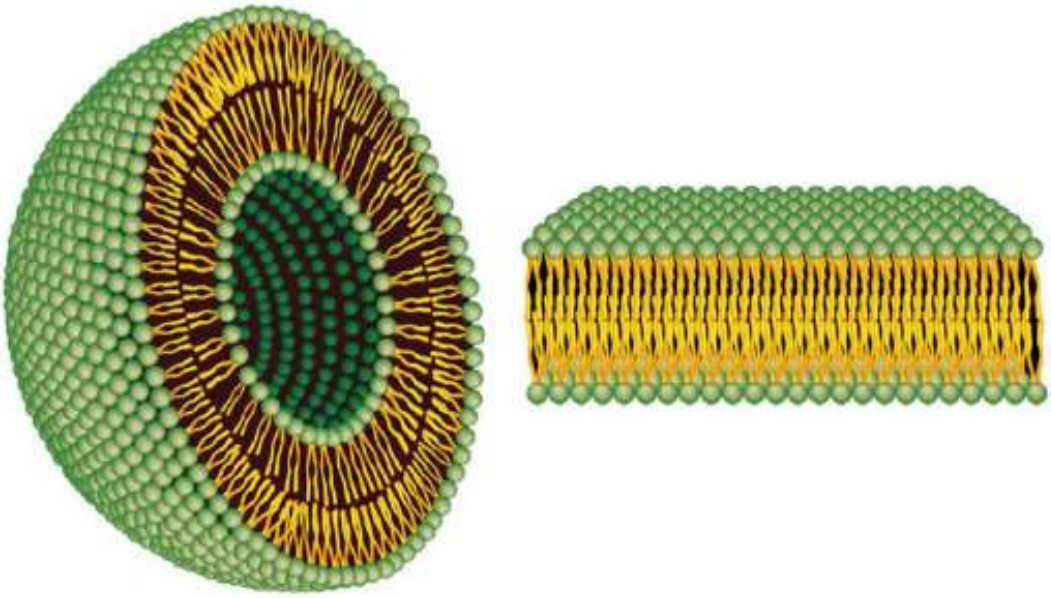

Figura 15 - Representação da organização de um lipossoma e da bicamada lipídica (Bozzuto & Molinari, 2015).

No entanto, estes eram rapidamente eliminados da corrente sanguínea, o que limitava a sua eficácia (Sercombe et al., 2015). Esta rápida eliminação deve-se ao reconhecimento destes como elementos estranhos ao nosso organismo pelo sistema

imunitário e acabam por ser opsonizados e captados pelo MPS, permanecendo menos tempo em circulação, devido a fatores como tamanho, carga e fluidez dos lipossomas (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). Esta redução do tempo de circulação e consequente limitação da eficácia conduziram à necessidade de criar uma alternativa.

Para aumentar a estabilidade dos lipossomas e aumentar o seu tempo de circulação, seguiu-se a criação de lipossomas estabilizados estericamente – os chamados lipossomas *stealth* – que consistem em lipossomas conjugados com um polímero hidrofílico de cadeia longa, na grande maioria PEG. Este polímero permite estabilizar os lipossomas uma vez que, ao torná-los mais hidrofílicos diminui a sua opsonização e reconhecimento pelo MPS (Figura 16B). Esta estratégia não só diminui a captação e aumenta o tempo de circulação e acumulação no local alvo (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010), como também diminui os efeitos adversos (Sercombe et al., 2015). Por exemplo, estudos levados a cabo em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em ratos mostram que a administração de ciprofloxacina livre duas vezes por dia em ratos, obteve os mesmos resultados que ciprofloxacina lipossomal administrada apenas uma vez por dia, verificando-se neste último caso aumento da permanência e concentração no sangue e tecidos da ciprofloxacina lipossomal (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010).

Outro tipo de lipossomas são os lipossomas ativos ou lipossomas com ligandos alvo. Estes oferecem a vantagem de veicular os fármacos ao local onde são necessários através da utilização de ligandos específicos. Aqui, vários tipos de ligando podem ser utilizados, tais como anticorpos, péptidos/proteínas e carbohidratos (ver Figura 16C). A utilização de anticorpos, especialmente monoclonais, cria os chamados imunolipossomas e representam um dos ligandos mais versáteis que podem ser conjugados à superfície dos lipossomas. Uma das vantagens dos anticorpos monoclonais é a sua estabilidade e a sua forte avidez para os recetores alvo devido à presença de dois locais de ligação na molécula (Sercombe et al., 2015).

Além dos três tipos de lipossomas acima referidos, uma nova geração de lipossomas surgiu, que utiliza uma combinação de características dos outros três tipos para potenciar o seu efeito, que são os lipossomas teranósticos (Figura 16D), que combinam a possibilidade de diagnóstico e de tratamento na mesma vesícula. Estes geralmente consistem numa nanopartícula com um ligando alvo, imagem e elemento terapêutico (Patra et al., 2018).

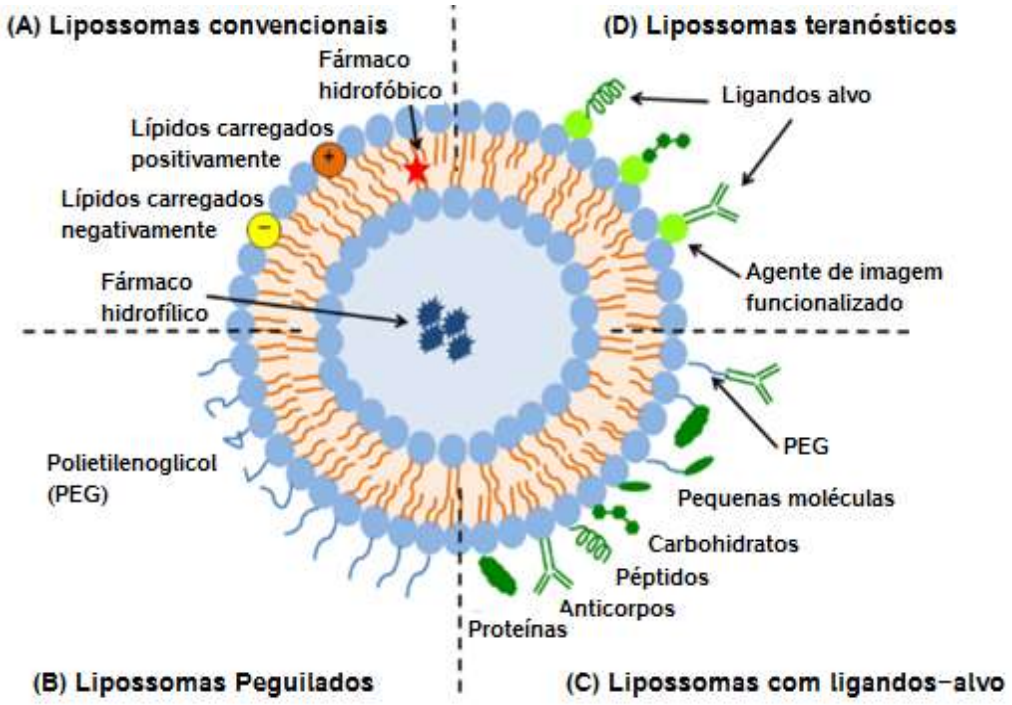

Figura 16 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas: (A) Lipossomas convencionais - lipossomas constituídos por uma bicamada lipídica que pode ser composta por fosfolípidos catiónicos, aniónicos ou neutros e colesterol, rodeando um núcleo aquoso. Tanto a bicamada lipídica como o núcleo aquoso podem incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos respetivamente; (b) Lipossomas peguilados – lipossomas com a sua superfície estabilizada estericamente através da adição de polímeros hidrofílicos como PEG; (c) Lipossomas com ligandos-alvo – lipossomas que podem ter conjugados na sua superfície ligandos ativos como anticorpos, péptidos, e carbohidratos que permitem uma vetorização ativa; (d) Lipossomas teranósticos – lipossomas que podem incorporar características dos três tipos anteriores. Adaptado de Sercombe et al (2015).

4.1.2. Métodos de preparação

A utilidade dos lipossomas numa ampla gama de aplicações determina a importância do desenvolvimento de métodos de produção cada vez mais robustos (Van Swaay & Demello, 2013). Existem vários métodos de preparação de lipossomas que originam vesículas que divergem no tamanho e características. A evaporação da fase reversa, reidratação e desidratação, injeção de etanol, injeção de éter e hidratação do filme lipídico (método mais reportado) são alguns desses métodos (Nunes, 2015).

A hidratação do filme lipídico é o método mais reportado na preparação de lipossomas e consiste na dissolução dos lípidos num ou mais solventes orgânicos, o qual é seguidamente removido por evaporação rotativa, formando um filme lipídico (Bulbake et al., 2017). Posteriormente, o filme lipídico é hidratado com um solvente aquoso, sob agitação vigorosa, favorecendo a formação de MLV com diferentes

tamanhos e número de camadas. No caso de o fármaco ser hidrofílico, este é incorporado na solução tampão, por outro lado, se for lipofílico é dissolvido na mistura lipídica (Bozzuto & Molinari, 2015; Nunes, 2015).

Para garantir o tamanho, o número de camadas e a homogeneidade desejados dos lipossomas produzidos com as técnicas mencionadas, é necessário que haja um processamento pós-formação (Bozzuto & Molinari, 2015). Técnicas como extrusão (homogeneizadores de alta pressão), sonicação e homogeneização são alguns dos métodos mais comuns para o processamento pós-formação para controlar o tamanho e a distribuição de tamanhos dos lipossomas (Bulbake et al., 2017; Jesorka & Orwar, 2008) (ver Figura 17).

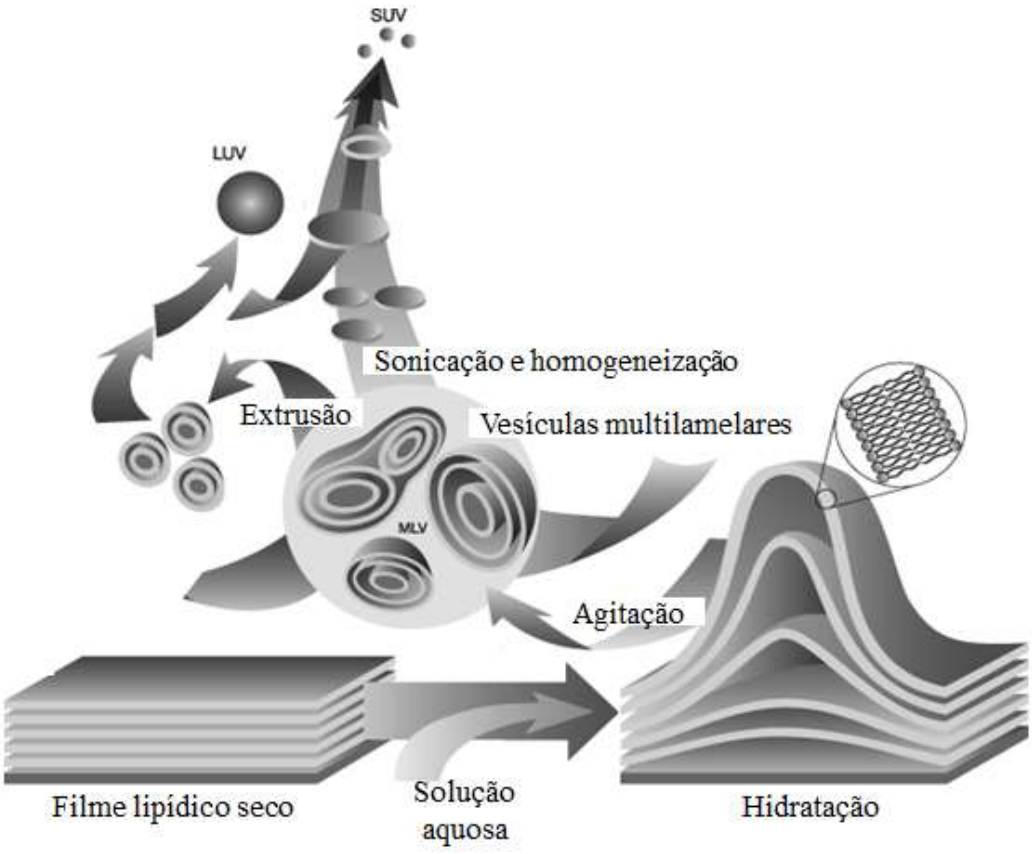

Figura 17 - Figura ilustrativa dos métodos de preparação de lipossomas e diferentes métodos pós-formação para controlar o tamanho e distribuição dos mesmos. Adaptado de Nunes (2015).

