

Alessandra Cândida Rios

PneumoPhageKill:

Estabilização estrutural e funcional de partículas bacteriofágicas em emulsões do tipo A/O/A: sistema bioterapêutico para tratamento de pneumonia bacteriana por nebulização.

> Sorocaba/SP 2016

Alessandra Cândida Rios

PneumoPhageKill:

Estabilização estrutural e funcional de partículas bacteriofágicas em emulsões do tipo A/O/A: sistema bioterapêutico para tratamento de pneumonia bacteriana por nebulização.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo BalcãoCoorientadora:Profª Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Sorocaba/SP 2016 Alessandra Cândida Rios

PneumoPhageKill:

Estabilização estrutural e funcional de partículas bacteriofágicas em emulsões do tipo A/O/A: sistema bioterapêutico para tratamento de pneumonia bacteriana por nebulização.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/__/___

BANCA EXAMINADORA:

Ass.

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão Universidade de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cleide Maria Cândida Rios e Antônio Maia Rios

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que buscam, de alguma forma, melhorar o mundo. Obrigado àqueles que gentilmente compartilharam comigo um pouco do seu conhecimento para auxiliar na composição do meu trabalho: "...aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós" (Antoine de Saint-Exupéry).

Agradeço a Deus por colocar no meu caminho pessoas e oportunidades grandiosas, às quais me ajudam a evoluir como pessoa e como profissional.

Com muita gratidão dedico este trabalho aos meus pais, que apesar de não terem tido a oportunidade de estudar, sempre foram meus maiores incentivadores e exemplos de vida.

Agradeço ao meu marido, meus amigos pessoais e familiares, por compreenderem minha ausência e me incentivarem sempre.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Victor Manuel C. F. Balcão, por ter confiado e acreditado em mim, e por me mostrar este maravilhoso e gratificante universo da pesquisa científica. Obrigada por compartilhar, com tanta generosidade, seus imensos conhecimentos.

À minha coorientadora, Professora Dra. Marta M. D. C. Vila pela orientação, pelo direcionamento das análises no IQ-UNICAMP e pelas oportunidades que me ofereceu, sou muito grata.

Agradeço à querida Cássia A. Glasser, pela generosidade com que me passou o seu trabalho de pesquisa, para que eu pudesse dar continuidade.

Muita gratidão pela minha querida amiga Franciely C. C. N. Lopes, por me mostrar que o mestrado era possível, por compartilhar todos os anseios deste período e por me ajudar sempre. Obrigada pelo carinho, respeito, atenção, amizade e por tornar nossos caminhos mais alegres.

Muito obrigada à Professora Dra. Renata de Lima, à Tatiane Pasquoto e à Mariana Guilger do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Sorocaba (UNISO) pelo auxílio direto na realização dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo, e por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço à Thaisa B. Pickler, assim como à Professora Dra. Marli Gerenutti por todo o auxílio na utilização das dependências do LAPETOX na UNISO.

Agradeço ao Gustavo Alexandre dos Santos e à Dr^a Valéria Orsi, pela ajuda com os materiais, pela utilização do Laboratório de Microbiologia da UNISO e por todo o auxílio na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Leonardo F. Fraceto, ao Jhones e à Estefânia da UNESP, campus Sorocaba, pelo gentil auxílio na realização das análises de NTA.

Aos pesquisadores do LNNano (CNPEM, Campinas), Dr. Rodrigo Villares Portugal, Dr. Marcelo Alexandre de Farias e Dr. Alexandre Cassagro pelo auxílio direto na realização das análises por microscopia eletrônica de transmissão e por compartilharem, de forma generosa, um pouco dos seus conhecimentos.

À Universidade de Sorocaba e aos professores do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, por me receberem tão bem e por contribuírem com o meu aprendizado.

Novamente agradeço ao Professor Dr. Leonardo F. Fraceto, assim como ao Professor Dr. Fernando de Sá Del Fiol pelo carinho com que avaliaram este trabalho e pelas valiosas contribuições para a melhoria desta dissertação de mestrado.

Agradeço ao meu coordenador, Mário Braga, assim como à Luciana Nista e à Jussara Couto, pela flexibilidade do meu horário de trabalho para que eu pudesse realizar este trabalho de pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida no âmbito do programa PROSUP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brasil), pelo financiamento deste projeto de pesquisa (FAPESP Ref. No. 2013/03181-6, projeto PneumoPhageKill).

"Life is like riding a bicycle. To keep your balance, you must keep moving." Albert Einstein (14/03/1879 - 18/04/1955)

RESUMO

A terapia fágica, através da aplicação de partículas bacteriofágicas (PBs) estritamente líticas para a bactéria alvo hospedeira diretamente no local da infecção, tem sido proposta como uma potencial alternativa/complemento aos antibióticos convencionais. As principais vantagens das PBs no tratamento de infecções bacterianas residem na manutenção de uma elevada concentração de PBs no local da infecção enquanto existirem células bacterianasalvo viáveis, na sua elevada especificidade, e na produção de enzimas específicas (holinas e lisinas) que hidrolisam a matriz polimérica dos biofilmes bacterianos, favorecendo assim a sua penetração e ação antibacteriana. Uma alternativa para a veiculação das PBs de forma a manter sua estrutura e funcionalidade viáveis reside no encapsulamento no núcleo aquoso interno de nanovesículas lipídicas integrando sistemas de emulsão múltipla do tipo águaem-óleo-em-água (A/O/A), pois existe um delicado equilíbrio entre a estabilidade e a flexibilidade necessárias à função das biomoléculas associado à importância da superfície das moléculas de natureza proteica para a sua estabilidade, uma vez que é através desta interface que a entidade proteica interage com o microambiente que a rodeia. O objetivo principal deste trabalho consistiu na investigação do potencial de nanoencapsulamento e proteção de PBs estritamente líticas para Pseudomonas aeruginosa, com consequente estabilização estrutural e funcional de tais entidades. Foram produzidas emulsões múltiplas do tipo A/O/A pelo método de emulsificação em duas etapas, integrando PBs encapsuladas no núcleo aquoso interno das nanovesículas lipídicas constituintes da emulsão múltipla, e formuladas soluções isotônicas com vista à sua administração por nebulização. A propagação das PBs na suspensão estoque no seu hospedeiro bacteriano específico (P. aeruginosa) resultou numa suspensão concentrada de PBs com concentração média igual a (2.983±0.416)x10⁹ viriões mL⁻¹. Três emulsões múltiplas A/O/A foram produzidas, com 10 µL ou 1000 µL de suspensão concentrada de PBs na fase aquosa interna ou com 10 µL de uma mistura de LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL) na fase aquosa interna (emulsão múltipla placebo). Uma maior quantidade de PBs não provocou quaisquer alterações nos valores de Potencial Zeta (ZP) mas amplificou as propriedades antibacterianas da emulsão múltipla. A eficiência de encapsulação (EE) de PBs da emulsão ME1000 foi EE=89.2%. É digno de nota lembrar que esta eficiência de encapsulação está relacionada apenas com viriões de fagos, uma vez que as leituras de absorbância foram feitas por forma a excluir os detritos celulares e quaisquer outras proteínas intracitoplasmáticas liberadas pela lise celular bacteriana. O coeficiente de difusão das nanovesículas lipídicas integrantes da ME1000 foi calculado através da equação de Stokes-Einstein e produziu o valor de 2.607x10⁻¹² m².s⁻¹, comparável e da mesma ordem de grandeza (10⁻¹² m².s⁻¹) que os resultados publicados por

vários outros pesquisadores. Devido às muito baixas quantidades de ME1000 adicionadas à solução salina, as misturas resultantes eram já naturalmente isotônicas e adequadas para administração via nebulização. Dado que o volume normalmente projetado durante um jato de nebulização é da ordem de grandeza de 500 µL, e porque (pelo menos em teoria) uma única PB seria suficiente para erradicar completamente uma infecção bacteriana, todas as soluções isotônicas testadas seriam altamente eficazes na erradicação de uma infecção bacteriana pulmonar por Pseudomonas aeruginosa. Com base nos resultados obtidos pelos testes de viabilidade celular (MTT e citometria de imagem), é possível argumentar que as soluções isotônicas testadas e preparadas com o sistema ME1000 exibiram uma boa viabilidade celular e baixa citotoxicidade, não possuindo características que promovessem lesões no DNA. Uma importante contribuição para a elevada estabilidade dos sistemas de emulsão múltipla produzidos com PBs (estritamente líticas) encapsuladas foi muito provavelmente os valores muito negativos de ZP obtidos para a ME1000, promovendo repulsão eletrônica das partículas e mantendo-as em suspensão, também corroborado pelo coeficiente de difusão calculado para as nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão múltipla (2.607x10⁻¹² m².s⁻¹), com ordem de grandeza relacionada com a estabilidade de uma emulsão múltipla. Porque o aprisionamento de entidades proteicas bioativas (tais como as PBs) promove uma alteração nas condições termodinâmicas do nanoambiente que rodeia cada partícula e, devido ao fato de que os movimentos das moléculas de solvente (aquoso) na sua microvizinhança ficam seriamente reduzidos pelo efeito de estarem contidos no seio do núcleo aquoso da matriz, o resultado final é uma estabilidade termodinâmica aumentada com potenciação da viscosidade rotacional, translacional e vibracional das PBs, promovendo uma arguitetura tri-dimensional mais rígida com consequente decréscimo da entropia e promovendo assim a estabilização estrutural e funcional das PBs. Para as linhagens celulares testadas, as soluções isotônicas integrando a ME1000 não exibiram efeitos genotóxicos significativos às três concentrações de ME1000 testadas (i.e., 0.3%, 0.6% e 0.9%, v/v), o que está em perfeita concordância com a ausência de efeitos citotóxicos observados para ambas as linhagens celulares. O uso da ME1000 na formulação de uma solução isotônica para nebulização no tratamento de infecções bacterianas pulmonares por P. aeruginosa possuiria vantagens inerentes, guando comparado com as formulações químicas antimicrobianas convencionais, uma vez que PBs específicas e estritamente líticas são predadores naturais e auto-replicantes das bactérias sendo virtualmente inofensivas tanto para células como tecidos humanos.

Palavras chave: Resistência bacteriana. Bacteriófagos. Terapia fágica. Emulsões múltiplas A/O/A. Estabilização estrutural e funcional. Nebulização. Pneumonia bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Phage therapy, by applying strictly lytic bacteriophage particles (BPs) to the host target bacteria directly into the site of infection, has been proposed as a potential alternative/complement to conventional antibiotics. The main advantages of BPs in the treatment of bacterial infections reside in the maintenance of a high concentration of BPs at the site of infection while there are still viable target bacterial cells, in their high specificity, and in the production of specific enzymes (holins and lysins) that hydrolyze the polymeric matrix of bacterial biofilms, thus favoring their penetration and antibacterial action. An alternative for targeting BPs so as to maintain viable their structure and functionality, resides in entrapping them within the inner aqueous core of lipid nanodroplets integrating multiple emulsion systems of the type water-in-oil-in-water (W/O/W), since there is a delicate balance between the stability and flexibility required for the function of biomolecules associated to the importance of the surface of proteinaceous molecules to their stability, since it is through this interface that the protein entity interacts with its surrounding microenvironment. The major goal of this applied research work consisted in investigating the potential of nanoencapsulation and protection/stabilization of strictly lytic BPs for Pseudomonas aeruginosa, with concomitant structural and functional stabilization of such entities. Multiple emulsions of the type W/O/W were produced by the two-step emulsification methodology, integrating BPs entrapped within the internal aqueous core of lipid nanodroplets constituent of the multiple emulsion system, which were utilized in the formulation of isotonic solutions aiming at their administration by nebulization. Propagation of the BPs in the stocksuspension in its specific bacterial host (P. aeruginosa) resulted in a concentrated BP suspension with average BP concentration of (2.983±0.416)x10⁹ virions/mL. Three W/O/W multiple emulsions were produced with either 10 µL or 1000 µL of concentrated BP suspension in the inner aqueous phase or with 10 µL of a mixture of LB-top ágar (4 mL) and phage-buffer (3 mL) in the inner aqueous phase (placebo multiple emulsion). A larger amount of physical BPs did not lead to any changes whatsoever in the Zeta potential (ZP) values but enhanced the antibacterial properties of the multiple emulsion. The BP encapsulation efficiency (EE) of ME1000 was EE=89.2%. It is noteworthy to remember that this encapsulation efficiency is related solely to phage virions, since absorbance readings were made so as to exclude cell debris and any other intracytoplasmatic proteins released upon bacterial cell lysis. The diffusion coefficient of the lipid nanodroplets integrating our W/O/W multiple emulsion system ME1000 was calculated using the Stokes-Einstein equation and produced the value $2.607 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, comparable and of the same order of magnitude $(10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1})$ as the results published by several other researchers. Due to the very low amounts of ME1000 adedd to the saline solution, the resulting mixtures were naturally already isotonic and suitable for administration via nebulization. Since the volume usually projected during a nebulization jet is of the order of magnitude of 500 µL, and because (at least in theory) a single BP would be sufficient to completely eradicate a bacterial infection. all the isotonic solutions tested would be highly effective in eradicating a lung bacterial infection by *P. aeruginosa*. On the basis of the results obtained from the cell viability tests (both MTT and image cytometry), it is possible to argue that the isotonic solutions tested exhibited a good cell viability while displaying a low cell toxicity, without promoting lesions in the DNA. An important contribution for the high stability of the multiple emulsion produced with entrapped (strictly lytic) BPs was most likely the highly negative values of ZP obtained for ME1000, promoting electronic repulsion of the particles and maintaining them in suspension, also corroborated by the diffusion coefficient calculated for the lipid nanodroplets integrating the multiple emulsion $(2.607 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$, with an order of magnitude related to stability of a multiple emulsion. Because the imprisonment of bioactive protein entities (such as BPs) promotes a change in the thermodynamic conditions of the nanoenvironment surrounding each particle due to the fact that the movements of (aqueous) solvent molecules in their microneighborhood become seriously reduced by the effect of being contained within the matrix's aqueous core, thereby leading to enhanced thermodynamic stability, the net result is a potentiation of the BPs's rotational, translational and vibrational viscosity, promoting a more rigid three-dimensional architecture of the particle with concomitant decrease of entropy and thus promoting its structural and functional stabilization. For the cell lines tested, the isotonic solutions integrating the ME1000 system showed no significant genotoxic effects at the three tested ME1000 concentrations (viz., 0.3%, 0.6% and 0.9%, v/v), which was in clear agreement with the lack of cytotoxic effects observed for both cell lines. The use of ME1000 in formulating an isotonic solution for nebulization in the treatment of bacterial (P. aeruginosa) lung infections, would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulations, in that specific and strictly lytic BPs are natural self-replicating predators of bacteria and are virtually harmless to human cells and tissues.