A sonicação é utilizada para reduzir o tamanho das vesículas. Isso pode ser obtido aplicando ultrassons às suspensões de MLV. As pequenas ULV resultantes são purificadas por ultracentrifugação. O método de extrusão por membrana reduz o

tamanho dos lipossomas (ULV ou MLV grandes) através da passagem por um filtro de membrana com um tamanho de poro definido. A homogeneização de alta pressão é um processo mecânico de fluidos que envolve a subdivisão de vesículas em tamanhos menores e ocorre numa válvula de homogeneização especial (Bozzuto & Molinari, 2015). A Figura 18 mostra algumas das diferentes técnicas de preparação de lipossomas organizados por número de lamelas e tamanho.

Figura 18 - Algumas das técnicas de preparação para diferentes tipos de lipossomas categorizados por número de lamelas e tamanho. Vesiculas MLV podem ser transformadas em unilamelares por meios mecânicos. Abreviaturas: GUV – vesiculas unilamelares gigantes; LUV – vesiculas unilamelares grandes; SUV – vesiculas unilamelares pequenas. Adaptado de Jesorka & Orwar (2008).

4.1.3. Vias de administração

São várias as vias de administração que podem ser utilizadas nos antibióticos lipossomais, podendo estas ser classificadas como invasivas (intraperitoneal, intramuscular, intravítrea, intravenosa) ou não invasivas (percutânea, oral, inalatória) (Nunes, 2015).

Dentro das vias invasivas, a via intravenosa é a mais utilizada para a veiculação de fármacos lipossomais (Brooks & Brooks, 2014).

A via intraperitoneal não é muito reportada em humanos, sendo mais frequente a sua utilização em animais (Nunes, 2015). As injeções intramusculares são bastante utilizadas para administrar antibióticos livres, mas não muito para fármacos

lipossomais. Também a via intravítrea para fármacos livres requer injeções frequentes, o que causa hemorragias na retina e torna pobre a adesão à terapêutica, tornando os lipossomas uma boa alternativa tendo em conta as suas características (que permitem uma libertação de fármaco prolongada com diminuição do número de injeções). Assim sendo, a via mais utilizada é efetivamente a via intravenosa, existindo nesta a desvantagem da rápida captação pelo MPS e o facto de as vesiculas necessitarem de ter um tamanho entre 100 a 200 nm (Nunes, 2015), conforme discutido anteriormente.

Relativamente às vias não invasivas, a via de administração por inalação é a mais frequente nos antibióticos lipossomais, através da utilização de pós secos (através de inaladores) ou de formulações líquidas (através de nebulizadores ou inaladores pressurizados) (Nunes, 2015). Administrar fármacos destinados aos pulmões por via sistémica torna-se invasivo e potencialmente tóxico para os restantes órgãos, dada a necessidade de concentrações mais elevadas para poderem atingir os pulmões (Huh & Kwon, 2011). Por via pulmonar, os fármacos encapsulados podem ser libertados diretamente no pulmão, o que se torna muito útil em doenças respiratórias, tornando os fármacos mais eficazes em doses mais baixas, reduzindo a sua toxicidade (Nunes, 2015).

A administração percutânea é atrativa, uma vez que é indolor, tem uma boa relação custo-benefício, não necessita de dispositivos para aplicação e permite geralmente uma boa adesão à terapêutica. Os lipossomas melhoram a penetração dos agentes na pele, mas não a permeação nas camadas epidérmicas inferiores (Jesorka & Orwar, 2008). O caso da clindamicina lipossomal é exemplificativo, pois já demonstrou aumentar a eficácia, no tratamento da acne *vulgaris*, devido ao incremento da penetração na pele (Nunes, 2015).

4.1.4. Farmacocinética

Uma das vantagens dos lipossomas consiste na libertação gradual e constante de fármaco, o que permite manter o mesmo na concentração pretendida, mais concretamente, acima da concentração mínima inibitória (MIC), durante um maior período de tempo (Nunes, 2015). Quando um lipossoma interage com uma célula, a libertação do fármaco e a sua distribuição na célula alvo podem ocorrer de várias formas (Figura 19). Os lipossomas podem adsorver na membrana das células, onde a bicamada

lipídica dos mesmos é degradada por enzimas ou por tensão mecânica. Este processo leva à libertação dos fármacos ativos no fluido extracelular, onde eles se podem difundir através da membrana celular para a célula alvo. Uma outra maneira requer a fusão da membrana do lipossoma com a membrana plasmática da célula-alvo: esse mecanismo permite a libertação do conteúdo do lipossoma diretamente no citoplasma da célula alvo. O terceiro e mais frequente mecanismo é a endocitose mediada por receptores. Quando os lipossomas são de maiores dimensões, são fagocitados por células especializadas do sistema imunitário, como macrófagos, monócitos e células de Kupffer.

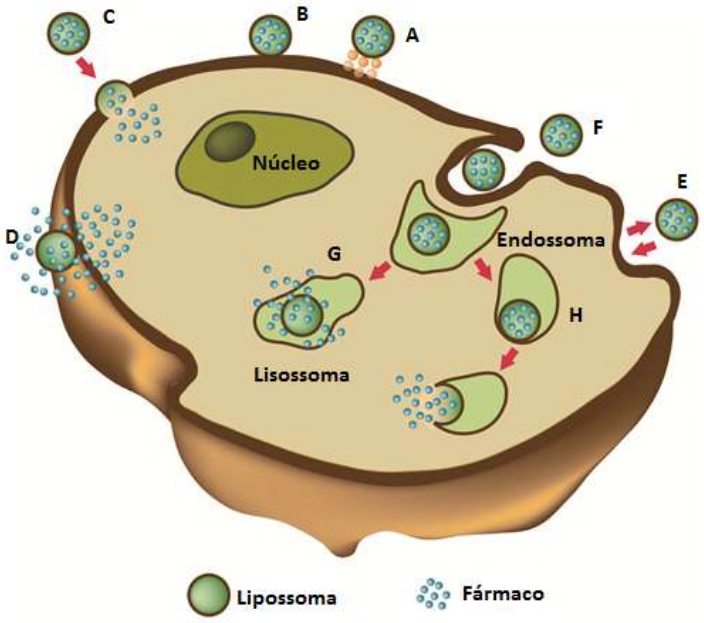

Figura 19 - Interação lipossoma-célula. Os lipossomas carregados com o fármaco interagem com a célula ligando-se à sua superfície (A). A absorção pela membrana plasmática também pode ocorrer através de interações eletrostáticas (B). A veiculação do fármaco pode ocorrer de diferentes modos. Os lipossomas fundem com a membrana plasmática e libertam o fármaco dentro da célula (C). Após interação com a célula, a estrutura do lipossoma pode ser afetada e o fármaco acaba por ser libertado (D). Também a troca de lipidos ca bicamada lipidica do lipossoma com a membrana celular pode ocorrer (E). Os lipossomas podem ser internalizados por endocitose (F). Os endossomas podem fundir com os lisossomas (G), e neste caso o baixo pH induz a degradação da membrana do lipossoma e o fármaco é libertado. Por fim, os lipossomas também podem libertar o fármaco após fusão ou destabilização da vesícula endocítica (H). Adaptado de Bozzuto & Molinari (2015).

Os lipossomas, apesar de mimetizarem as membranas biológicas, são reconhecidos como corpos estranhos pelo sistema imunológico e acabam por ser opsonizados, processo através do qual ocorre a fixação de moléculas que auxiliam no reconhecimento e captura pelo MPS (Nunes, 2015). Durante a circulação no sangue, os

lipossomas interagem com proteínas plasmáticas, como opsoninas, HDL e LDL. As opsoninas incluem imunoglobulinas e fibronectinas, que ajudam o MPS a reconhecer e eliminar os lipossomas, enquanto as proteínas HDL e LDL interagem com os lipossomas, reduzindo a sua estabilidade devido a transferências e rearranjos de lípidos na membrana do lipossoma, que conduz à sua rutura e consequente libertação do fármaco (Bozzuto & Molinari, 2015; Patra et al., 2018). No entanto, esta libertação causada pela opsonização pode ser útil no caso de infeções por bactérias intracelulares (Nunes, 2015) ou quando a infeção envolve os órgãos associados ao MPS (ver abaixo), onde a rápida captação dos lipossomas reduziu substancialmente sua distribuição a outros tecidos (Allen & Cullis, 2013; Bozzuto & Molinari, 2015).

O MPS é o principal local onde os lipossomas se acumulam após a sua administração sistémica, sendo os principais órgãos associados o fígado, baço, rins, pulmões, medula óssea e nódulos linfáticos. Dentro desta miríade, o fígado é o principal responsável pela captação de lipossomas, seguido do baço. Esta captação é feita pelos macrófagos, secundariamente à opsonização, e ocorre devido aos espaços existentes na sua microvasculatura, que exibem poros com diâmetros compreendidos entre os 100 e os 800 nm, permitindo o extravasamento e subsequente remoção da circulação da maioria dos lipossomas (Sercombe et al., 2015).

A opsonização pelas proteínas séricas depende de fatores como tamanho, estabilidade e carga superficial. Lipossomas grandes e/ou negativamente carregados são eliminados mais rapidamente quando comparados com lipossomas pequenos e neutros ou positivamente carregados (Sercombe et al., 2015). Vários estudos demonstram que lipossomas inferiores a 100 nm de diâmetro exibem menor interação com as proteínas plasmáticas, evitam a captura pelo MPS, apresentam maior tempo de circulação e acumulam mais fármaco no local de inflamação; já os lipossomas maiores foram eliminados mais rapidamente da circulação e não escaparam ao MPS (Bozzuto & Molinari, 2015). Também as vesículas rígidas ou electricamente neutras têm um maior tempo de circulação quando comparadas com vesículas mais fluídas ou com carga elétrica, embora estas últimas apresentem maior atividade antibacteriana. (Nunes, 2015).

É ainda importante referir que todos os lipossomas estão sujeitos ao efeito EPR, com os lipossomas peguilados a terem uma vantagem, devido à *clearance* reduzida pelo MPS e consequentemente maior tempo de circulação (Sercombe et al., 2015), o que

aumenta a biodisponibilidade do fármaco, dando tempo suficiente aos fármacos para transvasarem e chegarem ao seu local de ação (Kraft, Freeling, Wang, & Ho, 2014).

A par disto, a peguilação dos lipossomas mostrou aumentar drasticamente a sua estabilidade e tempo de circulação após administração IV, pois as vesículas ficam quase "invisíveis" para os macrófagos, evitando a sua captação (Bozzuto & Molinari, 2015). Conforme mencionado anteriormente, de facto, o PEG é um polímero linear biocompatível, solúvel em meio aquoso, não tóxico, muito pouco imunogénico, e com boa cinética de eliminação que pode aumentar o tempo de semivida dos fármacos até 45 horas. Este protege os lipossomas do MPS ao tornarem o lipossoma mais hidrofílico, impedido a sua interação com outras moléculas. O PEG previne também agregação e potencia o efeito EPR (Bozzuto & Molinari, 2015).

4.1.5. Ação em bactérias intracelulares

Um dos problemas encontrados na veiculação de fármacos prende-se com a necessidade de veiculação intracelular, dada a reduzida atividade do antibiótico no ambiente rico em ácidos e enzimas dos endossomas e lisossomas (Allen & Cullis, 2013) e à sua baixa captura pelas células fagocitárias (Nunes, 2015). Ora estes fatores, associados ainda ao aumento exponencial das resistências, fazem com que o tratamento deste tipo de infeções obrigue à utilização de combinações de antibióticos durante longos períodos de tempo, o que acarreta desvantagens a nível de toxicidade e adesão à terapêutica (Nunes, 2015). Neste campo, a aplicação de lipossomas como um sistema de veiculação de antibióticos a alvos intracelulares tem sido amplamente estudada e bastante bem-sucedida (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). Microrganismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila* e *Listeria monocytogenes* são captados pelos macrófagos alveolares, multiplicam-se intracelularmente e são resistentes a vários antibióticos (Huh & Kwon, 2011). Estudos reportam a erradicação de *Listeria monocytogenes* utilizando ampicilina encapsulada em lipossomas, que foi rapidamente fagocitada por macrófagos (Nunes, 2015).

Também gentamicina encapsulada em lipossomas foi utilizada para tratar infeções por brucelose, tendo-se verificado que os lipossomas foram captados pelo MPS no

fígado e baço, levando a uma diminuição do número de bactérias nos tecidos desses órgãos (Nunes, 2015).

Paralelamente, a vancomicina demonstrou uma melhoria significativa no tratamento de infeções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Nunes, 2015).

De um modo geral, no tratamento de infeções causadas por bactérias intracelulares, os lipossomas provaram melhorar a retenção dos fármacos nos tecidos alvo, proporcionaram uma libertação sustentada dos mesmos, diminuíram a toxicidade e aumentaram a concentração no local da infeção (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010).

4.1.6. Vantagens e desvantagens

As formulações lipossomais apresentam vantagens únicas que as tornam uma boa aposta para o combate à resistência bacteriana. Estas aumentam a eficácia e índice terapêutico dos fármacos, aumentam a estabilidade dos mesmos através da encapsulação, apresentam reduzida toxicidade, são biocompatíveis, biodegradáveis, não imunogénicas, diminuem a exposição de órgãos e tecidos sensíveis a fármacos tóxicos e permitem vetorizar o fármaco ao local alvo (Patra et al., 2018; Akbarzadeh et al., 2013; Jesorka & Orwar, 2008). No entanto, apesar das irrefutáveis vantagens, existem também algumas desvantagens associadas aos lipossomas, que os impedem de serem utilizados como seria desejado. Algumas dessas desvantagens são a baixa estabilidade química e física, baixa solubilidade, dificuldade na esterilização, toxicidade, custo elevado, complexidade do equipamento e possível desenvolvimento de reações alérgicas (Jesorka & Orwar, 2008; Nunes, 2015; Akbarzadeh et al., 2013).

A instabilidade dos lipossomas pode ser dividida em química ou física e depende essencialmente da composição lipídica, das condições de armazenamento e da temperatura (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). A instabilidade química pode ocorrer devido à hidrólise das ligações ésteres ou oxidação e/ou peroxidação de cadeias insaturadas de lípidos dos lipossomas, podendo ocorrer em fosfolípidos tanto naturais como sintéticos (Nunes, 2015). Por outro lado, a instabilidade física conduz a uma libertação precoce dos fármacos ou à agregação e/ou fusão dos lipossomas, formando partículas de maiores dimensões, o que acaba por influenciar a sua farmacocinética e

consequentemente, o seu índice terapêutico (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010; Nunes, 2015). A estabilidade das vesículas lipossomais pode ser aumentada através da adição de colesterol, que permite estabilizar a membrana (Drulis-Kawa et al., 2006a; Gubernator et al., 2007).

Um aspeto extremamente importante na preparação de medicamentos é a sua esterilidade. A esterilização dos lipossomas constitui uma condicionante para a sua utilização, uma vez que os seus processos têm problemas associados. Os procedimentos de esterilização para antibióticos lipossomais não podem envolver o uso de calor, radiação ou agentes químicos, dado que os lípidos são muito sensíveis a altas temperaturas e sofrem facilmente oxidação e hidrólise (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010). Um método útil para a esterilização dos lipossomas é a filtração mecânica, aplicável apenas para lipossomas com tamanho inferior às células bacterianas, tendo ainda o problema de não garantir a eliminação de partículas virais dado o reduzido tamanho destas (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010).

Como já foi referido, embora os lipossomas sejam biocompatíveis, é-lhes associada alguma toxicidade no caso de lipossomas carregados e vazios, devido à presença de carga elétrica lipossomal e de solventes orgânicos voláteis, ao contrário do que se verifica com lipossomas neutros.

Para além do custo bastante elevado, os métodos de preparação de lipossomas têm uma eficiência de encapsulação limitada (Brooks & Brooks, 2014), o que torna a aplicação destes bastante mais dispendiosa do que o tratamento com antibióticos convencionais.

Por acréscimo, os métodos de preparação de lipossomas à escala laboratorial são extremamente complexos e dispendiosos, dificultando a transposição de escala para a preparação industrial (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010).

4.1.7. Testes realizados em bactérias resistentes

Os lipossomas são capazes de superar alguns dos mecanismos de resistência das bactérias. Acredita-se que essa propriedade derive da sua estrutura semelhante à membrana celular, pois além de permitirem uma diminuição da captação do fármaco em questão, estes fundem-se com a membrana e veiculam o fármaco em elevadas doses diretamente ao local de infeção, saturando as bombas de efluxo e contornando um

mecanismo primário de resistência bacteriana. (Brooks & Brooks, 2014; Pelgrift & Friedman, 2013). Paralelamente, a incorporação de fármacos em lipossomas confere maior e mais rápida atividade antibacteriana, o que resulta na morte das bactérias antes que estas possam desenvolver mutações que confiram resistência aos antibióticos (Pelgrift & Friedman, 2013). Existem vários estudos que comprovam a maior eficácia de antibióticos encapsulados em lipossomas no tratamento de infeções causadas por bactérias resistentes assim como uma diminuição da toxicidade associada ao fármaco livre (Ismail & Gopinath, 2017).

Por exemplo, a administração sistémica de polimixina B, antibiótico eficaz no controlo de infecções por *P. aeruginosa*, é limitada devido a seus efeitos adversos tóxicos como nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular (Huh & Kwon, 2011). Estudos demonstram que polimixina B incorporada em lipossomas apresenta uma atividade antibacteriana aumentada contra *P. aeruginosa* resistente devido a disrupções na membrana externa da bactéria (Pelgrift & Friedman, 2013), verificando-se também uma redução drástica dos efeitos colaterais desta (Huh & Kwon, 2011).

O mesmo acontece com os aminoglicosídeos (Pelgrift & Friedman, 2013). Os lipossomas carregados com aminoglicosídeos interagem com a membrana externa de *P. aeruginosa* multirresistente, levando a alterações nocivas na membrana. Quando o lipossoma se funde com a célula bacteriana, são libertadas elevadas doses de fármaco na mesma, saturando as bombas de efluxo e suprimindo a resistência (Huh & Kwon, 2011).

Também a encapsulação de vancomicina e teicoplaninas em lipossomas aumentou a atividade bactericida contra MRSA (Pelgrift & Friedman, 2013). Num estudo em que é testada a eficácia da vancomicina lipossomal contra MRSA, verificou-se que a vancomicina livre é incapaz de eliminar as bactérias, pelo facto de ter uma reduzida penetração nas células fagocitárias (Nunes, 2015). Por outro lado, a utilização de vancomicina encapsulada em lipossomas convencionais apresentou uma concentração de antibiótico, no meio intracelular dos macrófagos, suficiente para exercer efeito bactericida contra MRSA. No entanto, lipossomas *stealth* não surtiram efeito em MRSA, provavelmente devido à fagocitose mais demorada, por efeito do PEG (Nunes, 2015).

4.1.8. Testes realizados em bactérias suscetíveis

A utilização de tratamentos de sucesso em bactérias sensíveis é tão importante como a sua eficácia nas bactérias resistentes, pois antibióticos encapsulados ao terem uma maior eficácia comparativamente aos antibióticos na sua forma livre, permitem um aumento da concentração intracelular de fármaco e uma diminuição da MIC, gerando uma menor probabilidade no desenvolvimento de resistências (Nunes, 2015).

Por exemplo, um estudo levado a cabo por Kim & Jones (2004), relata que a inibição do crescimento de *S. aureus* por lipossomas catiónicos contendo no seu interior benzilpenicilina encapsulada foi possível recorrendo concentrações mais baixas do fármaco quando comparados com o fármaco livre.

Verificou-se também noutro estudo que a ciprofloxacina lipossomal é rapidamente eliminada do sangue, mas que o fármaco permanece no fígado e no baço pelo menos 48h após a última administração, o que sugere que a ciprofloxacina lipossomal pode ser uma terapia eficaz para a infeção por Salmonela (Magallanes, Dijkstra, & Fierer, 1993).

Também para a amicacina lipossomal foi relatada uma distribuição alterada, bem como um tempo de semivida significativamente aumentado (Gangadharam et al., 1991).

Ainda a gentamicina e a ceftazidima lipossomais demonstraram maior tempo de circulação e vetorização ao local da infeção (Bakker-Woudenberg, Ten Kate, Stearne-Cullen, & Woodle, 1995).

4.1.9. Fármacos que beneficiam da abordagem

A amicacina encapsulada em lipossomas possui um elevado potencial, como se tem vindo a verificar em diversos estudos (Hickey, 2014).

Num dos estudos efectuados com a amicacina lipossomal MiKasome® (NeXstar Pharmaceuticals, EUA) destinada à erradicação de micobactérias, realizado em pacientes com tuberculose multirresistente durante 11 semanas verificou-se que MiKasome® foi bem tolerado e permitiu uma acumulação até 30 vezes maior quando comparado com amicacina livre. O tempo de eliminação foi de 180 horas para o MiKasome®, enquanto amicacina livre foi eliminada em 6 horas. Concluiu-se assim, que a administração de amicacina lipossomal foi benéfica, exibiu menor toxicidade e não gerou resistência aos antibióticos (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010).

Também em 2009 foram iniciados os ensaios clínicos para amicacina lipossomal Arikayce™ (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010), amicacina lipossomal em suspensão para inalação (Kaufman, 2019). No dia 28 de Setembro de 2018 Arikayce™ foi aprovado na Nova Jérsia pela FDA, produzido pela farmacêutica *Insmed, Bridgewater*, com indicação para tratamento de adultos infetados por *Mycobacterium avium complex* como parte de um regime terapêutico combinado, em doentes que após tratamento mínimo de 6 meses não obtiveram culturas negativas de expetoração ao fazer o regime terapêutico normal (Kaufman, 2019). Dado que é indicado no tratamento de infeções bacterianas graves (Bulbake et al., 2017), este deve ser utilizado apenas em último caso (Kaufman, 2019).

A *Aradigm Company* (*Hayward*, Califórnia) produziu Pulmaquin, uma formulação lipossomal de ciprofloxacina para o tratamento de infeções em pacientes com bronquiectasias não-FC. Em 2008, a segunda fase de ensaios clínicos foi realizada na Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido com pacientes com FC e com pacientes com bronquiectasia não FC infectados por *P. aeruginosa* (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010), e em 2016 foi iniciada a 3ª fase dos ensaios clínicos (Cipolla, Blanchard, & Gonda, 2016).

Também o hidrogel contendo doxiciclina monoidratada (NanoDOX®) para o tratamento da dermatite atópica com infeções de pele associadas se encontra atualmente em ensaios clínicos de fase II. Um estudo piloto de 6 semanas recentemente concluído revelou a segurança e a eficácia clínica do NanoDOX® Hydrogel na dermatite atópica com infeções bacterianas associadas. O medicamento em investigação foi bem tolerado, nenhum evento adverso local ou sistémico devido ao medicamento em investigação foi relatado durante o estudo, mas uma melhora clínica significativa foi observada ("ID — nanopharmaceutics.com," s.d.).

Gentamicina inalada (solução de inalação NanoGENT ™) é outro fármaco que está atualmente a ser desenvolvida para veiculação direta aos pulmões em casos de tuberculose (TB) e outras infeções gram-positivas, encontrando-se em ensaios clínicos de fase II. A gentamicina inalada foi testada num modelo murino infetado com tuberculose, tendo-se verificado que os tratados com gentamicina em aerossol mostraram cargas bacterianas pulmonares significativamente reduzidas e menos granulomas em relação aos controlos não tratados. Esses resultados sugerem que a administração direta de antibióticos ao sistema respiratório pode trazer benefícios

terapêuticos aos regimes de tratamento convencional para o tratamento da TB pulmonar ("ID — nanopharmaceutics.com," s.d.).

A Tabela 2 resume alguns outros estudos que demonstram a eficácia da encapsulação de antibióticos em lipossomas.

Tabela 2 - Estudos que demonstram resultados da encapsulação de antibióticos em lipossomas.

Fármaco	Células alvo	Resultados	Referência
Ampicilina	Neutrófilos e monócitos (ovelha)	Concentração intracelular mais elevada e maior tempo de retenção intracelular	Yazar et al., 2006
Ciprofloxacina	Macrófagos alveolares (rato)	Aumento da concentração intracelular de fármaco e dos seus efeitos antibióticos	Chono, Tanino, Seki, & Morimoto, 2008
Rifampicina	Macrófagos alveolares (rato)	Aumento da concentração de fármaco nos pulmões	Vyas, Kannan, Jain, Mishra, & Singh, 2004
Polimixina B	*Pseudomonas aeruginosa* (rato)	Diminuição da contagem de colónias bacterianas no pulmão; diminuição da lesão pulmonar causada por bactérias	Omri, Suntres, & Shek, 2002

4.2. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas representam outra classe de nanopartículas emergente na veiculação de antibióticos (Gao et al., 2014), uma vez que estas são frequentemente utilizadas para melhorar o valor terapêutico de vários fármacos, melhorando a sua biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção (Kumari, Yadav, & Yadav, 2010).

As nanopartículas poliméricas apresentam um tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001) e são compostas por uma matriz polimérica (Zazo et al., 2016) que pode ser constituída por polímeros naturais (como alginato, albumina, quitosano, dextrano, heparina e hialuronato), ou polímeros sintéticos (como poliésteres, policarbonatos, poliamidas e polipeptídos) (Lombardo et al., 2019).

Estas podem ser preparadas através de vários métodos, sendo crucial definir e controlar as condições de síntese, pois as mesmas também afetam as características das nanopartículas obtidas (Zazo et al., 2016).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em nanoesferas ou nanocápsulas, dependendo da sua estrutura, o que se relaciona com o seu método de preparação, tal como se encontra representado na Figura 20.