Keywords: Bacterial resistance. Bacteriophages. Phage therapy. W/O/W multiple emulsions. Structural and functional stabilization. Nebulization. Bacterial pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representativo de um bacteriófago típico.
- Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago 41 estritamente lítico (a) e do sistema de enzimas que permite aos novos viriões ultrapassarem a barreira celular e serem liberados para o meio exterior (b).
- Figura 3. Detalhe dos fenômenos que ocorrem durante o espaço temporal de um 42 ciclo lítico de replicação de uma partícula bacteriofágica.
- Figura 4. Diminuição da população de células bacterianas (em Unidades 44 Formadoras de Colônias, UFC) durante o processo de infecção por bacteriófagos.
- Figura 5. Representação do amostrador de Andersen **(a)**, que simula a deposição 52 de partículas de diferentes tamanhos no trato respiratório humano **(b)**.
- Figura 6. Representação esquemática das etapas laboratoriais de preparação da 61 suspensão bacteriana de *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.
- Figura 7. Representação esquemática das etapas laboratoriais de propagação das 62 partículas bacteriofágicas JG004 (DSM 19871) no seu hospedeiro específico *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.
- Figura 8. Representação esquemática das etapas laboratoriais de purificação das 63 partículas bacteriofágicas JG004 (DSM 19871) propagadas no seu hospedeiro específico *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.
- Figura 9. Representação esquemática das etapas laboratoriais de quantificação do 64 título fágico na suspensão concentrada de bacteriófago JG004 produzida a partir da sua propagação no hospedeiro específico *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.
- Figura 10. Configuração experimental utilizada no preparo das emulsões múltiplas 65 do tipo A/O/A, consistindo num homogeneizador UltraTurrax acoplado a uma placa de aquecimento com banho-maria à 39 °C.
- Figura 11. Representação esquemática do método de emulsificação em duas etapas 66 para a produção de emulsões múltiplas do tipo A/O/A.
- Figura 12. Espectro de absorção de partículas fágicas na região do ultravioleta 69 retirado do estudo do professor George P. Smith (a), e espectro na região

38

do ultravioleta obtido neste trabalho de pesquisa com a suspensão concentrada de bacteriófagos (b). Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos na região de comprimentos de onda entre 240 nm e 320 nm.

- Figura 13. Curva de calibração obtida para a relação entre a concentração de 70 partículas bacteriofágicas em suspensão e a absorbância da solução à 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas a um comprimento de onda de 320 nm.
- Figura 14. Dispositivo utilizado para a determinação da viscosidade das emulsões 75 múltiplas A/O/A produzidas, com utilização da equação de escoamento de Hagen-Poiseuille.
- Figura 15. Procedimento sequencial de preparação das amostras para as análises 78 por microscopia eletrônica de transmissão (tanto por *negative staining* (NS-MET) como por crio-congelamento (crio-MET)).
- Figura 16. Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de 86 pesquisa.
- Figura 17. Resultados dos ensaios de propagação do bacteriófago JG004 no seu 87 hospedeiro específico, *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando a formação de unidades formadoras de placas (PFUs) para toda a sequência de diluições decimais da suspensão estoque de bacteriófago: (a) 1x10⁻¹, (b) 1x10⁻², (c) 1x10⁻³, (d) 1x10⁻⁴, (e) 1x10⁻⁵, (f) 1x10⁻⁶, (g) 1x10⁻⁷, (h) 1x10⁻⁸, (i) 1x10⁻⁹, (j) 1x10⁻¹⁰.
- Figura 18. Quantificação microbiológica do título fágico da suspensão concentrada 88 (propagada) de bacteriófago JG004: (a) 1x10⁻⁵, 30 °C, >300 PFUs; (b) 1x10⁻⁶, 30 °C, 253 PFUs; (c) 1x10⁻⁷, 30 °C, 31 PFUs; (d) 1x10⁻⁷, 37 °C, 28 PFUs; (e) 1x10⁻⁷, 25 °C, 35 PFUs.
- Figura 19. Espectro de varredura de comprimentos de onda da suspensão 89 (propagada) de partículas bacteriofágicas, permitindo a observação do comprimento de onda que produz a máxima absorção da suspensão concentrada em partículas fágicas.
- Figura 20. Evolução temporal dos valores médios (n=3) e desvios padrão 92 associados do Tamanho hidrodinâmico de partícula (HS) (a), Índice de polidispersão (PI) (b), Potencial Zeta (ZP) (c) e pH (d) das nanovesículas lipídicas contendo partículas bacteriofágicas aprionadas no núcleo

aquoso interno, integrantes dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A, ao longo do período de armazenamento (círculos azul-claro, ME10; círculos rosa, ME1000; círculos cinza, MEPLC).

- Figura 21. Aspecto leitoso, sem floculação, sem cremeação e sem aderência às 97 paredes do tubo, das emulsões do tipo A/O/A recém produzidas.
- Figura 22. Espectros FTIR de amostras de lecitina (a), poloxâmero 188 (b), 100 Softisan100[™] (c), emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC) (d), emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 10 μL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10) (e), emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 1000 μL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000) (f), e suspensão concentrada de bacteriófagos (g). Os espectros FTIR de infravermelho foram recolhidos na região de números de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹, num espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.).
- Figura 23. Sobreposição dos espectros de infravermelho FTIR de amostras de 101 emulsão múltipla A/O/A placebo (a, MEPLC), emulsão múltipla A/O/A contendo 10 μL de bacteriófago encapsulado (b, ME10), emulsão múltipla A/O/A contendo 1000μL de bacteriófago encapsulado (c, ME1000) e suspensão fágica concentrada (d).
- Figura 24. Difratogramas de raios-X (XRD) de amostras de lecitina (curva cinza), 103 poloxâmero 188 (curva vermelha), Softisan100™ (curva azul), emulsão múltipla placebo A/O/A sem guaisquer partículas fágicas (MEPLC) (curva emulsão múltipla A/O/A com partículas preta), bacteriofágicas encapsuladas (preparada com 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófago, ME1000) (curva verde), e da suspensão concentrada de bacteriófago (curva púrpura). O difratograma na curva marrom foi produzindo subtraindo o difratograma normalizado da MEPLC do difratograma normalizado da ME1000. Os difratogramas de raios-X foram produzidos usando raios-X filtrados por alvo de Cu. As análises foram realizadas a ângulos de difração de 2-Theta (de 5º a 90º, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2°.min⁻¹) com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente de 30 mA e potência de raios-X de 3 kW, num difratómetro de raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão).

- Figura 25. Detalhe dos difratogramas de raios-X (XRD) de amostras da emulsão 104 múltipla placebo A/O/A sem partículas fágicas (MEPLC) (curva preta), da emulsão múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas (preparada com 1000 μL da suspensão concentrada de bacteriófago, ME1000) (curva verde), e da suspensão concentrada de bacteriófago (curva púrpura), para 15 < 2θ < 35. O difratograma na curva marrom foi produzindo subtraindo o difratograma normalizado da MEPLC do difratograma normalizado da ME1000.</p>
- Figura 26. Fotogramas de elevada resolução da (a) suspensão concentrada de 106 bacteriófagos, (b) emulsão múltipla A/O/A ME10, (c) emulsão múltipla A/O/A ME1000, e (d) emulsão múltipla placebo A/O/A (MEPLC), capturados por uma câmera sCMOS de elevada resolução, após irradiação das amostras com um laser de luz verde ao comprimento de onda de 532 nm, usando um dispositivo NanoSight da Malvern Instruments Ltd (modelo LM14C, Worcestershire, Reino Unido).
- Figura 27. Gráficos de intensidade (unidades de absorbância) em função do 108 tamanho hidrodinâmico da partícula para (a) suspensão concentrada de bacteriófagos, (b) emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), (c) emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10), e (d) emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10), e (d) emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME100), produzidos pelo dispositivo NanoSight da Malvern Instruments Ltd (model0 LM14C, Worcestershire, Reino Unido), após irradiação das amostras com um feixe laser de luz verde ao comprimento de onda de 532 nm.
- Figura 28. Curvas termogravimétricas (a) e 1ª derivada das curvas de perda de 110 massa (b) de amostras da suspensão concentrada de bacteriófagos (linhas azuis), emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC, linhas rosa), emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10, linhas cinza), e emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000, linhas verdes). As análises foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.).
- Figura 29. Termogramas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras 112 de (a) emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC, linhas rosa), (b) emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de

bacteriófagos (ME10, linhas cinza), **(c)** emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000, linhas verdes), e **(d)** suspensão concentrada de bacteriófago (linhas azuis). As análises foram realizadas num microcalorímetro exploratório diferencial da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.).

- Figura 30. Atividade antimicrobiana dos sistemas de emulsão múltipla contendo 115 partículas bacteriofágicas encapsuladas, produzidos com 1000 µL (a e b) e 10 µL (c e d) da suspensão concentrada de bacteriófago. Quadrante superior esquerdo: 20 µL de emulsão múltipla aplicada em disco de papel de filtro estéril (a (ME1000) e c (ME10)) ou gota de 20 µL de emulsão múltipla (b (ME1000) e d (ME10)) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante superior direito: 20 µL de emulsão múltipla placebo (MEPLC) aplicada em disco de papel de filtro estéril (a (ME1000) e c (ME10)) ou gota de 20 µL de emulsão múltipla placebo (b (ME1000) e d (ME10)) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante inferior esquerdo: 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago aplicada em disco de papel de filtro estéril (a e c) ou gota de 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago (b e d) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante inferior direito: 10 µL de meio de diluição fágico estéril aplicado em disco de papel de filtro estéril (a e c) ou gota de 10 µL de meio de diluição fágico estéril (b e d) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; (e) Quadrante superior esquerdo: 20 µL de sobrenadante da emulsão múltipla ME1000 após extração com clorofórmio e centrifugação; Quadrante superior direito: 20 µL de emulsão múltipla ME1000; Quadrante inferior esquerdo: 20 µL de sobrenadante da emulsão múltipla MEPLC após extração com clorofórmio e centrifugação; Quadrante inferior direito: 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago.
- Figura 31. Fotomicrografias de Crio-MET da suspensão concentrada de 119 bacteriófago, mostrando (a) a profusão de partículas fágicas na grade de carbono usada para preparar a amostra, (b) várias partículas fágicas

aderidas à debris celulares bacterianos, (c) uma porção ampliada de várias partículas fágicas aderidas à debris celulares bacterianos permitindo observar as fibras da cauda e a cápside com e sem dsDNA, (g) zoom de uma partícula fágica; Fotomicrografias de NS-MET de (d) uma partícula fágica, (e) e (f) sistema de emulsão múltipla ME1000 produzido, a diferentes magnificações, e (h) e (i) partículas fágicas permitindo observar claramente a estrutura helicoidal da sua baínha contrátil. As fotomicrografias (j) e (k) foram obtidas com amostras de emulsão múltipla ME1000 não tratadas (puras), aplicadas diretamente sobre grades de carbono.

- Figura 32. Resultados dos testes de viabilidade celular (via ensaios MTT) usando as 121 linhagens celulares A549 e V79 cultivadas em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade do placebo da suspensão concentrada de bacteriófago, da suspensão concentrada de bacteriófago, do placebo dos sistemas de emulsão múltipla (MEPLC) e dos sistemas de emulsão múltipla ME10 e ME1000, durante um período de tratamento de 24 h a diferentes concentrações. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.
- Figura 33. Índices relativos de necrose e apoptose celular em linhagens celulares 123 A549 e V79 após tratamento com o placebo da suspensão bacteriofágica, com a suspensão concentrada de bacteriófago, com o placebo da emulsão múltipla (MEPLC) e com os sistemas de emulsão múltipla ME10 e ME1000, com concentrações fixadas a 10% dos valores iniciais. Os valores estão expressados como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.
- Figura 34. Resultados dos testes de atividade antibacteriana realizados em cultura 126 de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica do teste de halo em disco (a) e pela técnica do teste da gota (b), após 3 meses de armazenamento (A, ME1000; B, MEPLC; C, suspensão concentrada de bacteriófago; D, placebo da suspensão fágica preparado misturando LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL)), e pela técnica do teste de halo em disco após 6 meses de armazenamento a 4 °C (A, 20 µL ME1000; B, 10 µL ME1000; C, 20 µL suspensão concentrada de bacteriófago; D, 20 µL MEPLC).

- Figura 35. Atividade antimicrobiana das soluções isotônicas preparadas com o 129 sistema de emulsão múltipla ME1000 encapsulando partículas bacteriofágicas, usando o teste antimicrobiano de incorporação. Resultados de atividade antibacteriana de 500 μL (a) e 1000 μL (b) da solução isotônica preparada com 30 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,3%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, de 500 μL (c) e 1000 μL (d) da solução isotônica preparada com 60 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,6%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, 500 μL (e) e 1000 μL (f) da solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,9%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, 500 μL (e) e 1000 μL (f) da solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,9%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*. As setas inseridas identificam os halos de lise produzidos por partículas fágicas encapsuladas (i) ou por partículas fágicas livres (ii).
- Figura 36. Resultados dos testes de viabilidade celular (via ensaios MTT) usando as 130 linhagens celulares V79, 3T3 e A549 cultivadas em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade das soluções isotônicas preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 às concentrações de 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), durante um período de tratamento de 24 h a diferentes concentrações. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.
- Figura 37. Índices de necrose e apoptose celular nas linhagens celulares V79, 3T3 e 132 A549, após tratamento com as soluções isotônicas preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.
- Figura 38. Índices relativos de estresse das linhagens celulares V79, 3T3 e A549 133 após o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com as soluções isotônicas (IS) preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% (v/v) dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5; Análise estatística Two-Way ANOVA ao nível de significância de 5%), com aqueles resultados estatisticamente diferentes dos do controle marcados com '*'. Os valores estão expressados como

médias de três determinações (n=3), com desvios padrão associados (s): **V79** (controle, 1,0000±0,6000; IS@0,3%, 15,1470±1,0000; IS@0,6%, 9,9125±0,3000; IS@0,9%, 7,4917±2,0000), **A549** (controle, 1,0000±0,7000; IS@0,3%, 9,7683±0,1900; IS@0,6%, 9,1681±0,0900; IS@0,9%, 10,0354±0,1600), **3T3** (controle, 1,0000±0,9000; IS@0,3%, 7,3400±0,1600; IS@0,6%, 6,9200±0,3000; IS@0,9%, 8,7650±1,5400).