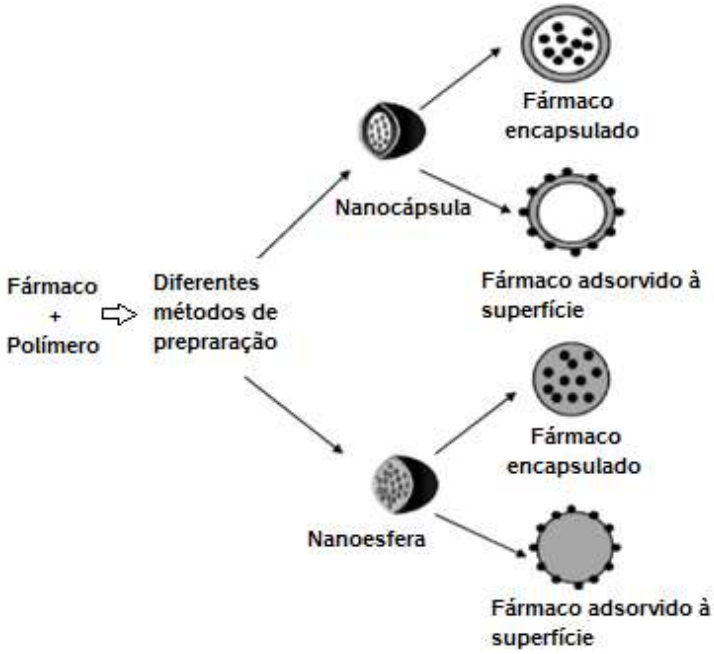

Figura 20 - Diferentes tipos de nanopartículas poliméricas: de acordo com a sua organização estrutural as nanopartículas podem ser classificadas em nanocápsulas ou nanoesferas, podendo o fármaco ser encapsulado no seu interior, ou adsorvidos à sua superfície. Adaptado de Kumari et al (2010).

Nanocápsulas são sistemas vesiculares heterogéneos em que o fármaco se encontra encapsulado no seu interior, rodeado por uma membrana de polímero e a sua libertação é controlada pela difusão do fármaco através da camada polimérica e, portanto, a difusibilidade do fármaco através desse polímero é um fator determinante da sua capacidade de veiculação (Rizvi & Saleh, 2018; Soppimath et al., 2001).

Já as nanoesferas são sistemas matriciais homogéneos em que o fármaco está disperso de modo uniforme em toda a matriz e é libertado pela erosão da matriz, havendo uma rápida libertação do fármaco (relacionada com a grande área de superfície da nanopartícula), seguida por uma libertação controlada (Rizvi & Saleh, 2018; Soppimath et al., 2001).

Dentro dos polímeros naturais, o quitosano é o mais frequentemente utilizado devido às suas propriedades mucoadesivas e antibacterianas e à facilidade com que este pode ser modificado quimicamente (Zazo et al., 2016). Existem pelo menos quatro métodos relatados para a preparação de nanopartículas de quitosano como gelificação ionotrópica, microemulsão, difusão de solvente de emulsificação e complexo de polieletrólitos (Kumari et al., 2010).

Dentro dos polímeros sintéticos, o mais comum é o ácido polilático co-glicólico (PLGA), tendo já vários sistemas de veiculação de fármacos compostos por PLGA sido aprovados pela FDA (Zazo et al., 2016). Este sofre hidrólise no organismo dando origem aos metabolitos biodegradáveis, ácido lático e ácido glicólico (Figura 21), e pode ser preparado através de métodos como emulsificação espontânea, evaporação de solvente, deposição interfacial e nanoprecipitação (Figura 22) (Kumari et al., 2010).

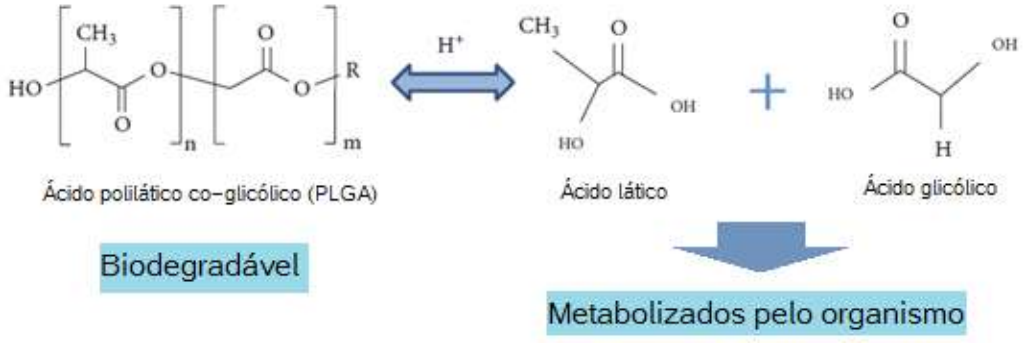

Figura 21 - Metabolização de PLGA, gerando dois produtos que são o ácido lático e o ácido glicólico, que são metabolizados e eliminados do organismo por métodos naturais como o ciclo de Krebs. Adaptado de Lombardo et al (2019).

O método mais utilizado para a preparação de nanopartículas de PLGA é a nanoprecipitação, onde o polímero dissolvido em acetona é adicionado gota a gota na fase aquosa em agitação contínua, com ou sem emulsificante, e em seguida a fase orgânica é evaporada sob pressão reduzida (Kumari et al., 2010).

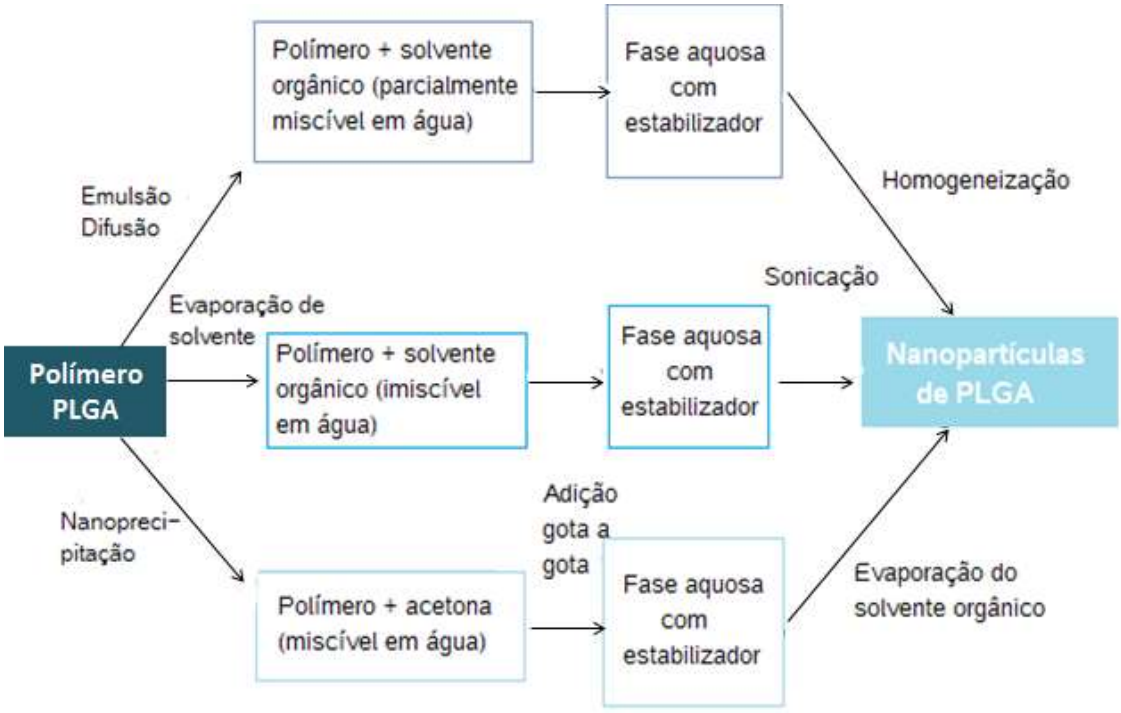

Figura 22 - Diferentes métodos de síntese de nanopartículas de PLGA. Estas partículas são essencialmente sintetizadas por difusão emulsão, evaporação de solvente e nanoprecipitação. Adaptado de Kumari et al (2010).

Outros tipos de polímeros sintéticos são por exemplo o ácido polilático (PLA), que é um material biocompatível e biodegradável que sofre cisão para dar origem a ácido lático como intermediário natural no metabolismo de carbohidratos (Kumari et al., 2010). As nanopartículas de PLA são preparadas essencialmente por evaporação de solvente, deslocamento de solvente e difusão de solvente. Por outro lado, a poli-ε-caprolactona (PCL) é degradada pela hidrólise das suas ligações éster em condições fisiológicas. As nanopartículas de PCL são preparadas principalmente por nanoprecipitação, deslocamento de solvente e evaporação de solvente (Kumari et al., 2010). Os poli-alquil-cianoacrilatos (PAC) são também polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que são degradados pelas esterases em fluidos biológicos; no entanto, estes produzem alguns produtos tóxicos que estimulam ou danificam o sistema nervoso

central, o que faz com que este polímero não esteja autorizado para utilização em humanos (Kumari et al., 2010).

Tal como acontece com os lipossomas, também as nanopartículas poliméricas podem transportar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (Zazo et al., 2016), e através de técnicas de emulsão, moléculas de fármaco hidrofóbicas e hidrofílicas podem ser co-encapsuladas no polímero. Como resultado, vários sistemas de nanopartículas poliméricas foram relatados para a veiculação de combinações de antibióticos (Gao et al., 2014).

O fármaco pode ser colocado no sistema de nanopartículas através de dois métodos: (a) Incorporação do fármaco no momento da produção da nanopartícula (método de incorporação) ou (b) adsorção do fármaco após a síntese da nanopartícula incubando o transportador com uma solução concentrada contendo o fármaco em questão (técnica de adsorção/absorção) (Kumar et al., 2017).

Entre as vantagens das nanopartículas poliméricas destacam-se a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, libertação controlada do fármaco, assim como facilidade no seu *design* e preparação e eficácia na veiculação de princípios ativos ao local desejado, bem como a sua versatilidade (Lombardo et al., 2019; Kumar et al., 2017; Gutiérrez et al., 2017).

4.2.1. Farmacocinética

A taxa de libertação do fármaco depende da sua solubilidade, da sua difusão na matriz polimérica, da degradação da matriz e da combinação dos processos de degradação/difusão (Kumar et al., 2017). Assim, a solubilidade, difusão e biodegradação da matriz condicionam o processo de libertação do fármaco. No caso das nanoesferas, em que o fármaco é distribuído homogeneamente, a libertação ocorre por difusão ou degradação da matriz. Quando o fármaco se difunde mais rapidamente do que a matriz se degrada, diz-se que a libertação é controlada por erosão (Kumar et al., 2017; Kumari et al., 2010).

Também as nanopartículas poliméricas podem ser vetorizadas ativamente ou passivamente. Na vetorização passiva, as nanopartículas acumulam-se nos locais inflamados devido às falhas na vasculatura, e na vetorização ativa, as nanopartículas têm conjugados na sua superfície ligandos-alvo capazes de interagir com o tecido

circundante (Kumari et al., 2010). Para aumentar a estabilidade e a circulação sistémica a longo prazo das nanopartículas, a sua superfície pode ser modificada.

O MPS elimina as NP da corrente sanguínea com eficiência, a menos que as partículas sejam preparadas para contornar o reconhecimento (Kumari et al., 2010). Quando as nanopartículas são administradas por via intravenosa, estas são reconhecidas como elementos estranhos pelo sistema imunológico e são fagocitadas. A hidrofobicidade da superfície das nanopartículas determina a adsorção de componentes sanguíneos, como as proteínas do sangue (opsoninas), influenciando assim o destino das nanopartículas *in vivo* (Kumar et al., 2017).

Tal como nos lipossomas, é possível tornar a superfície mais hidrofílica para evitar opsonização, através da adição de PEG, o polímero hidrofílico mais utilizado para a modificação da superfície do PLA (hidrofóbico) e do PLGA, ou poli-vinil pirrolidona (PVP), com vista a prolongar o seu tempo em circulação e atingir o seu alvo terapêutico (Lombardo et al., 2019). Partículas pequenas (<100 nm) com superfície hidrofílica têm a maior capacidade de evitar o MPS (Kumari et al., 2010).

4.2.2. Fármacos que beneficiam da abordagem

A combinação de rifampicina e azitromicina, administrada em nanopartículas de PLGA, demostrou melhor eficácia *in vitro* quando comparada com os fármacos livres, no tratamento de infeção por clamídia resistente (Gao et al., 2014; Toti et al., 2011).

Nanopartículas feitas de gliadina, uma proteína vegetal derivada do glúten de trigo, foram utilizados para co-encapsular claritromicina e omeprazol, tendo mostrado melhor eficácia contra a bactéria *H. pylori* em ratos (Gao et al., 2014).

Além disso, as nanopartículas de PLGA também foram usadas para administração oral de fármacos tuberculostáticos (Gao et al., 2014). Nesses estudos, três ou quatro fármacos de primeira linha, incluindo rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, foram co-encapsulados dentro de nanopartículas de PLGA através da técnica de emulsão, e a formulação resultante melhorou a atividade antibacteriana dos fármacos (Gao et al., 2014).

Três antibióticos de primeira linha no combate à tuberculose, rifampicina, isoniazida e pirazinamida foram co-encapsulados em nanopartículas de PLG. As concentrações terapêuticas nos tecidos foram mantidas por 9 e 11 dias, em contraste

com os fármacos livres que foram eliminados do plasma dentro de 12 e 24 h após a administração oral (Kumar et al., 2017).

Regra geral, os fármacos encapsulados em nanopartículas poliméricas apresentam-se mais eficazes do que os fármacos livres (Toti et al., 2011).

Estudos sugerem que a acumulação intracelular em combinação com a libertação prolongada do fármaco contribui para a maior eficácia dos antibióticos encapsulados em nanopartículas (Toti et al., 2011).

4.3. Micelas poliméricas

As micelas poliméricas têm sido amplamente investigadas na veiculação de fármacos. Estas consistem em nanoestruturas coloidais hidrofóbicas constituídas por polímeros (tais como poli-butilmetacrilato (PBMA), poliestireno (PLS), ácido poli lático (PLA), entre outros), que formam espontaneamente a estrutura micelar com um núcleo aquoso quando é atingida a concentração micelar crítica (Figura 23). As extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas formam o núcleo interno esférico e externo respetivamente, e apresentam um tamanho geralmente compreendido entre 5 e 100 nm. (Zazo et al., 2016; Patra et al., 2018; Gombotz & Hoffman, 2013).

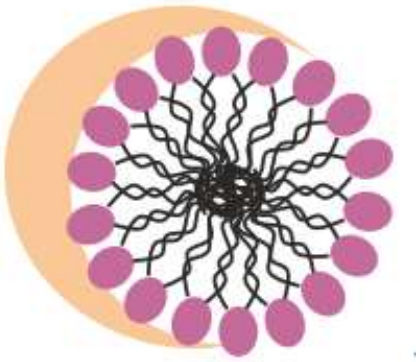

Figura 23 - Micela polimérica (Lombardo et al., 2019).

Ao contrário de outros sistemas de nanopartículas, estas apenas permitem a incorporação de compostos ativos hidrofóbicos encapsulados no seu núcleo, resultando num aumento significativo da estabilidade e solubilidade para estes fármacos (Forier et al., 2014), o que permite obter uma biodisponibilidade melhorada (Lombardo et al., 2019; Anirudhan, Parvathy, & Nair, 2016) ao mesmo tempo que o invólucro hidrofílico torna todo o sistema solúvel em água e estabiliza o núcleo.

4.3.1. Métodos de preparação

Existem vários métodos de preparação de micelas poliméricas. O método de evaporação do solvente é o mais utilizado. Neste método, o fármaco e o polímero são dissolvidos num solvente orgânico, formando-se um filme polimérico após a evaporação do solvente (S. S. Kesharwani, Kaur, Tummala, & Sangamwar, 2019). De seguida, esse filme é reconstituído numa fase aquosa, para obter micelas poliméricas conjugadas com fármaco. Outros métodos utilizados são o método da dissolução direta, método de diálise, método de evaporação do solvente em emulsões de óleo em água, liofilização, método da dispersão sólida e método da separação de microfases (S. S. Kesharwani et al., 2019).

Os fármacos são encapsulados nas micelas poliméricas por três metodologias distintas: como processo de dissolução direta, processo de evaporação de solvente ou processo de diálise (Patra et al., 2018).

4.3.2. Farmacocinética

À semelhança do discutido anteriormente para os outros sistemas, também as micelas poliméricas vão ser reconhecidas pelo sistema imunológico como corpos estranhos que devem ser eliminados. Micelas com um tamanho pequeno (<200 nm) reduzem a captação pelo MPS mantendo o efeito EPR em locais de infeção que apresentam fragilidades a nível dos tecidos (vetorização passiva) (Lombardo et al., 2019; Patra et al., 2018).

Também as micelas poliméricas podem beneficiar igualmente de vetorização ativa (S. S. Kesharwani et al., 2019), através da introdução de ligandos específicos da molécula alvo.

As micelas poliméricas apresentam diversas vantagens como a facilidade de preparação, tamanho de partícula pequeno e uniforme, elevada capacidade de encapsulação de medicamentos e libertação sustentada do fármaco (Anirudhan, Parvathy & Nair, 2016), baixo risco de toxicidade (porque se degradam em cadeias poliméricas únicas que podem ser facilmente excretadas e não apresentam toxicidade), são mais simples em comparação com lipossomas e NP poliméricas, possuem maior

estabilidade e biocompatibilidade, sendo ainda sistemas de custo inferior (Zazo et al., 2016).

4.3.3. Fármacos que beneficiam da abordagem

Um estudo realizado em 2016 investigou a capacidade de micelas poliméricas transportarem uma cefalosporina, cefixime, tendo-se verificado uma melhoria das propriedades do antibiótico quando comparado com este livre, o que leva a crer que as micelas poliméricas sejam uma boa alterativa para a libertação sustentada de fármacos hidrofóbicos (Anirudhan et al., 2016).

Um outro estudo recente testou a eficácia de rifampicina encapsulada em micelas poliméricas para inalação contra *Mycobacterium tuberculosis*. As micelas com a rifampicina encapsulada demonstraram uma libertação sustentada do fármaco, atividade microbicida melhorada *in vitro* e acumulação pulmonar *in vivo* das micelas por 24 horas (Grotz et al., 2019).

No geral, esta nova formulação representa uma plataforma nanotecnológica atraente para uma potencial terapia da tuberculose por via inalatória (Grotz et al., 2019).

4.4. Dendrímeros

Os dendrímeros surgiram como um dos sistemas de veiculação de fármacos mais promissores nos dias de hoje, devido à sua capacidade de atravessar as membranas celulares (P. Kesharwani, Jain, & Jain, 2014). Estes consistem em estruturas de tamanho nanométrico (1 a 1000 nm) (P. Kesharwani et al., 2014), com uma estrutura bem definida e homogénea, que contém unidades de ramificação simétricas e concêntricas (denominadas gerações) ligadas covalentemente a um núcleo central (Abbasi et al., 2014; Huang & Wu, 2018; Sherje, Jadhav, Dravyakar, & Kadam, 2018; Lombardo et al., 2019).

Um dendrímero consiste tipicamente em três domínios distintos (Figura 24): (i) um núcleo no centro do dendrímero que consiste num átomo ou molécula; (ii) ramificações, provenientes do núcleo, que se denominam "gerações" (iii) muitos grupos funcionais terminais, geralmente localizados na superfície da arquitetura dendrítica (P. Kesharwani et al., 2014). Esses grupos de superfície são essenciais na determinação das propriedades das macromoléculas dendríticas (P. Kesharwani et al., 2014; Chauhan & Kaul, 2018; Huang & Wu, 2018; Malkoch, Malmström, & Nyström, 2012).

O tamanho dos dendrímeros aumenta à medida que aumenta o numero de gerações dos mesmos, sendo na sua maioria, semelhantes a várias estruturas biológicas. Por exemplo, os dendrímeros PAMAM de 5,0 G (gerações) têm aproximadamente o mesmo tamanho e formato da hemoglobina (5,5 nm de diâmetro) (P. Kesharwani et al., 2014).

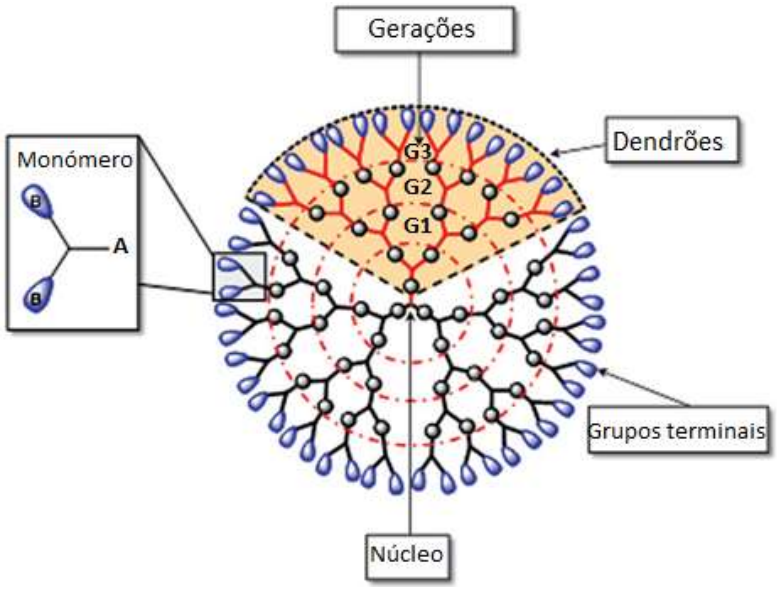

Figura 24 - Figura ilustrativa de um dendrímero e das suas características estruturais. Adaptado de Malkoch et al (2012).

Tal como acontece com os lipossomas, também os dendrímeros são capazes de transportar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, seja dentro das cavidades internas vazias ou seja nos grupos funcionais de superfície, respectivamente (Figura 25) (Sharma et al., 2012; Huh & Kwon, 2011), aumentando a solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos hidrofóbicos (Lombardo et al., 2019).

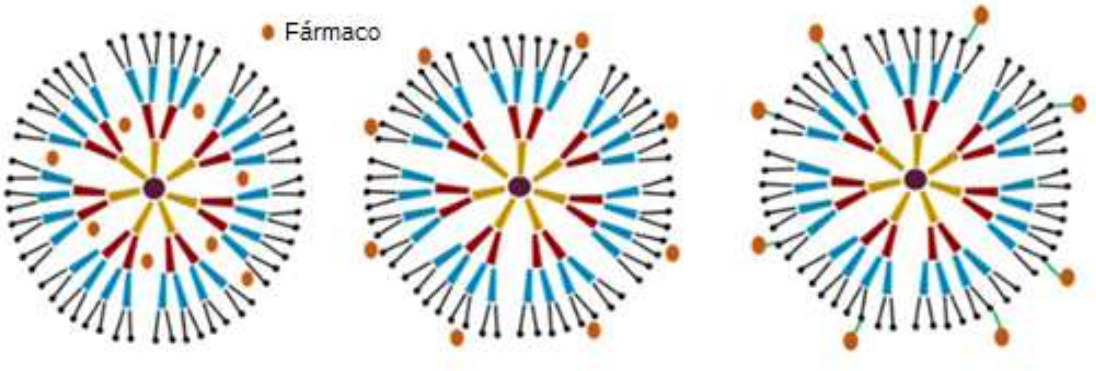

Figura 25 - Representação das várias formas de transporte de fármacos em dendrímeros: na imagem mais à esquerda é possível verificar a incorporação do fármaco hidrofóbico no interior das cavidades dendríticas; na imagem central verifica-se o fármaco conjugado na superfície do dendrímero; por fim, na imagem mais à direita verifica-se o fármaco conjugado na superfície do dendrímero por meio de um espaçador. Adaptado de Sherje et al (2018).

De um modo geral, os dendrímeros exercem a sua ação interagindo com as bicamadas lipídicas, o que causa destabilização da membrana, ao criar pequenos orifícios que acabam por levar à lise celular (Winnicka, Wroblewska, Wieczorek, Sacha, & Tryniszewska, 2013).

4.4.1. Tipos de dendrímeros

Os dendrímeros podem ser agrupados em vários tipos, de acordo com as suas propriedades (Figura 26): alguns desses tipos são os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), dendrímeros PPI, dendrímeros líquidos cristalinos, dendrímeros núcleo-revestimento, dendrímeros quirais, dendrímeros peptídicos, glicodendrímeros e dendrímeros PAMAMOS (Patra et al., 2018), sendo os mais utilizados no campo da antibioterapia os dendrímeros PAMAM (Patra et al., 2018).

As primeiras estruturas dendríticas a serem amplamente estudadas foram os chamados dendrímeros PAMAM (Huh & Kwon, 2011), sendo atualmente os mais utilizados (Patra et al., 2018). Os dendrímeros PAMAM são compostos biocompatíveis, solúveis em água, não imunogénicos (Winnicka et al., 2013) e traduzem-se em estruturas promissoras para veiculação de fármacos (Huh & Kwon, 2011).