- Figura 39. Índices de dano ao DNA das linhagens celulares de pulmão V79 e A549 134 após exposição às soluções isotônicas (IS) preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de três determinações (n=3), com desvios padrão associados (s):
 V79 (controle, 1,0000±0,1296; IS@0,3%, 0,6000±0,0502; IS@0,6%, 0,7000±0,0003; IS@0,9%, 1,3600±0,2380), A549 (controle, 1,0000±0,0231; IS@0,3%, 1,1000±0,0002; IS@0,6%, 0,9200±0,0365; IS@0,9%, 0,8700±0,0595).
- Figura 40. Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido. 137

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia, 39 material genético e suas principais características.
- Quadro 2. Composição das emulsões múltiplas (ME) do tipo A/O/A produzidas, 67 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas (%, m/m).
- Quadro 3. Dados utilizados para preparar a curva de calibração com o objetivo de 70 determinar o coeficiente de extinção molar das partículas bacteriofágicas (JG004) inteiras.
- Quadro 4. Resultados microbiológicos obtidos a partir dos ensaios de 88 determinação das unidades formadoras de placas (PFUs), permitindo a determinação do título fágico da suspensão concentrada de bacteriófagos.
- Quadro 5. Valores de resposta médios (n=3) e desvios padrão associados para 91 HS, PI e ZP, das três emulsões múltiplas A/O/A, duas delas contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas na fase aquosa interna (ME10 e ME1000) e uma sendo emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), ao longo do período de armazenamento à 4 °C.
- Quadro 6. Comparação entre os resultados obtidos para o tamanho hidrodinâmico 106 médio das nanovesículas lipídicas integrantes das várias emulsões múltiplas, pelas duas técnicas analíticas (DLS vs. NTA).
- Quadro 7. Resultados obtidos para os valores IC₅₀ pelos ensaios MTT com as 122 linhagens celulares A549 e V79, expostas à suspensão concentrada de bacteriófago, ao placebo da suspensão bacteriofágica, e aos sistemas de emulsão múltipla MEPLC, ME10 e ME1000.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O/A	Água-em-óleo-em-água
A _{in} /O/A _{ext}	Água-em-óleo-em-água
A _{in} -O-A _{ext}	Água-em-óleo-em-água
(A/O)/A	(Água-em-óleo)-em-água
(A _{in} /O)/A _{ext}	(Água-em-óleo)-em-água
0/A/0	Óleo-em-água-em-óleo
A/O	Água em óleo
A _{in} /O	Água em óleo
ABB	Annexin binding buffer
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BPs	Bacteriophage particles
CV	Coeficiente de variação (%)
D	Coeficiente de difusão (m ² •s ⁻¹)
DLS	Espalhamento dinâmico de luz-laser (Dynamic Laser light Scattering)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmmH
η	Viscosidade dinâmica (kg/(m•s))
ε	Coeficiente de extinção molar
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EE	Eficiência de encapsulação
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier
φ	Diâmetro interno do tubo de escoamento (m)
g	Aceleração da gravidade (m/s²)
h	Altura de fluído (m)

HLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
HS	Tamanho hidrodinâmico de partícula
IC ₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
IS	Solução isotônica
J	Joule
k _B	Constante de Boltzmann
L	Altura do tubo de escoamento (m)
LB	Luria Bertani
MDR	Multi-Drug Resistant
ME	Emulsão múltipla do tipo A/O/A
MEPLC	Emulsão múltipla placebo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Crio-MET	Crio-microscopia eletrônica de transmissão
NS-MET	Microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NS	Coloração negativa
NTA	Análise por rastreamento de nanopartículas
O/A	Óleo em água
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
PBs	Partículas bacteriofágicas
PBS	Phosphate buffer system
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PES	Polietersulfônico
PFU	Unidades formadoras de placas
P188	Poloxâmero P188
PI	Índice de polidispersão
ρ	Densidade (g/cm ³)
r	Raio hidrodinâmico (m)
RNA	Ácido ribonucleico
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadeia simples
dsRNA	Ácido ribonucleico de cadeia dupla
RPM	Velocidade de agitação (rotações por minuto)
RSV	Vírus sincicial respiratório
σ	Desvio padrão
т	Temperatura absoluta (K)

t	Tempo de escoamento (s)
TG	Análises termogravimétricas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Ultravioleta
μ	Viscosidade (kg/s•m)
μ _e	Mobilidade eletroforética (µm•s ⁻¹ •V ⁻¹ •cm ⁻¹)
V	Volume escoado (m ³)
XRD	Difração de raios-X
ZP	Potencial Zeta
ξ	Potencial Zeta
W/O/W	Water-in-oil-in-water (Água-em-óleo-em-água)

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	
1.1. Introdução	
1.2. Resistência bacteriana aos antibióticos	34
1.3. Pneumonia causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
1.4. Bacteriófagos e terapia fágica	36
1.4.1. Bacteriófagos	36
1.4.2. Morfologia dos bacteriófagos	37
1.4.3. Processo de infecção fágica - ciclo lítico e ciclo lisogênico	39
1.4.4. Pré-requisitos para a terapia fágica	43
1.4.5. Comparativo entre a terapia fágica e a terapia antimicrobiana convencional	45
1.4.6. Resistência bacteriana e cinética dos bacteriófagos	47
1.4.7. Aplicações da terapia fágica	48
1.5. Terapêutica por nebulização	51
1.6. Emulsões múltiplas do tipo A/O/A e estabilização proteica	53
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo geral	55
2.2. Objetivos específicos	55
3. JUSTIFICATIVA	56
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	57
4.1. Material	57
4.1.1. Material biológico	57
4.1.2. Reagentes e consumíveis	57
4.1.3. Equipamentos analíticos e outros	58
4.2. Procedimentos experimentais	60
4.2.1. Propagação e purificação do concentrado bacteriofágico	60
4.2.1.1. Preparação dos meios de cultura e tampão fágico	60
4.2.1.2. Obtenção da suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa	60
DSM 19880	
4.2.1.3. Propagação e purificação das partículas bacteriofágicas JG004	62
(DSM 19871)	
4.2.1.4. Determinação do título fágico	
4.2.2. Preparação da emulsão múltipla do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A)	
contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas	
4.2.2.1. Preparação da emulsão primária (A _{in} /O)	66

4.2.2.2. Preparação da emulsão múltipla do tipo (A _{in} /O)/A _{ext}	
4.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação das partículas bacteriofágicas	
no núcleo aquoso interno da emulsão múltipla A/O/A	
4.2.4. Caracterização físico-química das emulsões múltiplas A/O/A contendo	71
partículas bacteriofágicas encapsuladas	
4.2.4.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	72
4.2.4.2. Análises por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de	73
Fourier (FTIR)	
4.2.4.3. Análises por difração de raios-X (XRD)	73
4.2.4.4. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)	74
4.2.4.5. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial	74
exploratória (DSC)	
4.2.4.6. Avaliação da viscosidade	75
4.2.4.7. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A produzidas	76
4.2.4.8. Avaliação do pH	76
4.2.4.9. Análises por (crio-/NS-) Microscopia Eletrônica de Transmissão	
4.2.5. Avaliação do potencial antibacteriano das emulsões múltiplas A/O/A	79
com partículas bacteriofágicas encapsuladas	
4.2.6. Formulação de soluções isotônicas integrando as emulsões múltiplas A/O/A	80
contendo partículas fágicas encapsuladas, visando a sua administração por	
nebulização, e avaliação da sua atividade antibacteriana	
4.2.7. Avaliação do potencial de citotoxicidade das emulsões múltiplas A/O/A	81
contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, pelo ensaio MTT	
4.2.8. Avaliação do potencial de apoptose e necrose das emulsões múltiplas A/O/A	82
contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, via citometria de	
imagem (Tali [®])	
4.2.9. Avaliação do potencial de dano ao DNA (genotoxicidade) das soluções	83
isotônicas integrando a emulsão múltipla A/O/A contendo partículas fágicas	
encapsuladas, a diferentes concentrações volumétricas, via ensaio	
Cometa™	
4.2.10. Avaliação da estabilidade das emulsões múltiplas A/O/A produzidas,	85
contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1. Propagação e purificação do concentrado bacteriofágico	

5.2. Preparação e caracterização da emulsão múltipla A/O/A, em termos de	
tamanho hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão e	
potencial Zeta	
5.3. Avaliação da viscosidade e do pH das emulsões múltiplas do tipo A/O/A	
5.4. Aspecto macroscópico das emulsões múltiplas do tipo A/O/A	
5.5. Determinação da eficiência de encapsulação	97
5.6. Caracterização físico-química e biológica das emulsões múltiplas	98
do tipo A/O/A	
5.6.1. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de	99
Fourier (FTIR)	
5.6.2. Análises por difração de raios-X (XRD)	102
5.6.3. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)	105
5.6.4. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória	109
diferencial (DSC)	
5.6.5. Avaliação da atividade antibacteriana dos sistemas de emulsão múltipla	114
A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas	
5.6.6. Análises micro-estruturais e morfológicas por (crio-/NS-) Microscopia	116
Eletrônica de Transmissão	
5.6.7. Determinação do potencial de citotoxicidade dos sistemas de emulsão	120
múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas, pelo	
ensaio MTT	
5.6.8. Determinação do potencial de apoptose e necrose dos sistemas de emulsão	122
múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas, por citometria	
de imagem (Tali [®])	
5.7. Avaliação da estabilidade do sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000	124
contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, ao longo do	
período de armazenamento à 4 °C	
5.8. Caracterização biológica das soluções salinas isotônicas formuladas	127
com o sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000	
5.8.1. Potencial antibacteriano das soluções isotônicas integrando o sistema de	
emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas	
5.8.2. Determinação do potencial de citotoxicidade das soluções isotônicas	
integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, pelo ensaio MTT	
5.8.3. Determinação do potencial de apoptose e necrose das soluções isotônicas	
integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, via citometria de	
ımagem (Talı [°])	

5.8.4. Determinação do potencial de estresse oxidativo das soluções isotônicas	
integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000	
5.8.5. Determinação do potencial de danos ao DNA (genotoxicidade) das soluções	
isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, via	
ensaio Cometa™	
6. CONCLUSÕES	
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	154

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa aplicada realizado, intitulado "PneumoPhageKill: Estabilização estrutural e funcional de partículas bacteriofágicas em emulsões do tipo A/O/A: sistema bioterapêutico para tratamento de pneumonia bacteriana por nebulização", é parte integrante de um projeto de pesquisa mais abrangente, intitulado "PneumoPhageKill - Desenvolvimento de sistema terapêutico contendo bacteriófagos nanoencapsulados líticos para Pseudomonas aeruginosa, para tratamento de pneumonia bacteriana por aerossolização" financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), com a ref^a FAPESP 2013/03181-6, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Marta Maria Duarte Carvalho Vila, da Universidade de Sorocaba.

Os bacteriófagos são partículas totalmente desprovidas de metabolismo sendo altamente eficazes na erradicação de infecções bacterianas, tendo a sua encapsulação na fase aquosa interna de emulsões múltiplas já sido efetuada com sucesso pelo Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, utilizando bacteriófagos líticos para *Salmonella* para demonstrar a prova de conceito. O trabalho de pesquisa aqui apresentado visou o estudo do potencial de nanoencapsulação e estabilização/proteção de partículas bacteriofágicas no núcleo aquoso interno de uma emulsão do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A), visando a sua posterior utilização na formulação de uma solução isotônica com o objetivo de ser administrada por nebulização no tratamento de pneumonia bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*, constituindo assim a segunda e última fase do referido projeto de pesquisa.

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa foram apresentados em 2 Congressos Científicos Internacionais, sendo o Xth CIFARP – *International Congress of Pharmaceutical Sciences* (Ribeirão Preto/SP, de 5 a 9 de Setembro de 2015) (ANEXO A), e o 7th ANM - 7th International Conference on Advanced nanomaterials (ANM2016, Aveiro, Portugal, 25 a 27 de Julho de 2016) (ANEXO B).

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à publicação de um artigo científico de revisão na revista internacional *Microbiological Research* (ANEXO C), e à preparação de um manuscrito científico que se encontra atualmente em processo de submissão para publicação em revista científica internacional indexada com arbitragem por pares (Alessandra C. Rios, Marta M.D.C. Vila, Renata Lima, Marco V. Chaud, Fernando S. Del Fiol, Matthieu Tubino, Marcelo A. de Farias, Rodrigo V. Portugal, José A. Teixeira and Victor M. Balcão (2016) Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for

the inhalational treatment of bacterial pneumonia). Estes trabalhos comprovam a qualidade e importância dos resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Introdução

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming no início do século XX, o índice de mortalidade devido a infecções bacterianas reduziu de forma drástica. A partir desta descoberta, houve muita pesquisa e o desenvolvimento de diversos fármacos antimicrobianos. No entanto, o uso indiscriminado de tais fármacos, assim como o princípio evolutivo de adaptação dos seres vivos ao seu meio ambiente, levou ao fenômeno de adaptação das bactérias aos antibióticos, restringindo assim as opções disponíveis no tratamento das infecções (RANG et al., 2016). O consumo de antibióticos tem aumentado no decorrer dos anos, muito por causa da idade crescente da população com consequente aumento das doenças crônicas e infecções adquiridas em ambiente hospitalar, conhecidas como infecções nosocomiais, onde o estado imunológico já por si comprometido do paciente vai agravar ainda mais a situação. O impacto da resistência aos antibióticos desenvolvida pelas bactérias é mundial, representando uma ameaça real para a humanidade (PINA et al., 2010a,b). No Brasil, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC nº 20 que determinou um maior controle na dispensação de antimicrobianos pelas farmácias de forma a diminuir o uso irracional destas substâncias.

Uma infecção nosocomial bastante recorrente é a pneumonia bacteriana, que pode ser descrita como uma infecção nos pulmões, afetando os alvéolos pulmonares e tecidos circundantes, e que pode ser causada por vários microrganismos (NAKOU et al., 2009). A bactéria Pseudomonas aeruginosa é o segundo patógeno maior causador de pneumonia nosocomial, o terceiro maior causador de infecções do trato urinário e o quarto mais comum em infecções após cirurgias (El SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009). No Brasil, Rossi (2011) aponta a Pseudomonas aeruginosa MDR (Multi-Drug Resistant) como sendo a principal causa de infecções nosocomiais em muitas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), estando em primeiro lugar como causador de pneumonia nosocomial. A bactéria Pseudomonas aeruginosa, patógeno oportunista, que normalmente não tem ação num sistema imunológico saudável, tornou-se uma importante causa de infecções, especialmente em pacientes com mecanismos de defesa comprometidos (TURRINI: SANTO, 2002). As infecções por *Pseudomonas* são complicadas e podem, inclusive, colocar a vida humana em risco. No mundo todo, verifica-se que a taxa de resistência a agentes antimicrobianos para Pseudomonas aeruginosa tem aumentado drasticamente (DAVEY et al., 2006; FURTADO et al., 2009; ALVES et al., 2012).

O aumento da incidência de bactérias resistentes aos antibióticos químicos atuais, como é o caso de algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, demonstra a importância do desenvolvimento de tratamentos alternativos e/ou complementares aos antibióticos convencionais, através de diferentes mecanismos de ação de forma a evitar a disseminação de infecções bacterianas incuráveis e retrocesso do avanço da ciência, obtido com a descoberta dos antibióticos.

Uma terapia alternativa aos antibióticos químicos convencionais, já utilizada em países como a República da Geórgia e Polônia, é a terapia fágica. Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus predadores naturais das bactérias, completamente desprovidos de metabolismo, sendo que o seu mecanismo de ação consiste em se ligar à bactéria alvo e injetar seu ácido nucléico na célula hospedeira ganhando desta forma acesso aos processos metabólicos do hospedeiro. Após o processo de infecção, proteínas são produzidas que param a maquinaria metabólica da bactéria. O material genético é então direcionado para a produção de novos viriões fágicos. Os bacteriófagos irão então produzir enzimas como lisinas e holinas que enfraquecem a membrana interna da célula bacteriana facilitando a lise do hospedeiro (HANLON, 2007).

Uma das grandes vantagens da antibioterapia com fagos relativamente aos antibióticos químicos convencionais reside no fato dos primeiros se replicarem diretamente no local da infecção, ficando disponíveis em abundância onde são mais necessários. Quando comparados com os antibióticos convencionais, os fagos apresentam outras vantagens relevantes: (i) forte permeabilidade tecidular; (ii) concentração permanentemente elevada no foco da infecção, aumentando continuamente na presença de células viáveis do hospedeiro bacteriano; (iii) a sua eliminação do foco da infecção ocorre apenas após erradicação da bactéria hospedeira; (iv) são totalmente compatíveis com os antibióticos químicos; (v) são extremamente específicos contra a bactéria-alvo; (vi) apresentam uma capacidade superior de penetração nos biofilmes bacterianos, induzindo a produção de enzimas que hidrolisam a matriz polimérica do biofilme; (vii) a fagoterapia de infecções bacterianas localizadas é altamente eficaz; (viii) embora as bactérias possam desenvolver resistência aos fagos, o processo de isolar novos fagos líticos é muito mais simples e de menor custo do que desenvolver um novo antibiótico químico; e (ix) a fagoterapia é significativamente mais econômica do que a terapia antibiótica convencional, tanto no desenvolvimento como na produção em larga escala (WESTWATER et al., 2003).

As partículas bacteriofágicas são entidades proteicas e, como tal, precisam ser estabilizadas estrutural e funcionalmente para que possam ser veiculadas na utilização como agentes antimicrobianos. Uma alternativa já provada com potencial reside no aprisionamento das partículas fágicas em sistemas de (nano)emulsão múltipla do tipo água-

em-óleo-em-água (A/O/A). As nanoemulsões múltiplas são sistemas homogêneos, onde dois líquidos imiscíveis são misturados e estabilizados por agentes emulsificantes (BALCÃO et al., 2010). Estas emulsões múltiplas podem ser do tipo A/O/A ou do tipo óleo-em-águaem-óleo (O/A/O). Nos sistemas A/O/A, pequenas vesículas aquosas são retidas no interior de vesículas lipídicas maiores que, por sua vez, estão dispersas numa fase aquosa (externa) contínua. O sistema A/O/A tem vantagens relativamente ao sistema O/A/O visto que o primeiro tem água na sua fase externa, permitindo com isso uma maior gama de aplicações. As emulsões múltiplas possuem várias vantagens, destacando-se a biocompatibilidade e a completa biodegradabilidade (BALCÃO et al., 2010). Podem ser usadas para reter tanto compostos hidrofílicos como hidrofóbicos, para direcionamento de fármacos, para mascarar sabores desagradáveis conferidos por algumas moléculas bioativas, para prolongar a liberação de um determinado composto ativo, para melhorar a dissolução ou solubilização de materiais insolúveis, como proteção de moléculas bioativas sensíveis ou como capa de invisibilidade para escape ao sistema imunitário.

Neste projeto de pesquisa, desenvolveu-se um sistema terapêutico com potencial para a administração por via inalatória de partículas bacteriofágicas estritamente líticas, almejando o tratamento de infecções pulmonares causadas por Pseudomonas aeruginosa. A estratégia de nanoencapsulação visou a proteção das partículas bacteriofágicas contra o sistema imunitário, conferindo-lhes características de invisibilidade e estabilizando-as estruturalmente e funcionalmente. As partículas fágicas são de natureza eminentemente protéica, pelo que poderiam desencadear reações imunológicas adversas no seio do organismo humano. Assim, a sua contenção no núcleo aquoso interno de nanovesículas lipídicas integrantes de emulsões múltiplas do tipo A/O/A permitirá, pelo menos em teoria, protegê-las do ataque pelo sistema imunitário. Ao mesmo tempo, as partículas fágicas são totalmente inofensivas para as células humanas, sendo completamente desprovidas de atividade metabólica e necessitando obrigatoriamente de hospedeiros celulares bacterianos para poderem se replicar. A viabilidade desta prova de conceito foi já comprovada anteriormente por Balcão e colaboradores (2010) utilizando um bacteriófago lítico para Salmonella entérica para produzir um sistema lipídico nanovesicular com bacteriófagos encapsulados integrando uma nanoemulsão múltipla do tipo já descrito. Adicionalmente, a composição da emulsão múltipla produzida neste trabalho de pesquisa teve como ponto de partida a formulação já otimizada estatisticamente de acordo com um planejamento fatorial completo do tipo 2³x3¹, pelo Professor Doutor Victor Manuel Balcão e pela Mestre Cássia Antunes Glasser, na Universidade de Sorocaba (GLASSER, 2016; GLASSER et al., 2016a,b).

Assim, as partículas bacteriofágicas estritamente líticas para *Pseudomonas aeruginosa* foram encapsuladas no núcleo aquoso interno de nanovesículas lipídicas que integram uma emulsão múltipla A/O/A, sendo estas posteriormente suspensas numa solução isotônica à temperatura ambiente, com o objetivo de viabilizar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para administração por nebulização, como estratégia alternativa para o tratamento de infecções respiratórias causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Nanoemulsões lipídicas contendo bacteriófagos encapsulados poderão, assim, ser usadas como forma de veicular bacteriófagos, estabilizando-os estruturalmente e funcionalmente e protegendo-os do ataque pelo sistema imunitário, permitindo, deste modo, a sua nebulização e deposição sobre o epitélio pulmonar. Assim, os predadores naturais das bactérias causadoras da infecção seriam liberados diretamente no local onde são mais necessários: a zona de infecção.

1.2. Resistência bacteriana aos antibióticos

O uso de antibióticos no tratamento de infecções representou uma evolução desde a década de 1940, com uma redução drástica da morbilidade e mortalidade causadas pelas doenças de natureza bacteriana. No entanto, com o passar dos anos, tem sido observado o aparecimento crescente de bactérias resistentes às várias classes de antibióticos, chamadas bactérias multi-resistentes, ou MDR, do inglês *multidrug-resistant* (RANG et al., 2016; WHO, 2015).

O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos, as prescrições médicas sem certeza do diagnóstico, bem como a falta de conhecimento farmacológico, levaram ao uso irracional dos antibióticos e estas atividades, no decorrer dos anos, desencadearam um processo natural de adaptação das bactérias ao ambiente (antimicrobiano) que as rodeia (WANNMACHER, 2004). A multiplicação de bactérias resistentes aos antibióticos pode ser dividida em três níveis: (i) transmissão das bactérias entre pessoas, (ii) transferência entre bactérias através de plasmídeos, e (iii) transferência de um plasmídio para outro, ou para um cromossomo, através de transposons (RANG et al., 2016; PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Livermore (2003) realizou um trabalho de pesquisa que descreve a epidemiologia da resistência bacteriana na Europa, relacionando a ocorrência regional deste fenômeno, em nível local, com a prevalência da resistência em determinados hospitais, em um nível nacional, com uma ocorrência maior de cepas bacterianas resistentes a determinados antibióticos em países específicos e a um nível internacional, por meio da transmissão bacteriana de pessoa para pessoa, através de viajantes de um país para outro.

Recentemente, foi isolada nos Estados Unidos da América uma cepa de *Escherichia coli* resistente ao antibiótico colistina, utilizado como último recurso em casos de bactérias multi-resistentes. Esta cepa bacteriana possui o gene *mcr*-1, o qual lhe confere resistência, tendo sido primeiramente isolado em 2015 na China, a partir de um pequeno grupo de pessoas, carnes e animais, e foi igualmente relatada a sua presença na Europa e Canadá (McGANN et al., 2016).

1.3. Pneumonia causada por Pseudomonas aeruginosa

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo patogênico oportunista, que raramente causa doenças num sistema imunológico saudável, mas que explora eventuais

fraquezas do organismo humano para estabelecer um quadro de infecção (TURRINI; SANTO, 2002). Tal característica, associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e agentes antissépticos, torna este microrganismo uma importante causa de infecções hospitalares. Nas unidades de prestação de cuidados de saúde, é uma das principais bactérias responsáveis por infecções nosocomiais, que são adquiridas em ambiente hospitalar (FLAHERBY; WEINSTEIN, 1996). No Brasil, Rossi (2011) aponta a *Pseudomonas aeruginosa* MDR (*Multi-Drug Resistant*) como sendo a principal causa de infecções nosocomiais em muitas UTIs, estando em primeiro lugar como causadora de pneumonia nosocomial.

A pneumonia pode ser descrita como uma infecção nos pulmões, afetando os alvéolos pulmonares e tecidos circundantes, e que pode ser causada por vários microrganismos (NAKOU et al., 2009; BRADLEY, 2002). Milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por este tipo de infecção bacteriana, sendo esta a sexta causa mais frequente de morte e a infecção (com desfecho mortal) mais adquirida em contexto hospitalar. Nos países em vias de desenvolvimento, a pneumonia é a segunda causa de morte seguida da desidratação causada por diarreia aguda. Existe uma extensa lista de potenciais agentes etiológicos na pneumonia adquirida na comunidade (PAC) que inclui bactérias, vírus, fungos e protozoários. Apesar do Streptococcus pneumoniae ser o agente etiológico mais comum da PAC, outros microrganismos têm de ser considerados de modo a diminuir tanto os fatores de risco do paciente como a severidade da doença. As bactérias que mais tipicamente provocam pneumonia são S. pneumoniae, Haemophilus influenza, Staphylococcus aureus e bacilos Gram-negativo tais como Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa. Microrganismos atípicos incluem Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae e Legionella spp, e vírus tais como o vírus da Influenza, adenovirus e vírus sincicial respiratório (RSV). Hantavirus, metapneumovirus, coronavirus e Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) são agentes patogênicos recentemente identificados como responsáveis neste tipo de infecção (LIMPER, 2007; HALM; TEIRSTEIN, 2002; LAMB et al., 2002; FILE JR., 2001).

Os fatores mecânicos de proteção do hospedeiro, tais como pêlos e cornetos nasais, são de grande importância na proteção contra infecções respiratórias. Estes mecanismos de proteção conseguem reter partículas relativamente grandes, com mais de 10 µm de diâmetro, antes de estas atingirem o trato respiratório inferior. O ar inspirado é sujeito primeiramente a turbulência nas passagens nasais e depois a mudanças de direção abruptas à medida que passa através da faringe e se espalha pelas ramificações da árvore traqueobronquial (MASON; NELSON, 1999). As partículas de menor tamanho são retidas na árvore traqueobronquial, onde os agentes patogênicos são eliminados tanto pelo movimento

ciliar como pelos fatores antibacterianos locais presentes no muco. O mecanismo ou reflexo de tosse oferece também proteção contra a inalação destes microrganismos e, para auxiliar este mecanismo de defesa, existe ainda a flora comensal aderida à mucosa da orofaringe que não permite a adesão de bactérias patogênicas, diminuindo assim o risco de pneumonia (SINGH, 2012; WELSH; MASON, 2001; MASON; NELSON, 1999; CAMNER, 1980).

Quando os microrganismos são suficientemente pequenos para atingir os alvéolos pulmonares, os macrófagos são extremamente eficientes na sua destruição, sendo estes últimos ainda assistidos por proteínas opsonizantes (proteínas que se ligam a partículas e células para aumentar a susceptibilidade à fagocitose). Se os agentes patogênicos não forem destruídos pelos macrófagos, são eliminados via movimento mucociliar ou linfático, caso contrário manifestar-se-á um quadro de pneumonia (SLIGL; MARRIE, 2013; SINGH, 2012; FELDMAN, 2001; MASON; NELSON, 1999; CAMNER, 1980).

1.4. Bacteriófagos e terapia fágica

1.4.1. Bacteriófagos

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam única e exclusivamente bactérias. Descobertos por Ernest Hanking em 1896 e Frederic Twort em 1915, no entanto somente definidos como "bacteriófagos" e plenamente estudados como tal por Felix d'Herelle em 1917, os fagos são partículas completamente inertes e desprovidas de maquinaria metabólica própria, sendo portanto parasitas intracelulares obrigatórios que necessitam de uma célula bacteriana hospedeira para se replicarem. Desde que se descobriu que estes vírus estritamente bacterianos destroem os seus hospedeiros de forma extremamente específica, enquanto se mantêm virtualmente inócuos para os seres humanos, tem sido expectativa de alguns pesquisadores utilizá-los para tratar infecções bacterianas (HERMOSO et al., 2007; SULAKVELIDZE et al., 2001).

Recentemente, o interesse pela terapia fágica como forma de controlar infecções bacterianas foi renovado, e isto se deu essencialmente à urgência em ultrapassar a resistência que muitas bactérias apresentam aos antibióticos químicos convencionais, tanto para terapias em humanos (HOUSBY; MANN, 2009; HERMOSO et al., 2007) como na utilização em controle microbiano de alimentos (HAGENS; LOESSNER, 2010).

A maioria dos fagos descobertos até hoje são específicos e interagem com células bacterianas que expressam receptores específicos na sua membrana, pelo que se a
bactéria não apresentar tais receptores específicos para um bacteriófago em particular, esta não será afetada. Estima-se que para cada bactéria existam dez bacteriófagos diferentes, onde alguns são altamente específicos para seu hospedeiro. O tratamento com monofagos reconhece somente um tipo de receptor, enquanto os polifagos, terapêutica que inclui a administração de um coquetel com vários fagos diferentes, apresenta uma ampla gama de hospedeiros, reconhecendo mais do que um tipo de receptor (CHAN et al., 2013; HYMAN; ABEDON, 2010; SKURNIK; STRAUCH, 2006).

A terapia fágica tem sido aplicada no tratamento de infecções bacterianas desde há algumas décadas. Este tratamento antimicrobiano é autorizado desde 1980, no Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (HIIET) em Wroclaw, na Polônia, que também funciona oferecendo tratamento monofágico ou polifágico aos pacientes com infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos químicos convencionais, e em países tais como a República da Georgia, que conta com a empresa JSC Biochimpharm, fundada em 1999 em associação com o G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology (EIBMV). O EIBMV foi fundado em 1923 pelo bacteriologista Giorgi Eliava em parceria com Felix d'Herelle, que permaneceu no centro por vários meses colaborando com as pesquisas até que, em 1937, devido à prisão de Eliava pela NKVD, que antecedeu ao KGB, d'Herelle nunca mais retornou à Georgia. No entanto o centro continuou com as atividades tornando-se referência na terapia fágica. O HIIET, fundado em 1952, continuou sendo de grande importância no isolamento de fagos para tratamento de septicemia, furunculose, infecções do trato respiratório e urinário, assim como no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos tratamentos convencionais. Os estudos científicos conduzidos nestes centros demonstraram resultados clínicos positivos decorrentes da aplicação da terapia fágica (SULAKVELIDZE et al., 2001; CHAN et al., 2013). No entanto, até hoje, poucos estudos clínicos foram realizados e aceitos por autoridades sanitárias tais como a Food and Drug Administration (FDA) e a European Medicines Agency (EMEA).