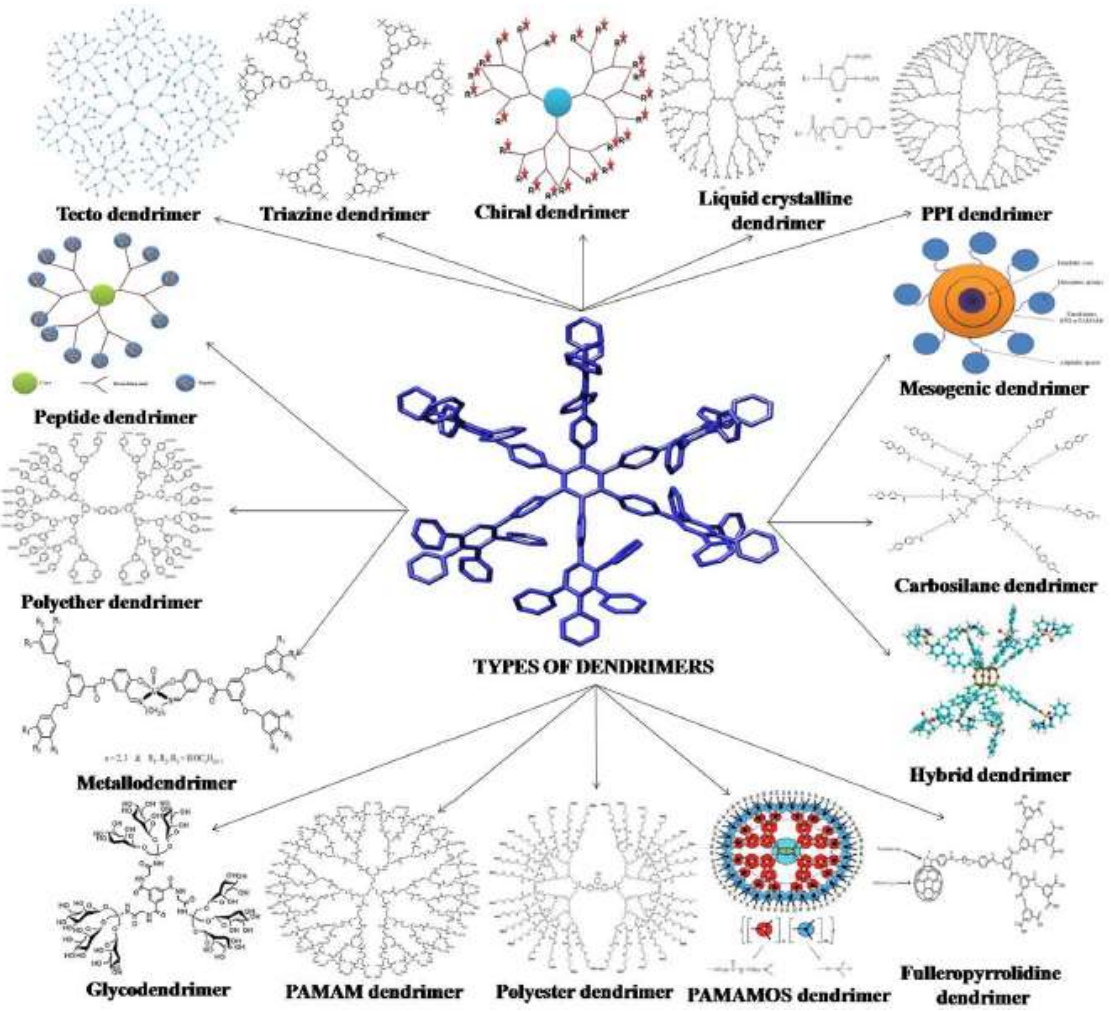

Figura 26 - Diferentes tipos de dendrímeros (P. Kesharwani et al., 2014).

4.4.2. Métodos de preparação

As reações em cascata são a base da síntese de dendrímeros (Abbasi et al., 2014), podendo estes ser sintetizados a partir de dois métodos distintos: o método divergente ou o método convergente (Malkoch et al., 2012; Abbasi et al., 2014), tal como mostra a

Figura 27. O método divergente foi o primeiro a ser reportado (Svenson & Tomalia, 2012; Malkoch et al., 2012). Este método compreende duas etapas, a primeira

é a ativação de grupos funcionais de superfície e a segunda é a adição de monómeros ramificados até que o dendrímero apresente o tamanho necessário (P. Kesharwani et al., 2014). Os dendrímeros PAMAM e PPI são preparados através deste método. Esta abordagem apresenta algumas vantagens adicionais, como a capacidade de modificar a superfície dos dendrímeros, alterando os grupos terminais na camada mais externa, e a possibilidade de configuração das propriedades químicas e físicas gerais do dendrímero em casos de necessidades específicas (P. Kesharwani et al., 2014; Malkoch et al., 2012).

O método convergente é um método alternativo para a síntese de dendrímeros (P. Kesharwani et al., 2014; Malkoch et al., 2012). Este forma-se, como o nome indica, de modo contrário ao método divergente, uma vez que se parte de fora para dentro. Quando os dendrões atingem a geração alvo, estes são anexados ao núcleo.(P. Kesharwani et al., 2014).

Além destas duas formas, outras abordagens como crescimento de *hipercores*, monómeros ramificados, crescimento exponencial duplo, química de lego e química de clique são também usadas (Malkoch et al., 2012; P. Kesharwani et al., 2014).

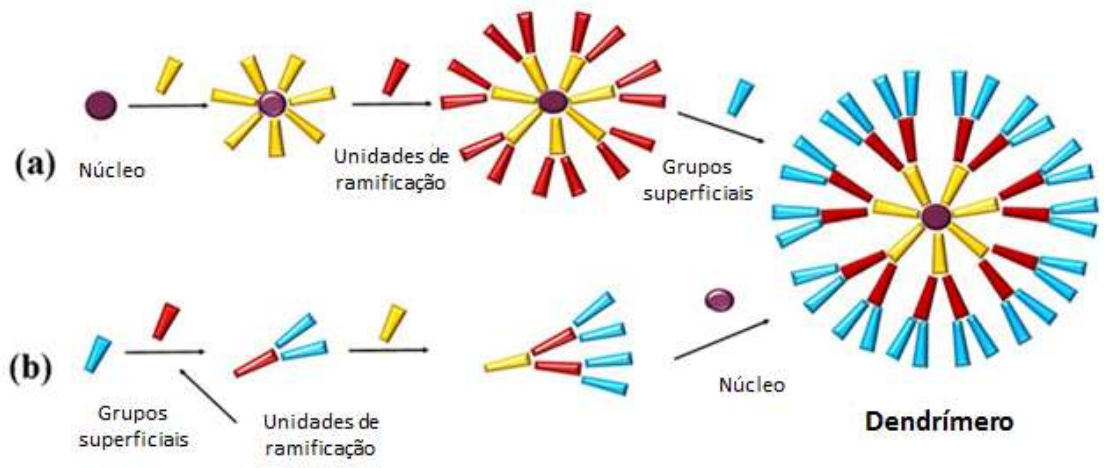

Figura 27 - Representação esquemática dos métodos de síntese de dendrímeros: (a) Síntese divergente; (b) Síntese convergente. Adaptado de Sherje et al (2018).

4.4.3. Farmacocinética

As propriedades farmacocinéticas são um dos aspectos mais significativos para o sucesso da aplicação dos dendrímeros como sistemas de veiculação de fármacos

(Abbasi et al., 2014). A farmacocinética destas macromoléculas depende principalmente das suas propriedades físico-químicas e das suas interações com os componentes biológicos (P. Kesharwani et al., 2014).

Os dendrímeros foram desenvolvidos para administração transdérmica, oral, ocular, intravenosa e pulmonar (Patra et al., 2018).

Tal como em todos os sistemas já discutidos nos capítulos anteriores, também os dendrímeros podem ser distribuídos por vetorização passiva ou vetorização ativa.

Do mesmo modo que ocorre com os outros sistemas de nanopartículas, também os dendrímeros beneficiam do efeito EPR observado em tecidos tumorais e tecidos inflamados (Malkoch et al., 2012), o que permite a acumulação do fármaco no local de infeção por vetorização passiva.

Uma vez que os dendrímeros são maioritariamente pequenos quando comparados com outros sistemas de nanopartículas, estes sofrem uma rápida eliminação pela urina, em comparação com moléculas de tamanhos superiores (Malkoch et al., 2012). Deste modo, para que estes alcancem uma concentração terapêutica eficaz no local de infeção, é necessário ter em conta a sua eliminação renal, hepática, a que ocorre por via do MPS, e também a acumulação passiva resultante do efeito EPR (Malkoch et al., 2012).

Por outro lado, os dendrímeros também possuem a capacidade de conjugar grupos funcionais nos seus grupos periféricos, tais como folatos e anticorpos, beneficiando assim de uma vetorização ativa que direciona o fármaco ao local de infeção através de ligandos-alvo (Figura 28) (Lombardo et al., 2019).

Independentemente da sua toxicidade, os dendrímeros foram considerados sistemas de veiculação de fármacos 'inteligentes', devido à sua capacidade de veicular fármacos intracelularmente, atravessar barreiras biológicas, permanecer em circulação durante o tempo necessário para exercer um efeito clínico significativo e por fim devido à sua capacidade de vetorização a estruturas específicas (P. Kesharwani et al., 2014). A toxicidade dos dendrímeros é atribuída principalmente ao seu grupo periférico. Geralmente, os dendrímeros PAMAM e PPI com terminação de amina exibem toxicidade dependente da concentração, enquanto os grupos neutros ou carregados negativamente mostraram menos toxicidade. Este comportamento citotóxico é explicado pelas interações entre as membranas celulares com carga negativa e a superfície dos dendrímeros com carga positiva, permitindo que esses dendrímeros adiram e danifiquem a membrana celular, causando a sua lise (Svenson & Tomalia, 2012; P. Kesharwani et al., 2014).

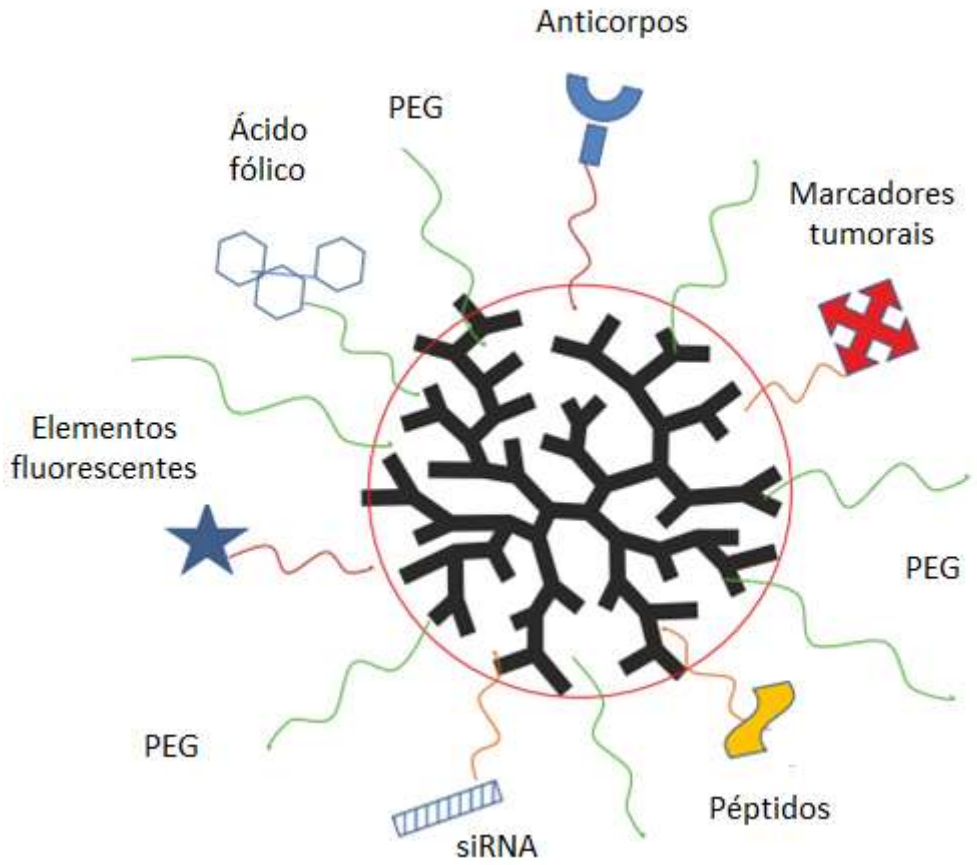

Figura 28 - Grupos funcionais conjugados na superfície dos dendrímeros. Adaptado de Lombardo et al (2019).

4.4.4. Fármacos que beneficiam da abordagem

Existem diversos fármacos, incluindo os antibióticos, que vêm a sua atividade melhorada quando associados a dendrímeros.

Por exemplo, dendrímeros PAMAM contendo sulfametoxazol encapsulado levaram à libertação sustentada do fármaco *in-vitro* e aumentaram a atividade antibacteriana contra *E. coli* 4 a 8 vezes, em comparação com o sulfametoxazol livre (Huh & Kwon, 2011).