1.4.2. Morfologia dos bacteriófagos

Em relação à sua morfologia e classificação, os fagos podem ser divididos em seis grandes grupos. No entanto, de uma forma geral, todos eles exibem uma estrutura tridimensional bem definida apresentando, na maioria, uma cápside proteica icosaédrica que envolve o material genético, uma cauda (ou baínha) helicoidal contráctil e, normalmente,

seis fibras da cauda contendo os receptores responsáveis por reconhecer locais/epítopos específicos na superfície da membrana bacteriana, conforme ilustrado na Figura 1.



Figura 1. Esquema representativo de um bacteriófago típico.

Fonte: adaptado de MILLER et al. (2003).

Os bacteriófagos podem conter, dentro da cápside proteica, DNA (ácido desoxirribonucleico) de cadeia simples (ssDNA) ou dupla cadeia (dsDNA), RNA (ácido ribonucleico) de cadeia simples (ssRNA) ou dupla cadeia (dsRNA), como demonstrado no Quadro 1 (ACKERMANN, 2007; HANLON, 2007).

Desde 1959 mais de 5100 fagos foram isolados e estudados, e a conclusão é de que cerca de 96% deles possuem cauda e pertencem às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (WITTEBOLE et al., 2013; ACKERMANN, 2007; DABROWSKA et al., 2005).

Estrutura	Família	Ácido nucléico e Morfologia	Exemplos
	Myoviridae	dsDNA linear, não envelopado, cauda contráctil	T4
\bigcirc	Siphoviridae	dsDNA linear, não envelopado, cauda não contráctil (longa)	λ
\diamond	Podoviridae	dsDNA linear, não envelopado, cauda não contráctil (curta)	Τ7
¢	Microviridae	ssDNA circular, não envelopado, isométrico	φX174
\bigcirc	Corticoviridae	dsDNA circular, não envelopado, isométrico	PM2
Ô	Tectiviridae	dsDNA linear, não envelopado, isométrico	PRD1
0	Leviviridae	ssRNA linear, não envelopado, isométrico	MS2
Ô	Cystoviridae	dsRNA segmentado, envelopado, esférico	φ6
	Inoviridae	ssDNA circular, não envelopado, filamentoso	fd
\bigcirc	Plasmaviridae	dsDNA circular, envelopado, pleomórfico	MVL2

Quadro 1. Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia, material genético e suas principais características.

Fonte: adaptado de ACKERMANN (2007).

1.4.3. Processo de infecção fágica - ciclo lítico e ciclo lisogênico

Os bacteriófagos reconhecem os seus hospedeiros bacterianos através de determinadas proteínas específicas presentes na superfície da bactéria. É um processo complexo, que consiste em três fases. Na primeira fase, ocorre o contato entre o fago e a bactéria tanto por difusão como por movimentos Brownianos. Posteriormente, na segunda fase, o fago estabelece uma ligação reversível, não-específica, com a bactéria, através de forças eletrostáticas, seguido de uma ligação irreversível entre a proteína da cápside do fago e o receptor específico da superfície da membrana bacteriana que, dependendo do tipo de fago em questão, pode ser uma glicoproteína, um lipopolissacarídeo, um aminoácido, um ácido teicóico, ou um *pilli*, finalizando desta forma a terceira fase (MAURA; DEBARBIEUX, 2011; HANLON, 2007; SKURNIK; STRAUCH, 2006).

Os viriões, que têm de penetrar a parede celular, estão equipados com baínhas helicoidais contráteis que injetam o ácido nucleico contido nas suas cápsides através da parede celular da bactéria hospedeira. Os dois tipos de replicação fágica mais comuns são o

ciclo lítico e o ciclo lisogênico, existindo ainda os ciclos pseudolisogênicos e infecções crônicas. Considerando a resposta ao ciclo lítico (ver Figura 2a), promovida por fagos estritamente líticos, também conhecidos como fagos virulentos, o metabolismo do hospedeiro é, após a infecção pelo fago, direcionado para a produção de novas partículas fágicas através da replicação do material genético do vírus dentro do citoplasma da célula bacteriana, levando à síntese de mais viriões em ciclos de 30 minutos, o que causa, por consequência, a lise da parede celular bacteriana (WEINBAUER, 2004; ASHWORTH, 1973).

Na representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago de DNA, podemos enumerar (ver Figura 2b): (1) a adsorção do fago e injeção do DNA; (2) replicação do DNA fágico; (3) produção das cápsides e baínhas dos fagos; (4) síntese de endolisinas e holinas; (5) empacotamento do DNA; (6) montagem das novas partículas virais; (7) lise das bactérias auxiliada pelo enfraquecimento da membrana citoplasmática pelas holinas e lisinas, e liberação dos novos viriões.

Sem a presença de células bacterianas hospedeiras, os fagos (em particular os estritamente líticos) não conseguem sobreviver, pelo que alguns tipos de fagos desenvolveram estratégias alternativas aos ciclos normais de replicação, tais como o ciclo *"live-and-let-live"* (ciclo lisogênico), ou mutaram alterando as proteínas da cápside permitindo assim a ligação a novos receptores à superfície das paredes celulares das bactérias (SULAKVELIDZE et al., 2001).

No caso da resposta lisogênica, causada por fagos temperados, a replicação do fago ocorre posteriormente, pois o material genético do vírus será primeiramente integrado no genoma do hospedeiro bacteriano. Neste caso, o fago é replicado sem que ocorra lise do hospedeiro, ao mesmo tempo que a bactéria se torna imune a ataques por outros fagos da mesma cepa, tornando-se assim uma bactéria lisogênica (WITTEBOLE et al., 2013; MAURA; DEBARDIEUX, 2011; O'FLAHERTY et al., 2009; HANLON, 2007; WEINBAUER, 2004). Este tipo de bactéria é caracterizada por ter um profago, isto é, um fago inativo que é integrado no seu genoma e permanece num estado latente para várias divisões celulares. Este será ativado após ocorrerem processos de estresse ou dano celular no hospedeiro, induzindo a sua replicação por uma via lítica após saída do genoma bacteriano. Em seguida, há a produção e liberação de novos viriões por extrusão, sem ruptura da membrana celular (WITTEBOLE et al., 2013; MAURA; DEBARBIEUX, 2011; LU; COLLINS, 2009; HANLON, 2007; WEINBAUER, 2004).

Atualmente existe um especial interesse neste tipo de fagos, dado que este pode ser um processo inovador que pode ser explorado partindo de uma perspectiva terapêutica. Este processo faz uso de fagos lisogênicos geneticamente modificados para inserir, por lisogenização, genes específicos no genoma de bactérias resistentes, aumentando a sua susceptibilidade a uma determinada classe de antibióticos (WITTEBOLE et al., 2013; EDGAR et al., 2012; LU; COLLINS, 2009).

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago estritamente lítico (a) e do sistema de enzimas que permite aos novos viriões ultrapassarem a barreira celular e serem liberados para o meio exterior (b).



Fonte: (a) retirado de http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/images/lyticcycle.jpg; (b) retirado de http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24064/ch06.html.

É essencial observar que, durante o processo de infecção pelo fago, o fago assegura que apenas o seu DNA viral seja replicado, evitando, deste modo, a interferência de outros fagos no processo. Por fim, em ambos os ciclos, após a síntese de proteínas virais e enzimas responsáveis pela formação da cápside e o embalamento do material genético, ocorre a montagem e a formação de novos viriões. Estes rompem a membrana citoplasmática, ajudados pela ação de holinas (ver Figura 2b) e, em seguida, a camada de peptidoglicano, ajudados pela ação de lisinas, levando à lise da bactéria (processo lítico), expelindo desta forma os viriões recém-formados para o ambiente extracelular (WITTEBOLE et al., 2013; MAURA; DEBARBIEUX, 2011; ACKERMANN, 2007). Na Figura 3 pode ver-se em maior detalhe o processo de replicação fágica ao longo do tempo, após ocorrer a infecção, que culmina com a lise da célula bacteriana hospedeira.

Figura 3. Detalhe dos fenômenos que ocorrem durante o espaço temporal de um ciclo lítico de replicação de uma partícula bacteriofágica.



Fonte: adaptado de ABEDON (2003).

Os eventos que ocorrem no interior da célula hospedeira imediatamente após a infecção e que culminam com a sua lise, incluem (ver Figura 3) as etapas de **adsorção** da partícula bacteriofágica à membrana celular da célula hospedeira (1: o bacteriófago adere com as suas fibras da cauda a receptores de lipopolissacarídeo e triptofano existentes na superfície do hospedeiro bacteriano), **penetração** (2: o bacteriófago penetra a parede da

célula bacteriana aproximando e contactando a placa da base com a superfície da célula, promovendo uma alteração conformacional que faz com que a baínha se contraia e perfure a membrana celular, injetando o seu núcleo viral na célula bacteriana e liberando assim o genoma viral. Inicia-se assim o complexo comportamento do genoma viral. Alguns dos primeiros genes que são transcritos, chamados precoces, codificam para enzimas que hidrolizam (em apenas alguns minutos após a infecção) o DNA do hospedeiro por forma a utilizar os nucleotídeos do hospedeiro para produzir mais DNA viral), replicação (3: genes iniciais, atrasados, codificam as cerca de 20 proteínas que estão envolvidas na replicação viral. Numa primeira fase, a replicação ocorre de forma bidirecional com múltiplas origens de replicação no genoma. Os primeiros ciclos de replicação são iniciados por primers de RNA sintetizados pela RNA-polimerase do hospedeiro. Numa segunda fase, o bacteriófago utiliza a sua própria maquinaria replicativa para transcrever os seus genes tardios), montagem (4: uma vez expressos os genes tardios, (i) a placa da base viral é primeiro montada, que depois se liga (ii) à cauda e (iii) às proteínas das fibras da cauda. Estas três diferentes vias proteicas combinam-se para formar uma cápside fágica madura. O DNA é empacotado na cápside proteica madura. A cápside também contém enzimas necessárias para futuras infecções, tais como a DNA-polimerase codificada viralmente), e liberação (5: a enzima holina, codificada viralmente, perfura a membrana interior da célula hospedeira bacteriana para permitir que as lisozimas saiam e degradem a parede celular de peptidoglicano. Após a lise celular segue-se a liberação da progenia bacteriofágica para o espaço extracelular, sendo que cada novo virião irá infectar uma nova célula hospedeira viável e dar origem à repetição de todo este processo).

1.4.4. Pré-requisitos para a terapia fágica

Os fagos são, em geral, os predadores naturais das bactérias e, quando em contato com elas, invadem cepas bacterianas específicas e induzem um processo de infecção lítica que está associado primeiramente a uma perturbação metabólica e posteriormente a lise celular, levando à redução do número de células bacterianas viáveis para uma proporção que não represente perigo para o organismo infectado, tal como ilustrado na Figura 4 (ESCOBAR-PARAMO et al., 2012; KUTTER et al., 2010).





Fonte: adaptado de PARRACHO et al. (2012).

A utilização exclusiva de monofagos como agentes terapêuticos pode não ser o ideal, uma vez que, como eles têm um espectro de ação reduzido, podem limitar o potencial da terapia fágica no tratamento de infecções bacterianas quando a cepa bacteriana que causa a infecção não é conhecida. Assim sendo, o espectro de ação lítica pode ser expandido através do uso de um coquetel de partículas fágicas, que é uma mistura de fagos que infectam uma ampla gama de hospedeiros bacterianos, ou seja, um conjunto de bacteriófagos que infectam simultaneamente várias cepas de bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (CHAN et al., 2013).

Há um conjunto de pré-requisitos na terapia fágica que visa evitar o fracasso desta abordagem terapêutica. Tais requisitos estipulam que: (i) apenas os fagos que possuem uma atividade exclusivamente lítica podem ser aplicados; (ii) antes que a terapia seja aplicada com um determinado fago em particular, é absolutamente necessário conhecer a cepa bacteriana causadora da infecção; (iii) as preparações fágicas devem ser isentas de células bacterianas e seus componentes, tais como proteínas, DNA, organelas, endotoxinas, entre outros; (iv) o hospedeiro bacteriano onde o fago deverá atuar deve ser bem conhecido, pois uma mutação que cause alteração no hospedeiro bacteriano conduz a uma terapia ineficaz; e (v) o fago deve ser testado em modelos animais para garantir a eficácia terapêutica, visto que pode mostrar atividade diferente *in vivo* (HERMOSO et al., 2007; SKURNIK; STRAUCH, 2006; LEVIN; BULL, 2004).

1.4.5. Comparativo entre a terapia fágica e a terapia antimicrobiana convencional

Apesar de todas as propriedades inerentes aos fagos estritamente líticos, estes ainda não são uma alternativa completamente estabelecida aos antibióticos químicos convencionais, em função de diversos fatores. Muitos dos resultados negativos que se obtêm na terapia fágica podem ser devidos a falhas na seleção de fagos estritamente líticos, específicos para a bactéria-alvo, uma vez que existe elevada especificidade dos fagos para um determinado hospedeiro bacteriano. Este problema pode ser facilmente ultrapassado (i) determinando a susceptibilidade dos agentes etiológicos da infecção antes de se aplicar a terapia fágica (PEREPANOVA et al., 1995), ou (ii) usando um "coquetel" fágico que lise a maioria das cepas do agente etiológico causador da infecção (GOLSHAHI et al., 2008; SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE et al., 2001; CHERNOMORDIK, 1989).

Os tratamentos fágicos iniciais utilizavam preparações de fagos pouco purificadas, contaminadas com lisados bacterianos contendo endotoxinas bacterianas, que poderiam ter contrariado o efeito dos fagos. A purificação destas preparações fágicas pode ser conseguida através de cromatografia de troca iônica, ultracentrifugação com cloreto de césio e outras técnicas modernas de purificação proteica (BOGOVAZOVA et al., 1992). Outra preocupação relacionada com o uso terapêutico de fagos estritamente líticos prende-se com a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana aos fagos (HYMAN; ABEDON, 2010; LABRIE et al., 2010). A resistência bacteriana aos fagos vai desenvolver-se, sem qualquer sombra de dúvida, mas segundo alguns pesquisadores (HYMAN; ABEDON, 2010; LABRIE et al., 2010; CARLTON, 1999), a taxa de desenvolvimento de resistência bacteriana aos fagos químicos convencionais.

Uma das enormes vantagens da antibioterapia com fagos relativamente aos antibióticos químicos convencionais reside no fato dos primeiros se replicarem diretamente no local da infecção, ficando disponíveis em abundância onde são mais necessários. Quando comparados com os antibióticos, os fagos apresentam outras vantagens relevantes: (i) forte permeabilidade tecidular; (ii) concentração permanentemente elevada no foco da infecção, aumentando continuamente na presença de células viáveis do hospedeiro bacteriano; (iii) a sua eliminação do foco da infecção ocorre apenas após erradicação da bactéria hospedeira; (iv) são totalmente compatíveis com os antibióticos; (v) são extremamente específicos contra a bactéria-alvo; (vi) apresentam uma capacidade superior de penetração nos biofilmes bacterianos, induzindo a produção de enzimas que hidrolizam a

matriz polimérica do biofilme; (vii) a fagoterapia de infecções bacterianas localizadas é altamente eficaz; (viii) embora as bactérias possam desenvolver resistência aos fagos, o processo de isolar novos fagos líticos é muito mais simples e de menor custo do que desenvolver um novo antibiótico; e (ix) a fagoterapia é significativamente mais econômica do que a terapia antibiótica, tanto no desenvolvimento como na produção em larga escala (WESTWATER et al., 2003).

Existem várias formas pelas quais podemos distinguir as terapias fágicas. Primeiro, os fagos podem ser administrados topicamente, diretamente sobre os tecidos corporais, ou oralmente/sistemicamente. Uma segunda forma em que as terapias diferem é na forma de entrega dos fagos, com a administração de partículas fágicas livres como forma mais usual de entrega, ou então bactérias infectadas com fagos como meio de entrega dos fagos a agentes patogênicos intracelulares (BROXMEYER et al., 2002). Existem já na literatura científica, algumas referências a sistemas de encapsulação/liberação de bacteriófagos (BALCÃO et al., 2010,2013a,2014a,b; PUAPERMPOONSIRI et al., 2009; GOLSHAHI et al., 2008).

1.4.6. Resistência bacteriana e cinética dos bacteriófagos

Os mecanismos de resistência bacteriana aos bacteriófagos estão geralmente associados a fenômenos de adaptação bacteriana ao meio, os quais conduzem normalmente à perda dos receptores bacterianos específicos de superfície que permitem a ligação entre a bactéria e o fago. As bactérias podem também induzir a produção de camadas ricas em mucilagem que revestem toda a superfície da bactéria, o que impede o contato do fago com o seu receptor respectivo e consequente adorção à superfície da célula bacteriana (WITTEBOLE et al., 2013).

Além disso, as bactérias podem adquirir resistência por contato com fagos lisogênicos contendo nas suas sequências genéticas genes que codificam para a resistência bacteriana à antibióticos ou toxinas que, após a integração do material genético fágico no genoma da bactéria hospedeira, começam a adquirir resistência a elas. Em adição a estes mecanismos, as bactérias podem hidrolisar o material genético do fago por endonucleases de restrição presentes no seu citoplasma e serem capazes de metilar o seu próprio DNA, que atua como um mecanismo de defesa contra fagos. A resistência bacteriana também pode ser causada por mutações em genes que codificam proteínas essenciais à replicação do fago, ou que sejam necessárias na montagem dos novos viriões (WITTEBOLE et al, 2013; SKURNIK; STRAUCH, 2006). No entanto, as resistências bacterianas nem sempre são favoráveis para a bactéria, porque o que geralmente acontece é que a resistência pode reduzir o desempenho da bactéria ou, se o receptor específico for um fator de virulência, a mutação pode inclusive causar uma redução drástica da sua virulência (SKURNIK; STRAUCH, 2006).

No que diz respeito à "fagocinética", este parâmetro permite estabelecer a quantidade de partículas fágicas que estão disponíveis no local alvo, a fim de executar uma ação terapêutica, descrevendo o impacto que o organismo tem sobre os fagos. Este é um parâmetro bastante complexo devido à natureza de auto-replicação dos fagos. É importante observar que o processo de replicação *in vitro* de um fago pode ser muito diferente do que realmente acontece *in vivo*, uma vez que a "fagocinética" e os "processos fagodinâmicos" *in vivo*, diferem de fago para fago. Assim, a fagocinética na terapia fágica é muito diferente daquela associada aos antibióticos químicos convencionais, apresentando vários parâmetros críticos que devem ser considerados: (i) a taxa de adsorção; (ii) período de latência; (iii) dose inicial do fago; (iv) tempo crítico; (v) taxa de depuração; (vi) capacidade do fago se replicar *in situ*; (vii) anatomofisiologia do hospedeiro; (viii) as condições

ambientais; e **(ix)** distribuição do fago, o que dependerá do sistema imune do indivíduo (SKURNIK; STRAUCH, 2006).

1.4.7. Aplicações da terapia fágica

Ao longo das três últimas décadas, vários estudos científicos têm sido desenvolvidos envolvendo a utilização de bacteriófagos, os quais têm demonstrado a capacidade dos fagos para infectarem bactérias patogênicas tanto em animais como em seres humanos (HUNG et al., 2011). Atualmente, existem alguns modelos experimentais que se destinam à administração de bacteriófagos por via intravenosa (IV) ou por via intraperitoneal, e que exibem eficácia terapêutica. No entanto, a via IV não é ideal, porque não é possível garantir que as soluções de bacteriófagos sejam completamente isentas de pirogênios (MAURA; DEBARBIEUX, 2011). Uma vez que a administração de fagos por via IV não é a primeira opção, um grupo de pesquisadores tentou administrar um coquetel de fagos (contendo os fagos SP15, SP21 e SP22) por via oral, para o tratamento de infecções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* em ratos, sendo que o número de células bacterianas detectadas nas fezes foi reduzida substancialmente. No entanto, os efeitos causados por estas entidades sobre a flora intestinal e a resposta imune ainda são desconhecidos (TANJI et al., 2005).

Outras formas de administração têm sido estudadas e desenvolvidas com base no modelo experimental de aplicação tópica, onde infecções bacterianas da pele podem ser tratadas com a aplicação externa simples de um creme contendo as partículas bacteriofágicas. No entanto, como no caso da administração oral, os efeitos adversos (se existirem) são ainda desconhecidos, tornando-se, portanto, necessário aprofundar o modelo (O'FLAHERTY et al., 2005). Mais recentemente, foi selecionada a administração intranasal para o tratamento de infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ou por *Klebsiella pneumoniae* utilizando os fagos PAK-P1 e SS, respectivamente. No entanto, esta abordagem revelou uma eficácia terapêutica relativamente baixa por comparação com a administração intraperitoneal, a qual foi confirmada por um estudo comparativo realizado por Carmody et al. (2009).

Neste contexto, um outro estudo científico mostrou que uma única instilação intranasal contendo o bacteriófago PAK-P1 é suficientemente eficaz para prevenir a infecção por um período de 24 horas. Mais recentemente, o mesmo resultado foi obtido mas com o fago P3-CHA, que é capaz de eliminar e prevenir infecções pulmonares agudas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente, isolada a partir de um paciente com fibrose

cística num hospital na França (MAURA; DEBARBIEUX, 2011; MORELLO et al., 2011; DEBARBIEUX et al., 2010; CHHIBBER et al., 2008).

Em 2009, a FDA autorizou a fase I de ensaios clínicos envolvendo o uso de um coquetel de fagos aplicado em úlceras venosas, o qual teve como principais alvos as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os resultados deste ensaio clínico demonstraram que o coquetel fágico referido foi seguro e eficaz, por comparação com o grupo controle (MAURA; DEBARBIEUX, 2011; RHOADS et al., 2009). Também em 2009, um ensaio clínico de fase II foi realizado na Grã-Bretanha pela empresa Biocontrol Ltd., tendo demonstrado a eficácia da terapia fágica no tratamento da otite crônica causada por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente (MAURA; DEBARBIEUX, 2011; WRIGHT et al, 2009).

Estudos recentes indicam que um número de partículas fágicas entre 10²-10³ unidades formadoras de placas (UFP) é adequado para induzir a replicação e ação terapêutica em 10⁶-10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas por mililitro (PARRACHO et al., 2012; RHOADS et al., 2009; WRIGHT et al. 2009).

Nos ensaios clínicos mencionados anteriormente, foram usadas preparações contendo bacteriófagos e, para que estas sejam eficazes e usadas com propósitos clínicos, é necessário promover a padronização das metodologias utilizadas, bem como controlar a qualidade final das preparações a serem utilizadas. Assim, deve haver uma caracterização adequada e monitorização das preparações fágicas para aplicação clínica, através de várias técnicas, como por exemplo: (i) sequenciação do DNA fágico; (ii) microscopia eletrônica de varredura e de transmissão; e (iii) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos os bacteriófagos utilizados em ensaios clínicos realizados em seres humanos devem ser estritamente líticos e caracterizados pelas técnicas anteriormente referidas. As preparações bacteriofágicas devem ter uma estabilidade adequada, e as condições do seu armazenamento devem ser otimizadas: a preparação fágica não deve ser exposta a variações extremas de temperatura, pH e umidade relativa. Adicionalmente, todas as preparações fágicas utilizadas em ensaios clínicos devem ser esterilizadas por meio de procedimentos devidamente validados. Todos estes parâmetros são essenciais para garantir a segurança, eficácia e pureza da preparação fágica (JONCZYK et al., 2011; YANG et al., 2010).

A longo prazo, espera-se que ocorra (pelo menos parcialmente) uma renovação do sistema que é utilizado atualmente pela indústria farmacêutica, uma vez que o modelo aplicado hoje em dia não é o mais adequado ou compatível com a terapia fágica. Neste contexto, foram desenvolvidos dois modelos que podem ser utilizados em terapia fágica: (i)

o desenvolvimento convencional de medicamentos, ou (ii) a abordagem tradicional "feito sob medida" (ou *tailor-made*). Assim, neste momento, a comunidade científica questiona se seria rentável produzir preparações de fagos em grande escala e comercializá-las como fármacos convencionais, envolvendo custos de produção elevados e vários meses ou mesmo anos de desenvolvimento, como acontece com o modelo de desenvolvimento convencional de fármacos, ou se o mais adequado seria optar por um modelo racional, personalizado e flexível realizado em hospitais, como é o caso da abordagem tradicional "feito sob medida", envolvendo redução de custos e com desenvolvimento em apenas alguns dias ou semanas (PIRNAY et al., 2011, 2012; KUTTER et al., 2010; MERABISHVILI et al., 2009).

A terapia fágica não é exclusivamente dirigida aos cuidados de saúde, sendo também dirigida para a indústria alimentícia. Apesar de constituirem um autêntico "quebra-cabeças" na produção de produtos de fermentação, tais como queijos e iogurtes, por eliminarem as bactérias necessárias para a sua produção, os fagos são usados para destruir os agentes patogênicos de origem alimentar. Existem atualmente vários produtos à base de fagos disponíveis no mercado, aprovados pela FDA, com o objetivo de controlar e/ou prevenir infecções bacterianas em processos de produção de alimentos. A comercialização de produtos à base de bacteriófagos para uso na agricultura, pecuária e em alimentos já foi autorizada por alguns países nos continentes americano e europeu, podendo citar-se como exemplo o LISTEX P100[™], preparação bacteriofágica com amplo espectro lítico de ação contra *Listeria monocytogenes*, utilizada inclusive no Brasil desde 2012 na fabricação de queijos, embutidos e outros produtos alimentícios (CHAN et al., 2013; MAURA; DEBARBIEUX, 2011; HAGENS; LOESSNER, 2010; O'FLAHERTY et al., 2009).

Atualmente, existem preparações fágicas contra vários tipos de bactérias (como *Escherichia coli* e *Salmonella spp*.) para serem utilizadas em alimentos de origem animal e administradas antes do gado e frangos serem abatidos. A Intralytix, uma empresa americana direcionada para as áreas alimentícia, de saúde humana e animal, bem como para as questões ambientais, desenvolveu inúmeras preparações de fagos que podem ser utilizadas no controle e prevenção de bactérias responsáveis pela contaminação dos alimentos, a saber: (i) ListShield[™], para o controle de listeriose, autorizada pela FDA em Agosto de 2006; (ii) EcoShield [™], usada para evitar a contaminação dos alimentos por *Escherichia coli*; e (iii) SalmoFresh[™], que reduz a contaminação causada por *Salmonella* em alimentos (INTRALYTIX, 2016; BALOGH et al., 2010; HAGENS; LOESSNER, 2010; ATTERBURY, 2009).

TechnoPhage e Innophage são duas empresas portuguesas que promovem a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com base nas propriedades únicas dos bacteriófagos, direcionados para o tratamento, diagnóstico e prevenção de infecções

bacterianas dentro das comunidades, hospitais e indústria alimentícia (INNOPHAGE, 2016; TECHNOPHAGE SA, 2016).

Os avanços tecnológicos recentes neste campo abriram portas à possibilidade de personalizar os bacteriófagos, melhorando algumas das suas características, como: (i) expandir a capacidade de penetração dos bacteriófagos nos biofilmes bacterianos; (ii) aumentar a potência e eficácia dos bacteriófagos; (iii) adaptar o espectro de atividade dos bacteriófagos para infecções provocadas por inúmeras espécies e cepas bacterianas; e (iv) tornar os bacteriófagos mais estáveis e específicos (MAURA; DEBARBIEUX , 2011; POUILLOT et al., 2010; SOTO; RATNA, 2010; LU e COLLINS, 2009).

Nos Estados Unidos da América está atualmente em estudo a possibilidade de integrar bacteriófagos nas águas de esgoto e no sistema de tratamento de água potável, envolvendo o isolamento de fagos presentes nas águas de esgoto através de filtros de nylon e, subsequentemente, a aplicação destes no esgoto e na água para consumo, contribuindo desta forma com o aumento da qualidade e promoção da saúde pública, prevenindo a proliferação de bactérias multi-resistentes (POTERA, 2013; TAMAKI et al., 2012).

1.5. Terapêutica por nebulização

A terapêutica por nebulização refere-se à entrega de um determinado composto terapêutico no organismo através das vias respiratórias, numa forma nebulizada (GOLSHAHI et al., 2008). Apesar do trato respiratório oferecer uma grande área de absorção, a grande maioria dos aerossóis é desenvolvida para uso tópico. A grande vantagem no uso dos aerossóis reside na entrega de elevadas concentrações de compostos terapêuticos diretamente na zona alvo. Desta forma, consegue produzir-se uma resposta terapêutica com uma dose menor de fármaco do que se este fosse administrado por via sistêmica. Outra vantagem desta forma de administração de compostos farmacêuticos é a rapidez com que estes chegam ao local intencionado de ação (BALCÃO; VILA, 2015; BALCÃO et al., 2010, 2014a,b).

Antibióticos e bacteriófagos podem ser administrados localmente em doentes com infecções pulmonares, como no caso de pneumonia bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes imunocomprometidos (BALCÃO et al., 2010; PUAPERMPOONSIRI et al., 2009; GOLSHAHI et al., 2008). A deposição do aerossol é conseguida através de três mecanismos-chave, (i) o impacto da inércia, (ii) sedimentação, e (iii) difusão. Estes três mecanismos reagem de forma diferente, dependendo do agente

terapêutico utilizado e do local de ação na árvore pulmonar. O impacto da inércia é o principal mecanismo responsável pela deposição de partículas com tamanho superior a 3 µm, que só atingem o trato respiratório superior (GOLSHAHI et al., 2008; HORHOTA; SAIM, 1998) (ver Figura 5).