As quinolonas insolúveis, que acabam por restringir o seu uso em aplicações tópicas devido à dificuldade de as incorporar em formulações líquidas, foram transportadas em dendrímeros PAMAM, originando não apenas uma excelente melhoria na solubilidade, como também uma atividade antibacteriana semelhante ou aumentada (Huh & Kwon, 2011; Winnicka et al., 2013).

Estudos indicam que dendrímeros conjugados com amoxicilina aumentam o seu

efeito antibacteriano. A administração concomitante de dendrímeros PPI e amoxicilina reduziu consideravelmente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Deste modo, pode-se concluir que a ação combinada de dendrímeros PPI com amoxicilina aumenta o efeito antibacteriano do antibiótico quando comparado com este isoladamente, o que indica a possibilidade de reduzir as doses de antibiótico no tratamento de infeções (Wrońska et al., 2015; Sherje et al., 2018).

Um outro estudo levado a cabo por Cheng et al. (2007) demonstrou que nadifloxacina e prulifloxacina quando encapsuladas em dendrímeros, não só apresentavam melhor solubilidade em meio aquoso como também um incremento da atividade antimicrobiana devido à penetração na membrana celular da bactéria.

Uma das propriedades dos dendrímeros é a sua capacidade de veicular fármacos intracelularmente.

Um estudo desenvolveu dendrímeros PAMAM conjugados com eritromicina para tratamento de inflamação periprotética através de veiculação intracelular de antibiótico a macrófagos. Verificou-se que o conjugado melhora a atividade da eritromicina contra a inflamação periprotética, melhora a solubilidade e permite uma libertação sustentada do fármaco (Bosnjakovic et al., 2011).

Da mesma forma, azitromicina associada com dendrímeros PAMAM mostrou-se eficiente na administração intracelular de azitromicina no tratamento da infeção por *Chlamydia trachomatis* (P. Kesharwani et al., 2014).

5. Nanopartículas inorgânicas

A utilização de nanopartículas inorgânicas como sistemas de veiculação de fármacos tem sido recentemente estudada.

Estas são, regra geral, compostas por duas regiões: um núcleo que contém um componente inorgânico (por exemplo ouro, sílica, óxido de ferro, entre outros) e uma região que cobre esse núcleo, normalmente composta por polímeros (ou metais) orgânicos que fornecem um substrato adequado para a conjugação de outras moléculas ou para proteger a região central de interações físico-químicas indesejadas com o microambiente biológico externo (Lombardo et al., 2019).

As nanopartículas inorgânicas possuem ainda diferentes tamanhos, formas, solubilidades e estabilidades a longo prazo (Zazo et al., 2016). Quando comparadas com as nanopartículas orgânicas, as metálicas podem ser menores, com um tamanho que varia entre 1 e 100 nm, sendo distribuídas principalmente pelo fígado, baço e gânglios linfáticos. Deste modo, este tipo de nanopartícula acaba por ser bastante útil no tratamento de doenças cujo alvo é o MPS (Zazo et al., 2016).

A Figura 29 retrata algumas das nanopartículas inorgânicas mais utilizadas como sistemas de veiculação de fármacos (Lombardo et al., 2019).

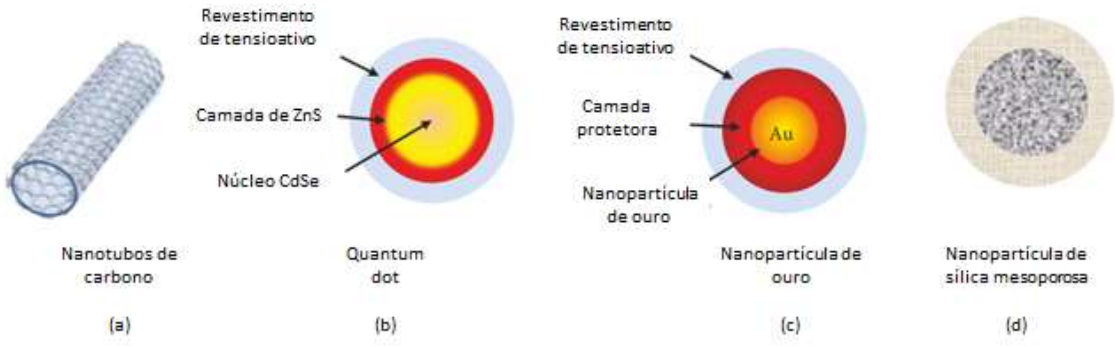

Figura 29 - Exemplos das nanopartículas inorgânicas mais utilizadas: (a) nanotubos de carbono; (b) quantum dot; (c) nanopartículas de ouro; (d) nanopartículas de sílica. Adaptado de Lombardo et al (2019).

A eliminação das nanopartículas metálicas é geralmente feita através da bílis, que constitui uma via lenta e saturável e por isso existe sempre o risco de acumulação no

organismo, o que pode acabar por induzir toxicidade. No entanto, isso depende do tipo de metal utilizado, uma vez que nem todos os metais são metabolizados e eliminados da mesma forma (Zazo et al., 2016).

Apesar das suas vantagens, as nanopartículas inorgânicas têm demonstrado sucesso limitado como sistemas de veiculação de fármacos devido a algumas desvantagens que apresentam. Estas incluem por exemplo pouca homogeneidade, problemas de agregação, metabolização e acumulação, capacidade limitada de encapsulação de fármacos e alto grau de toxicidade, dado que estes podem induzir imunotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade ou toxicidade pulmonar tanto em células saudáveis, quanto em células infetadas. Por isso, questões como a metabolização, a depuração, acumulação e efeitos a longo prazo ainda precisam de ser melhor investigados (Zazo et al., 2016; Lombardo et al., 2019).

Em particular, alguns dos nanomateriais inorgânicos, como nanopartículas de ouro e nanopartículas de sílica, encontraram obstáculos nos ensaios clínicos em fases iniciais, devido à toxicidade e à falta de estabilidade. Até ao momento, apenas três nanopartículas metálicas, mais concretamente de óxido de ferro, obtiveram aprovação pela FDA, duas das quais foram posteriormente retiradas do mercado (Lombardo et al., 2019). O NanoTherm^{TM} foi o único que obteve aprovação para uso clínico no tratamento de glioblastoma (Lombardo et al., 2019).

5.1. Nanopartículas de ouro (AuNP)

Nos últimos anos, têm vindo a surgir evidências que de facto as nanopartículas de ouro, devido às suas propriedades, podem ser adjuvantes no tratamento de infeções, contornando o problema da resistência bacteriana (Gutiérrez et al., 2017; Lombardo et al., 2019; Chavan SB, Kumbhar RR, & Deshmukh RB, 2013).

Estas são essencialmente compostas por um átomo de ouro que constitui o núcleo, rodeado por grupos reativos negativos na superfície que podem ser facilmente funcionalizados através da ligação iónica ou covalente de uma ampla gama de biomoléculas diferentes, incluindo fármacos e ligandos alvo que permitem uma vetorização ativa (Lombardo et al., 2019).

Geralmente, as nanopartículas de ouro sem modificação da superfície apresentam uma reduzida estabilidade quando em circulação. Para contornar esse efeito, tal como

nos outros sistemas de nanopartículas, pode ser adicionado à sua superfície um polímero hidrofílico, como PEG, para estabilizar a molécula e evitar a sua depuração (Lombardo et al., 2019).

Por exemplo, um estudo revela que nanopartículas de ouro associadas a vancomicina exibiram atividade antibacteriana melhorada relativamente a estirpes de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e também em estirpes de *E. coli* (Huh & Kwon, 2011).

Vários estudos relataram ainda fortes efeitos antibacterianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo estirpes resistentes, por nanopartículas de ouro associadas a antibióticos (por exemplo, nanopartículas de ouro revestidos com estreptomicina, gentamicina ou neomicina) (Huh & Kwon, 2011).

Num outro estudo, nanopartículas de ouro cobertas com quitosano e ampicilina mostraram um aumento de duas vezes da atividade antibacteriana, em comparação com a ampicilina no seu estado livre (Huh & Kwon, 2011).

Deste modo, as nanopartículas de ouro aparentam ser estruturas promissoras para a antibioterapia no tratamento de infeções bacterianas graves (Huh & Kwon, 2011).

5.2. Nanopartículas de prata (AgNP)

As nanopartículas de prata possuem propriedades antibacterianas intrínsecas (Fayaz et al., 2010) e são as nanopartículas inorgânicas mais utilizadas para este fim até aos dias de hoje (Zazo et al., 2016; Khameneh et al., 2016). Estas comprometem a estabilidade da membrana, dando origem a uma maior permeabilidade (Ellis et al., 2018; Khameneh et al., 2016; Chavan SB et al., 2013), o que acaba por facilitar a penetração de antibióticos intracelulares (Ellis et al., 2018).

O uso da prata para tratar infeções bacterianas tornou-se significativamente menos comum após a introdução da penicilina na década de 1940 (Huh & Kwon, 2011). O recente surgimento de bactérias resistentes a antibióticos e a eficácia limitada dos mesmos trouxeram de novo a hipótese do uso clínico da prata. Entre os diferentes tipos de NP metálicas, as nanopartículas de prata provaram ser as mais eficazes contra bactérias (Huh & Kwon, 2011), com diversos estudos a demonstrar o seu potencial.

Por exemplo, estudos reportam que o uso combinado de nanopartículas de prata com antibióticos, como penicilina G, amoxicilina, eritromicina e vancomicina, resultou

em efeitos antibacterianos melhorados e sinérgicos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (por exemplo, *E. coli* e *S. aureus*) (Shahverdi, Fakhimi, Shahverdi, & Minaian, 2007; Fayaz et al., 2010; Huh & Kwon, 2011).

Foi ainda demonstrado que as nanopartículas de prata exercem atividade bactericida contra *P. aeruginosa* multirresistente, *E. coli* resistente à ampicilina e *S. pyogenes* resistentes à eritromicina, e ainda atividade anti-biofilme contra *S. epidermidis* (Khameneh et al., 2016).

Um outro estudo, levado a cabo no ano de 2008, avaliou a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata quando associadas a vários antibióticos, tendo concluído que a atividade da ampicilina, canamicina, eritromicina e cloranfenicol aumentou na presença das nanopartículas de prata. Estes resultados mostram que a combinação de antibióticos com nanopartículas de prata permite obter melhores efeitos antibacterianos (Fayaz et al., 2010).

6. Conclusões e perspetivas futuras

A resistência bacteriana tem aumentado exponencialmente e não existe arsenal terapêutico que consiga colmatar a situação, dado a existência de bactérias por vezes resistentes a todos os antibióticos disponíveis.

Isto alerta-nos para o perigo de virmos a enfrentar um futuro sem antibióticos eficazes e para a consequente necessidade urgente de contornar este problema, seja através de medidas específicas que visem melhorar a utilização dos antibióticos (pois o desenvolvimento de resistência é inerente ao mau uso dos mesmos), seja através da criação de novas abordagens terapêuticas.

É no contexto desta abordagem que se inserem as nanopartículas como sistemas de veiculação de antibióticos. As inúmeras vantagens descritas, permitem não só superar alguns dos mecanismos de resistência (como a permeabilidade reduzida das bactérias e as bombas de efluxo que não permitem que o antibiótico permaneça no interior da célula), mas também o aumento do índice terapêutico, a libertação sustentada e um menor registo de efeitos adversos, o que acaba por melhorar a adesão à terapêutica e, consequentemente, diminuir o risco de desenvolvimento de novas resistências.

Contudo, apesar de todos os aspetos positivos que os sistemas de nanopartículas apresentam, estes possuem também algumas desvantagens que não lhes permite ainda ser amplamente utilizados. Como exemplo destas desvantagens podem citar-se a sua instabilidade, a dificuldade de esterilização, o facto de serem bastante dispendiosos e a complexidade do equipamento utilizado na sua produção, o que acaba por influenciar negativamente a sua relação custo-benefício, remetendo-os para tratamentos de segunda linha.

Embora vários estudos tenham demonstrado o potencial dos sistemas de nanopartículas na veiculação de antibióticos, poucos são submetidos a ensaios clínicos, e muito poucos conseguiram aprovação para o mercado, principalmente na área da infeciologia.

Deste modo, é essencial melhorar não só a relação custo-benefício deste tipo de sistemas, mas também o apoio financeiro por parte da indústria farmacêutica para a investigação e desenvolvimento de antibióticos veiculados por sistemas de nanopartículas, assim como a criação de uma regulamentação específica para os mesmos. Sem estes apoios, torna-se difícil prever o futuro dos sistemas de

nanopartículas, o que diminui a probabilidade de adição destes novos sistemas ao arsenal terapêutico.

Tendo em conta todos os aspetos discutidos, e apesar de todas as desvantagens referidas, tudo indica que os sistemas de nanopartículas possam vir a constituir uma alternativa viável à veiculação de antibióticos livres como forma de contornar a resistência bacteriana, porém, mais estudos são necessários em humanos, principalmente a nível de metabolismo e toxicidade das nanopartículas.

7. Referências Bibliográficas

Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., … Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters,* 9, 247. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., … Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102

Allen, T. M., e Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 65(1), 36-48. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037

Andersson, D. I., Hughes, D., e Kubicek-Sutherland, J. Z. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, *26*, 43–57. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.04.002

Anirudhan, T. S., Parvathy, J., e Nair, A. S. (2016). Evaluation of micellar architecture based on functionalized chitosan for the in vitro release of an antibiotic. *Designed Monomers and Polymers*, *19*(2), 99–107. Disponível em: https://doi.org/10.1080/15685551.2015.1092010

Bakker-Woudenberg, I. A. J. M., Ten Kate, M. T., Stearne-Cullen, L. E. T., e Woodle, M. C. (1995). Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in klebsiella pneumoniae-infected lung tissue. *Journal of Infectious Diseases*, *171*(4), 938–947. Disponível em: https://doi.org/10.1093/infdis/171.4.938

Bosnjakovic, A., Mishra, M. K., Ren, W., Kurtoglu, Y. E., Shi, T., Fan, D., e Kannan, R. M. (2011). Poly(amidoamine) dendrimer-erythromycin conjugates for drug delivery to macrophages involved in periprosthetic inflammation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *7*(3), 284–294. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.10.008

Bozzuto, G., e Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975-999. Disponível em: https://doi.org/10.2147/IJN.S68861

Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: A technological approach. *Biotechnology Annual Review*, *7*, 59–85. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1387-2656(01)07033-8

Brooks, B. D., e Brooks, A. E. (2014). Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *78*, 14–27. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., e Khan, W. (2017). Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics* 9(2), 12. Disponível em: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012

CDC. (s.d.). How Antibiotic Resistance Happens | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. Consultado a 19 de Abril de 2019, disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html

Chauhan, A. S., e Kaul, M. (2018). Engineering of "critical nanoscale design parameters" (CNDPs) in PAMAM dendrimer nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Nanoparticle Research*, *20*(9). Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11051-018-4318-z

Chavan SB, Kumbhar RR, e Deshmukh RB. (2013). Callophyllum Inophyllum Linn (" honne ") Oil, A source for Biodiesel Production. *Research Journal of Chemical Sciences Res. J. Chem. Sci*, *3*(11), 2231–2606.

Cheng, Y., Qu, H., Ma, M., Xu, Z., Xu, P., Fang, Y., e Xu, T. (2007). Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: An in vitro study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *42*(7), 1032–1038. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.12.035

Chono, S., Tanino, T., Seki, T., e Morimoto, K. (2008). Efficient drug delivery to alveolar macrophages and lung epithelial lining fluid following pulmonary administration of liposomal ciprofloxacin in rats with pneumonia and estimation of its antibacterial effects. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *34*(10), 1090–1096. Disponível em: https://doi.org/10.1080/03639040801958421

Cipolla, D., Blanchard, J., e Gonda, I. (2016). Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics*, *8*(1), 1–31. Disponível em: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010006

Dawar, S., Singh, N., Kanwar, R. K., Kennedy, R. L., Veedu, R. N., Zhou, S. F., … Kanwar, J. R. (2013). Multifunctional and multitargeted nanoparticles for drug delivery to overcome barriers of drug resistance in human cancers. *Drug Discovery Today*, *18*(23–24), 1292–1300. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.009

Drulis-Kawa, Z., e Dorotkiewicz-Jach, A. (2010). Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, *387*(1–2), 187–198. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.033

Ellis, T., Chiappi, M., García-Trenco, A., Al-Ejji, M., Sarkar, S., Georgiou, T. K., … Porter, A. E. (2018). Multimetallic Microparticles Increase the Potency of Rifampicin against Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *ACS Nano*, *12*(6), 5228–5240. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08264

Fair, R. J., e Tor, Y. (2014). Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century, 25–64. Disponível em: https://doi.org/10.4137/PMC.S14459

Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., e Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *6*(1), 103–109. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006

Fernandes, P. A., Silva, M. G., Cruz, A. P., e Paiva, J. A. (2016). Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2015. *Direção Geral Da Saúde*, 1–43. Disponível em: www.dgs.pt

Forier, K., Raemdonck, K., De Smedt, S. C., Demeester, J., Coenye, T., e Braeckmans, K. (2014). Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *Journal of Controlled Release*, *190*, 607–623. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.055

Gangadharam, P. R. J., Ashtekar, D. A., Ghori, N., Goldstein, J. A., Debs, R. J., e

Düzgünes, N. (1991). Chemotherapeutic potential of free and liposome encapsulated streptomycin against experimental mycobacterium avium complex infections in beige mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *28*(3), 425–435. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jac/28.3.425

Gao, W., Thamphiwatana, S., Angsantikul, P., e Zhang, L. (2014). Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *6*(6), 532–547. Disponível em: https://doi.org/10.1002/wnan.1282

Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., e Haldar, J. (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*, *27*(4), 323–338. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010

Gombotz, W. R., e Hoffman, A. S. (2013). *Polymeric Micelles*. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit), 1041-1045. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00094-2

Grotz, E., Tateosian, N. L., Salgueiro, J., Bernabeu, E., Gonzalez, L., Manca, M. L., … Chiappetta, D. A. (2019). Pulmonary delivery of rifampicin-loaded soluplus micelles against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *53*, 101170. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101170

Gutiérrez, L., Stepien, G., Gutiérrez, L., Pérez-Hernández, M., Pardo, J., Pardo, J., … de la Fuente, J. M. (2017). *Nanotechnology in Drug Discovery and Development*. *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (Vol. 1–8). Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9

Hadinoto, K., e Cheow, W. S. (2014). Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against Pseudomonas aeruginosa. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *116*, 772–785. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.032

Harbison, R. D., Bourgeois, M. M., e Johnson, G. T. (2015). Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology, 1025–1027.

Hickey, A. J. (2014). Controlled delivery of inhaled therapeutic agents. *Journal of Controlled Release*, *190*, 182–188. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.058

Huang, D., e Wu, D. (2018). Biodegradable dendrimers for drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, *90*(2017), 713–727. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.002

Huh, A. J., e Kwon, Y. J. (2011). "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, *156*(2), 128–145. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002

Hutnick, M. A., e Pokorski, J. K. (2018). Polymeric Interventions for Microbial Infections: A Review. *Molecular Pharmaceutics*, *15*(8), 2910–2921. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00342

ID — nanopharmaceutics.com. (s.d.). Consultado a 26 de Setembro de 2019. Disponível em: http://www.nanopharmaceutics.com/id1

Immordino, M. L., Dosio, F., e Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicin*e *1*(3):297-315.

Ismail, N. S., e Gopinath, S. C. B. (2017). Enhanced antibacterial effect by antibiotic loaded starch nanoparticle. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, *24*, 136–140. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2016.10.005

Jesorka, A., e Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry, 1,* 801-832. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747

Kaufman, M. B. (2019). Pharmaceutical Approval Update, *44*(2), 42–44.

Kawakami, S., e Hashida, M. (2014). Glycosylation-mediated targeting of carriers. *Journal of Controlled Release*, *190*, 542–555. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.001

Kesharwani, P., Jain, K., e Jain, N. K. (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science 39*(2), 268-307. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005

Kesharwani, S. S., Kaur, S., Tummala, H., e Sangamwar, A. T. (2019). Multifunctional

approaches utilizing polymeric micelles to circumvent multidrug resistant tumors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *173*, 581–590. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.022

Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K., e Fazly Bazzaz, B. S. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, *95*, 32–42. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009

Kim, H. J., e Jones, M. N. (2004). The delivery of benzyl penicillin to Staphylococcus aureus biofilms by use of liposomes. *Journal of Liposome Research*, *14*(3–4), 123–139. Disponível em: https://doi.org/10.1081/LPR-200029887

Kodish, S. (2018). The power of narratives: A new understanding of antibiotic resistance. *International Journal of Communication*, *12*, 745–765.

Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., e Ho, R. J. Y. (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *103*(1), 29–52. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jps.23773

Kumar, B., Jalodia, K., Kumar, P., e Gautam, H. K. (2017). Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *41*, 260–268. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019

Kumari, A., Yadav, S. K., e Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces 75*(1), 1-18. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Lee, B. K., Yun, Y. H., e Park, K. (2015). Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. *Chemical Engineering Science*, *125*, 158–164. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042

Lombardo, D., Kiselev, M. A., e Caccamo, M. T. (2019). Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials*, *2019*, 1–26. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2019/3702518

Magallanes, M., Dijkstra, J., e Fierer, J. (1993). Liposome-incorporated ciprofloxacin in

treatment of murine salmonellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(11), 2293–2297. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2293

Malkoch, M., Malmström, E., e Nyström, A. M. (2012). Dendrimers: Properties and Applications. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set* (pp*:* 113-176). Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00162-X

Nunes, P. (2015). Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos. Universidade do Algarve, Portugal.

Omri, A., Suntres, Z. E., e Shek, P. N. (2002). Enhanced activity of liposomal polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa in a rat model of lung infection. *Biochemical Pharmacology*, *64*(9), 1407–1413. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01346-1

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L. S., … Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1), 71. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8

Pelgrift, R. Y., e Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(13–14), 1803–1815. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011

Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos. (2018). Infeções e Resistências aos Antimicrobianos - Relatório Anual do Programa Prioritário 2018.

Resort, K., e Hp, S. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Discovery & Development Pharmanext. *ACS Nano*, *3*(1), 16–20.

Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., … Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, *191*, 51–80. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008

Rizvi, S. A. A., e Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *26*(1), 64–70. Disponível em:

https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012

Santos, R. S., Figueiredo, C., Azevedo, N. F., Braeckmans, K., e De Smedt, S. C. (2018). *Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics*. *Advanced Drug Delivery Reviews,* (136–137), 28-48. Elsevier B.V. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.010

Scorciapino, M. A., Serra, I., Manzo, G., e Rinaldi, A. C. (2017). Antimicrobial dendrimeric peptides: Structure, activity and new therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), 542. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms18030542

Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., e Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology, 6*, 286. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286

Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., e Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *3*(2), 168–171. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001

Sharma, A., Kumar Arya, D., Dua, M., Chhatwal, G. S., e Johri, A. K. (2012). Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *9*(11), 1325–1332. Disponível em: https://doi.org/10.1517/17425247.2012.717927

Sherje, A. P., Jadhav, M., Dravyakar, B. R., e Kadam, D. (2018). Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, *548*(1), 707–720. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.030

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., e Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release, 70*(1-2), 1-20. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4

Stebbins, N. D., Ouimet, M. A., e Uhrich, K. E. (2014). Antibiotic-containing polymers

for localized, sustained drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *78*, 77–87. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.04.006

Svenson, S., e Tomalia, D. A. (2012). Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews, 57*(15), 2106-2129. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.030

Toti, U. S., Guru, B. R., Hali, M., McPharlin, C. M., Wykes, S. M., Panyam, J., e Whittum-Hudson, J. A. (2011). Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. *Biomaterials*, *32*(27), 6606–6613. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.038

Van Swaay, D., e Demello, A. (2013). Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip 13*(5):752-67. Disponível em: https://doi.org/10.1039/c2lc41121k

Vyas, S. P., Kannan, M. E., Jain, S., Mishra, V., e Singh, P. (2004). Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, *269*(1), 37–49. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.08.017

WHO. (2001). Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance.

Winnicka, K., Wroblewska, M., Wieczorek, P., Sacha, P. T., e Tryniszewska, E. A. (2013). The effect of PAMAM dendrimers on the antibacterial activity of antibiotics with different water solubility. *Molecules*, *18*(7), 8607–8617. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules18078607

Wrońska, N., Felczak, A., Zawadzka, K., Poszepczy Nska, M., Rózalska, S., Bryszewska, M., … Lisowska, K. (2015). Poly(propylene imine) dendrimers and amoxicillin as dual-action antibacterial agents. *Molecules*, *20*(10), 19330–19342. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules201019330

Yazar, E., Bas, A. L., Birdane, Y. O., Yapar, K., Elmas, M., e Tras, B. (2006). Determination of intracellular (neutrophil and monocyte) concentrations of free and liposome encapsulated ampicillin in sheep. *Veterinarni Medicina*, *51*(2), 51–54. Disponível em: https://doi.org/10.17221/5517-VETMED

Zazo, H., Colino, C. I., e Lanao, J. M. (2016). Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *Journal of Controlled Release*, *224*, 86–102. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008

Zhao, Y., e Jiang, X. (2013). Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics. *Nanoscale*, *5*(18), 8340–8350. Disponível em: https://doi.org/10.1039/c3nr01990j