Fonte: adaptado de HORHOTA e SAIM (1998).

Aerossóis cujas partículas apresentam tamanho compreendido entre 1 e 3 µm estão sujeitos a sedimentação gravitacional. O mecanismo dominante para partículas menores, de tamanhos inferiores a 0,5 µm, é a difusão através de movimentos Brownianos. A quantidade de agente terapêutico descarregado no local intencionado de ação depende ainda das propriedades físico-químicas do aerossol e de fatores inerentes ao próprio paciente, que incluem a capacidade de ventilação, estado das vias respiratórias e mecanismos pulmonares. A deposição do aerossol depende de características tais como, diâmetro das partículas, densidade, carga elétrica, higroscopia, forma e velocidade do aerossol. Estas características dependem, por sua vez, do agente terapêutico utilizado, da formulação escolhida e do aparelho nebulizador.

O fator mais importante na entrega de um determinado composto terapêutico nos pulmões é, portanto, o tamanho da partícula. Uma partícula com diâmetro superior a 5 µm é filtrada e retida no trato respiratório superior. Partículas com tamanho inferior a 2 µm são consideradas ideais, visto que conseguem atingir o trato respiratório inferior (GOLSHAHI et al., 2008). As características físico-químicas do agente terapêutico desempenham também

b

um papel muito importante na penetração do aerossol. Agentes higroscópicos tendem a aumentar de tamanho em contato com umidade, o que pode afetar a eficácia da entrega do agente terapêutico. Micropartículas com formas mais aerodinâmicas tendem a ter maior capacidade de penetração. A velocidade com que o aerossol é descarregado também afeta a fração de agente terapêutico entregue no trato respiratório inferior. Se o aerossol for descarregado a uma velocidade muito elevada, tende a ficar depositado na orofaringe (GOLSHAHI et al., 2008).

Diversos estudos foram publicados sobre a nebulização e aerossolização de bacteriófagos para ação direta no local de infecções pulmonares. Semler e colaboradores (2014) avaliaram, em ratos, a eficácia terapêutica de bacteriófagos líticos para o complexo *Burkholderia cepacia* em doenças respiratórias, com administração paralela via aerossol e via intraperitoneal, tendo concluído que a entrega por aerossolização foi mais eficaz na diminuição da carga bacteriana alojada nos pulmões. A nebulização do coquetel Pyophage[™] foi eficaz no tratamento de uma criança com fibrose cística, infectada com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, segundo Abedon et al. (2011) e Kvachadze et al. (2011).

1.6. Emulsões múltiplas do tipo A/O/A e estabilização proteica

Genericamente falando, as emulsões, considerando nanoemulsões e microemulsões, são sistemas formados quando óleo e água são misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado com um álcool de cadeia carbonada média. Existem, neste contexto, as emulsões simples e as emulsões múltiplas. Devido à sua estrutura interna compartimentalizada, as emulsões múltiplas do tipo A/O/A apresentam importantes vantagens sobre as emulsões simples óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O) para a encapsulação de biomoléculas, tais como a capacidade de transportar tanto moléculas polares como moléculas não polares, e um maior controle sobre a liberação de moléculas terapêuticas (HANSON et al., 2008; PAYS et al., 2002; DAVIS; WALKER, 1987). Nanoemulsões são dispersões onde o tamanho das gotas dispersas está em escala nanométrica, na qual a faixa de tamanhos hidrodinâmicos está compreendida entre 10 e 500 nanômetros. Este pequeno tamanho de gotículas dispersas confere-lhes estabilidade, evitando processos de cremeação (SIGWARD et al., 2013; FRYD; MASON, 2012; SCHWARZ et al., 2012; DEVARAJAN; RAVICHANDRAN, 2011).

As nanoemulsões múltiplas são sistemas heterogêneos, onde dois líquidos imiscíveis são misturados e estabilizados por agentes emulsificantes (GLASSER et al., 2016a,b;

BALCÃO et al., 2010). Estas nanoemulsões podem ser do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). Nos sistemas A/O/A, pequenas vesículas aquosas são retidas no interior de vesículas lipídicas maiores que, por sua vez, estão dispersas numa fase aquosa (externa) contínua. O sistema A/O/A tem vantagens relativamente ao sistema O/A/O visto que o primeiro tem água na sua fase externa, permitindo por isso uma maior gama de aplicações. As nanoemulsões múltiplas possuem várias vantagens, destacando-se a biocompatibilidade e a total biodegradabilidade (BALCÃO et al., 2010). Podem ser usadas para reter tanto compostos hidrofílicos como compostos hidrofóbicos, para direcionamento de fármacos, para mascarar sabores desagradáveis conferidos por algumas moléculas bioativas, para prolongar a liberação de um determinado ingrediente ativo, para melhorar a dissolução ou solubilização de materiais insolúveis, funcionando ainda como proteção de moléculas ativas sensíveis ou como capa de invisibilidade (*stealth*) para evasão ao sistema imunológico (BALCÃO; VILA, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabilização estrutural e funcional de partículas bacteriofágicas no núcleo aquoso interno de uma emulsão múltipla do tipo A/O/A, para preparação de sistema bioterapêutico com potencial para o tratamento inalatório de pneumonia bacteriana.

2.2. Objetivos específicos

Especificamente, o trabalho de pesquisa almejou a:

- Propagação de bacteriófago (JG004, DSM 19871) estritamente lítico em hospedeiro bacteriano específico *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 19880) e purificação do mesmo com produção de suspensão bacteriofágica concentrada;
- Preparação de emulsão múltipla A/O/A, partindo de formulação previamente otimizada estatisticamente, aprisionando as partículas bacteriofágicas no seu núcleo aquoso interno;
- Quantificação da eficiência de encapsulação das partículas bacteriofágicas;
- Análise do potencial antimicrobiano (*in vitro*) da(s) emulsão(ões) múltiplas e da formulação isotônica com elas formulada;
- Caracterização físico-química (crio/NS-MET, FTIR, XRD, DLS (HS, ZP, PI), NTA, TG, DSC, pH);
- Formulação de uma solução isotônica utilizando a emulsão múltipla contendo bacteriófagos estabilizados no seu núcleo aquoso interno;
- Q Avaliação (in vitro) do potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo da(s) emulsão(ões) múltiplas e da formulação isotônica.

3. JUSTIFICATIVA

O avanço das infecções causadas por cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e a fraca penetração dos antibióticos em biofilmes bacterianos traz a necessidade de desenvolvimento de alternativas seguras e efetivas para tratamentos antimicrobianos.

A terapia fágica apresenta-se como uma alternativa, ou complemento, aos antibióticos convencionais, e a estabilização estrutural e funcional de bacteriófagos estritamente líticos para *Pseudomonas aeruginosa* em sistemas de emulsão múltipla A/O/A (A_{in}-O-A_{ext}) demonstra ser uma tecnologia promissora para a veiculação das partículas bacteriofágicas visando o tratamento por nebulização de pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Material

4.1.1. Material biológico

Bacteriófago: JG004 (DSMZ *collection*, ref. DSM 19871), estritamente lítico contra *Pseudomonas aeruginosa*, adquirido do Instituto Leibniz DSMZ - Coleção alemã de microrganismos e cultura de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmmH, Braunschweig, Alemanha). **Bactéria hospedeira:** *Pseudomonas aeruginosa* (DSMZ *collection*, ref. DSM 19880), adquirida do Instituto Leibniz DSMZ. **Linhagens celulares:** Células de pulmão normal de hamster chinês (linhagem V79-4, BCRJ cod.: 0244, Banco de Células do Rio de Janeiro, Duque de Caxias RJ, Brasil), células epiteliais de carcinoma de pulmão humano, caucasiano (linhagem A549, BCRJ cod.: 0033, Banco de Células do Rio de Janeiro, Duque de Caxias RJ, Brasil), fibroblastos de embrião de camundongo albino suíço (3T3, BCRJ cod.: 0017, Banco de Células do Rio de Janeiro, Duque de Caxias RJ, Brasil). As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5% CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo D-glucose (4.5 g/L), L-glutamina (584.0 mg/L), piruvato de sódio (100 mg/mL) e bicarbonato de sódio (3.7 g/L) (Gibco Life Technologies, Alto de Pinheiros, São Paulo/SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e sulfato de estreptomicina).

4.1.2. Reagentes e consumíveis

Lipídeos: Softisan100[™] (glicerídeos hidrogenados de coco consistindo exclusivamente em ácidos graxos saturados de origem vegetal com tamanhos de cadeia carbonada entre C10 - C18) foi uma oferta da Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburgo, Alemanha). O glicerol (anidro) foi adquirido da Fluka (Steinheim, Alemanha). *Surfactantes*: O Tween 80 foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, E.U.A.). O Kolliphor P188[™] (anteriormente Lutrol F68[™], ou poloxâmero 188) foi uma oferta da BASF ChemTrade GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A fosfatidilcolina de soja (lecitina) foi adquirida da Alamar Tecno-Científica Ltda (Diadema/SP, Brasil). *Outros reagentes*: O ácido clorídrico comercial (HCI a 37%, m/m) foi adquirido da ECIBRA Reagentes Analíticos

(Curitiba/PR, Brasil). O fosfato de sódio dibásico anidro, o fosfato de sódio monobásico, o cloreto de cálcio e o cloreto de sódio foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Diadema/SP, Brasil). O Nipagin[™] (metilparabeno) e o sulfato de magnésio foram adquiridos da Labsynth (Diadema/SP, Brasil). Os meios de cultura Luria Bertani Broth, Miller (LB Broth) foram adquiridos da HiMedia Laboratories Pvt. Ltd (Mumbai, Índia) e o ágar sólido foi adquirido da Gibco Diagnostics (Madison WI, EUA). O sistema de filtração esterilizante Stericup[®]-GP, com membrana polietersulfônica (PES) com 0,22 μm de tamanho de poro foi gentilmente cedido pela Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha). A água foi ultra-purificada num sistema Milli-Q Elga Purelab (Molsheim, França) até uma condutividade final de cerca de 18.2 MΩ.cm⁻¹. Os solventes utilizados foram todos de grau analítico ou superior, sem qualquer tipo de purificação adicional. O kit de apoptose Tali® 152 foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad CA, E.U.A.). O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), o dimetilsulfóxido (DMSO) e a tripsina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, E.U.A.).

4.1.3. Equipamentos analíticos e outros

Para a propagação e purificação do bacteriófago e determinação da atividade antimicrobiana foram realizados no LAPETOX (UNISO) onde foram utilizados cabine de fluxo laminar (TROX do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), autoclave (modelo AV Plus, Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil), estufa de incubação microbiológica da FANEM (modelo 502, São Paulo, Brasil), e centrífuga (modelo 5T16R, Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.). Todas as leituras de pH foram realizadas num pH-metro da Tecnal (Piracicaba/SP, Brasil) com eletrodo de pH (modelo SC09, Sensoglass, São Paulo, Brasil). Nas etapas de homogeneização da suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas foi também utilizado um vortex da FISATOM (modelo 774, São Paulo, Brasil). Para a produção da emulsão múltipla A/O/A foi utilizado um homogenizador UltraTurrax (modelo T25D, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha), placa de aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba, Brasil) e placa agitadora (CentralLab, Alagoas, Brasil). Nas determinações analíticas de potencial Zeta, tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão, foi utilizado um sistema DLSZetaPALS Plus (modelo NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, E.U.A.), onde os equipamentos utilizados nesta etapa pertencem ao LaBNUS-UNISO (Parque Tecnológico de Sorocaba). A caracterização termogravimétrica das emulsões múltiplas foi realizada por análise termogravimétrica (TG) enquanto as análises térmicas foram realizadas num calorímetro diferencial de varredura (DSC) no laboratório do Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP, Campinas). As análises de TG foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.), enquanto as análises de DSC foram realizadas num microcalorímetro diferencial de varredura também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.). Todas as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no LNNANO (CNPEM, Campinas) em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) da JEOL (modelo TEM-1400Plus, Tokyo, Japão), equipado com filamento de hexaboreto de lantano (LaB₆), operando a 120kV; o microscópio estava equipado com uma câmera CCD de alta resolução da GATAN Inc. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, E.U.A.) com resolução de 1k x 1k pixels para aquisição de imagens digitais. As amostras para as análises por TEM foram preparadas em grelhas de carbono Lacey tipo A com malha de cobre de 400 mesh (Ted Pella Inc., Redding CA, E.U.A.), previamente sujeitas ao procedimento de descarga luminescente num equipamento easiGlow da PELCO (Redding CA, E.U.A.). As amostras foram vitrificadas num equipamento robotizado Vitrobot Mark IV (FEI, Eindhoven, Holanda), para análises porCrio-MET. Para a análise de resultados (imagens de TEM e medidas), foi utilizado o software Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton CA, E.U.A.).Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da AGILENT (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.) e os difratogramas de raios-X foram obtidos num difratômetro de raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão), equipamentos pertencentes ao IQ-UNICAMP. As análises de nanopartículas por rastreamento (NTA) foram realizadas num dispositivo NanoSight da Malvern Instruments Ltd (modelo LM14C, Worcestershire, Reino Unido)equipado com câmera CMOS e controle de temperatura da amostra pelo software NanoSight, versão 3.1 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), equipamento pertencente ao Departamento de Engenharia Ambiental da UNESP (campus Sorocaba). Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis da Perkin Elmer (modelo Lambda 3s, Waltham MA, E.U.A.) no LAPETOX (UNISO, Sorocaba). As leituras de viabilidade celular nos ensaios de MTT foram realizadas num leitor de microplacas ELISA da Robonik India Private LTD. (modelo Readwell PLATE, Maharashtra, India). As análises de microscopia ótica para os ensaios Cometa™ foram realizadas num microscópio óticoda Zeiss (modelo Axiovert-60, Carl-Zeiss, Göschwitzer Str., Jena, Alemanha), no laboratório de Biotecnologia da UNISO (Sorocaba).

4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Propagação e purificação do concentrado bacteriofágico

4.2.1.1. Preparação dos meios de cultura e tampão fágico

Meio líquido LB Broth: 25 g de meio de cultura Luria Bertani Miller foram dissolvidos em 1000 mL de água ultrapura, em balão volumétrico de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL e esterilizada em autoclave à 127 °C por 20 minutos; Bottom ágar: 25 g de meio de cultura Luria Bertani Miller e 16 g de ágar bacteriológico foram dissolvidos em 1000 mL de água ultrapura em balão volumétrico de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL e esterilizada em autoclave a 127 °C por 20 minutos; Top ágar: 25 g de meio de cultura Luria Bertani Miller e 7 g de ágar bacteriológico foram dissolvidos em 1000 mL de água ultrapura em balão volumétrico de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL de água ultrapura em balão volumétrico de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL e esterilizada em autoclave à 127 °C por 20 minutos; Top ágar: 25 g de meio de cultura Luria Bertani Miller e 7 g de ágar bacteriológico foram dissolvidos em 1000 mL de água ultrapura em balão volumétrico de 1000 mL, sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL e esterilizada em autoclave à 127 °C por 20 minutos; Tampão fágico: 7 g de K₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl, 0,1204 g de MgSO₄, e 0,1110 g de CaCl₂ foram dissolvidos em 1000mL de água ultrapura em balão volumétrico de 1000 mL (produzindo assim uma solução contendo 40.19 mM K₂HPO₄, 22.05 mM KH₂PO₄, 85.55 mM NaCl, 1.00 mM MgSO₄ e 1.00 mM CaCl₂), sendo a solução resultante transferida para um frasco Schott de 1000 mL e esterilizada em autoclave à 127 °C por 20 minutos.

4.2.1.2. Obtenção da suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa DSM 19880

A cepa bacteriana pura de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 19880, com grau de perigosidade de nível 2, obtida liofilizada em ampolas de vidro seladas da DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmmH, Braunschweig, Alemanha), foi reidratada seguindo orientações do fabricante. Sob condições assépticas em capela de segurança biológica de classe 2, do tipo II, ao conteúdo liofilizado da ampola foram adicionados 500 µL de caldo LB Broth, agitado suavemente até total dispersão do liofilizado e o conteúdo total da ampola transferido para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de caldo LB Broth esterilizado (ver Figura 6). Após uma suave homogeneização em vórtex, foram retirados 1000 µL com micropipeta Gilson e ponteira estéril, vertidos sobre uma placa de

Petri contendo 25 mL de Bottom ágar solidificado (Luria Bertani) e espalhados na superfície do meio sólido. Tanto o tubo de ensaio como a placa de Petri foram então incubados em estufa à 37 °C por 24 horas. Esta cultura bacteriana foi repicada semanalmente até o término do trabalho experimental, de forma a manter a viabilidade bacteriana e a fase exponencial de crescimento da mesma (ver Figura 6).

Para a preparação da suspensão bacteriana que seria utilizada na propagação das partículas bacteriofágicas, uma única unidade formadora de colônia (UFC) foi removida da placa de Petri com alça estéril, inoculada em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo LB Broth e incubada em estufa à 37 °C por 18 horas (ver Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática das etapas laboratoriais de preparação da suspensão bacteriana de *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.



Fonte: elaboração própria.

4.2.1.3. Propagação e purificação das partículas bacteriofágicas JG004 (DSM 19871)

O bacteriófago utilizado neste trabalho de pesquisa (fago JG004, ref. DSM 19871) foi propagado utilizando um microrganismo hospedeiro específico, a *Pseudomonas aeruginosa* (ref. DSM 19880), cultivada em meio líquido LB Broth (ver Figura 5). Para a propagação do bacteriófago JG004 (suspensão concentrada com lisado bacteriano adquirida à DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmmH, Braunschweig, Alemanha), a suspensão concentrada com lisado bacteriano (mantida à 4 °C) foi diluída em série ($1x10^{-1} - 1x10^{-10}$) em tampão fágico estéril ($100 \ \mu L_{suspensão} \ bacteriofágica +900 \ \mu L_{tampão fágico}$), em duplicata (ver Figura 7). Numa série de tubos de ensaio contendo 4 mL de LB top ágar esterilizado (mantidos à 40 °C), foram adicionados 300 μ L de uma cultura líquida de *Pseudomonas aeruginosa* (preparada com uma diluição de 1000 μ L da suspensão bacteriana inoculada anteriormente em 9000 μ L de caldo LB Broth) e foram adicionados 1000 μ L de uma dada diluição fágica decimal. Cada mistura resultante foi suavemente agitada e imediatamente vertida e espalhada em diferentes placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 25 mL de LB bottom ágar solidificado. As placas foram então incubadas durante a noite à 37 °C (ver Figura 7).





Fonte: elaboração própria.

Após incubação, todas as placas de Petri foram inspecionadas visualmente para a presença de unidades formadoras de placas (PFUs, halos de inibição de crescimento) e, para aquelas onde se verificou lise completa do tapete bacteriano ou onde eram visíveis PFUs, procedeu-se à purificação das partículas fágicas (ver Figura 8). Para tal, foram adicionados 3 mL de tampão fágico estéril a cada placa e as mesmas isoladas com Parafilm[™] (para impedir a desidratação do meio de cultura e evaporação do tampão fágico), tendo estas sido incubadas novamente durante 3 horas à temperatura ambiente. Após este período de tempo, as placas de Petri foram abertas em cabine de segurança biológica de classe 2, tipo II, a camada de top ágar foi fragmentada arrastando suavemente uma alça estéril (ver Figura 8), e a mistura de top ágar e tampão fágico recolhida para um tubo Falcon estéril de 50 mL. Os debris celulares e o ágar foram então removidos por centrifugação a 5500 rpm durante 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido e filtrado a vácuo através de um sistema de filtração esterilizante Stericup[®]-GP (equipado com membrana PES de 0,22 µm de tamanho de poro). A solução estéril resultante constituiu assim a suspensão estoque concentrada de partículas bacteriofágicas JG004, tendo sido armazenada à 4 °C até utilização (ver Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática das etapas laboratoriais de purificação das partículas bacteriofágicas JG004 (DSM 19871) propagadas no seu hospedeiro específico *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.



Fonte: elaboração própria.

4.2.1.4. Determinação do título fágico

Para determinação da concentração de partículas bacteriofágicas na suspensão estoque concentrada, o procedimento de propagação foi repetido, mas com pequenas diferenças, no plaqueamento de uma camada de top ágar contendo 100 µL de uma dada diluição decimal da suspensão estoque de fagos em tampão fágico e 300 µL da suspensão bacteriana, em placas de Petri de 90-mm de diâmetro contendo 25 mL de bottom ágar solidificado (Luria-Bertani ágar) (ver Figura 9). Este procedimento foi realizado em triplicata, com cada placa de Petri a ser incubada durante 24 h a uma temperatura diferente, i.e. 30 °C, 37 °C e 25 °C, por forma a verificar a temperatura ótima para a infecção fágica bacteriana. Após incubação, as placas de Petri foram inspecionadas visualmente para a presença de placas fágicas e o número de unidades formadoras de placas (PFU's) foi devidamente registrado em cada tapete bacteriano, após o que a Equação (1) foi aplicada para calcular a concentração de partículas fágicas.

Concentração de partículas fágicas (PFU/mL) = Número de PFU's ×
$$\frac{1}{\text{Diluição}}$$
 × $\frac{1}{V_{\text{inóculo}}(\text{mL})}$ (1)

Figura 9. Representação esquemática das etapas laboratoriais de quantificação do título fágico na suspensão concentrada de bacteriófago JG004 produzida a partir da sua propagação no hospedeiro específico *Pseudomonas aerugino*sa DSM 19880.



Fonte: elaboração própria.

4.2.2. Preparação da emulsão múltipla do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas

A suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas foi incorporada em uma formulação de emulsão múltipla do tipo A/O/A que teve como ponto de partida as formulações já otimizadas estatisticamente de acordo com um planejamento fatorial completo do tipo 2³x3¹, pelo Professor Doutor Victor Balcão e pela Mestre Cássia Antunes Glasser (GLASSER et al., 2016a,b). Foram produzidas formulações contendo duas concentrações de suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas, 10µL (ME10) contendo 1,5751x10⁷ viriões e 1000µL (ME1000) contendo 1,5751x10⁹ viriões (ver Quadro 2).

O processo para produzir as emulsões múltiplas do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo entidades proteicas aprisionadas no núcleo aquoso interno foi realizado em dois ciclos de homogeneização a alta velocidade de rotação, utilizando um homogeneizador UltraTurrax (modelo T25D da IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha) à temperatura constante de 39 °C (ver Figura 10).

Figura 10. Configuração experimental utilizada no preparo das emulsões múltiplas do tipo A/O/A, consistindo num homogeneizador UltraTurrax acoplado a uma placa de aquecimento com banho-



maria à 39 °C.

Fonte: Elaboração própria.

Foram preparadas duas emulsões sequencialmente, uma emulsão primária (simples) (A_{in}/O), seguido de emulsificação desta emulsão numa outra fase aquosa (externa) (A_{ext}), formando assim uma (segunda) emulsão (múltipla) do tipo água-em-óleo-em-água (A_{in}/O/A_{ext}) (ver Figura 11).





emulsificante hidrofóbico (lecitina))

Fonte: adaptado de BALCÃO et al. (2015).

4.2.2.1. Preparação da emulsão primária (Ain/O)

Em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 39 °C (± 0,5 °C) fundiu-se o lipídeo (Softisan 100TM, 500 mg) e o emulsificante lipofílico (lecitina de soja, 375 mg) num mesmo béquer, juntamente com glicerol (5 mL) (constituíndo a fase Oleosa) e, num outro béquer, a fase aquosa interna (Ain) contendo as partículas bacteriofágicas (5 mL HCl 20 mM (ME1) ou 20 µL HCl 1000 mM (ME2) e 50 mg Tween 80TM (ME1) ou 10 mg Tween 80TM (ME2), acrescido de 50 µL (ME1) ou 1000 µL (ME2) de suspensão bacteriofágica concentrada) foi termostatizada à mesma temperatura. Depois de completada a fusão da fase Oleosa e aquecimento da fase aquosa interna, 1000 µL de A_{in} (ME1) ou o volume total de A_{in} (ME2) foram adicionados à fase Oleosa, seguido de homogeneização com o UltraTurrax (10 min à 12500 rpm), mantendo a temperatura de 39 °C, formando assim uma emulsão A_{in}/O.

4.2.2.2. Preparação da emulsão múltipla do tipo (Ain/O)/Aext

No final do primeiro ciclo de homogeneização, após formação de uma emulsão primária do tipo água-em-óleo (A/O), metade da fase aquosa externa (A_{ext}) (mantida à 39 °C) contendo o poloxâmero 188 (preparada dissolvendo 250 mg de poloxâmero 188 e 50 mg de metilparabeno em 41.5 mL água ultrapura) foi adicionada lentamente à emulsão primária seguindo-se novo ciclo de homogeneização à alta velocidade de agitação (10 minutos a 12500 rpm). Terminado o segundo ciclo de homogeneização, a metade restante da fase aquosa externa (que se encontrava à temperatura ambiente) foi acrescentada lentamente à emulsão múltipla (A/O)/A, mantendo-se uma agitação suave de 100 rpm à temperatura ambiente até que a emulsão resultante atingisse esta temperatura. A composição das formulações de emulsão múltipla do tipo A/O/A produzidas encontram-se no Quadro 2. Emulsões múltiplas controle (ou placebo) foram também produzidas, sem entidades fágicas, onde no lugar da suspensão concentrada do bacteriófago foi adicionada água ultrapura, e armazenadas sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e umidade relativa.

Componentes		Função na	% (m/m)			
		formulação	ME10	ME1000	MEPLC	
Fase Aquosa interna (A _{in})	Suspensão fágica concentrada	Agente antibacteriano ativo	0,02 (10 µL de suspensão fágica concentrada)	2,00 (1000 µL de suspensão fágica concentrada)	2,00 (1000 µL de água ultrapura)	
			1,57510x10 ⁷ viriões	1,57510x10 ⁹ viriões	0 viriões	
	Tween 80	Tensoativo não- iônico	0,02	0,02	0,02	
	HCI 20 mM	Elotrólito	1,96			
	HCI 1000 mM	Eletionito		0,04	0,04	
Fase Oleosa (O)	Softisan100™	Lipídeo	1,00	1,00	1,00	
	Fosfatidilcolina de soja	Surfactante lipofílico	0,75	0,75	0,75	
	Glicerol	Protetor, co- surfactante	12,60	12,60	12,60	
Fase Aquosa externa (A _{ext})	Poloxâmero P188	Surfactante hidrofílico	0,50	0,50	0,50	
	Metilparabeno	Conservante, antifúngico	0,10	0,10	0,10	
	Água ultrapura	Diluente	83,05	82,99	82,99	
TOTAL			100,00	100,00	100,00	

Quadro 2. Composição das emulsões múltiplas (ME) do tipo A/O/A produzidas, contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas (%, m/m).

Fonte: elaboração própria. (**Legenda:** ME, emulsão múltipla (do tipo A/O/A); MEPLC, emulsão múltipla placebo).

O lipídeo sólido acima mencionado (Softisan100[™]) foi testado como possível constituinte da fase oleosa uma vez que é considerado um lipídeo para formulações de liberação modificada. Todas as formulações preparadas exibiram uma aparência leitosa e uniforme.

4.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação das partículas bacteriofágicas no núcleo aquoso interno da emulsão múltipla A/O/A

Para a determinação da eficiência de encapsulação, foi desenvolvido um ensaio espectrofotométrico para quantificar as partículas de bacteriófago em suspensão antes e após o processo de produção das várias emulsões múltiplas. O ensaio espectrofotométrico foi desenvolvido com base no procedimento (Espectro de absorção e quantificação de fagos filamentosos) descrito pelo Prof. George P. Smith (Division of Biological Sciences, Tucker Hall, Universidade do Missouri, Columbia MO, EUA), com modificações. Esta técnica baseia-se na relação constante entre o tamanho do DNA do fago e a quantidade da principal proteína de revestimento na cápside (proteína VIII), os quais, juntos, são os principais contribuidores para o espectro de absorção na zona do ultravioleta (UV). O professor George P. Smith verificou, com base nos dados de Day e Wiseman (1978) um máximo de absorção na região do UV à 269 nm, como se pode ver na Figura 12a. Nas medições realizadas no trabalho de pesquisa aqui descrito, o máximo de absorção foi obtido a cerca de 255 nm (ver Figura 12b). Esta diferença pode ser explicada pelo fato do professor George P. Smith ter estudado fagos filamentosos que possuem cerca de 6 vezes mais proteína do que DNA, enquanto que no caso do bacteriófago JG004, estritamente lítico para Pseudomonas aeruginosa, ele é esférico com proporções mássicas de proteína e DNA quase iguais, sendo que a proteína contribui de forma substancial para o espectro de absorção.

Figura 12. Espectro de absorção de partículas fágicas na região do ultravioleta retirado do estudo do professor George P. Smith (a), e espectro na região do ultravioleta obtido neste trabalho de pesquisa com a suspensão concentrada de bacteriófagos (b). Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos na região de comprimentos de onda entre 240 nm e 320 nm.



(a) http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html, acesso em 31 de maio de 2015); (b) Elaboração própria.

Fonte:

Partindo da concentração de partículas fágicas calculada a partir dos procedimentos microbiológicos descritos anteriormente, foram preparadas cinco diluições em água ultrapura (até um volume total de 5,0 mL), utilizando diferentes volumes da suspensão fágica concentrada preparada, e a absorbância das diluições resultantes foi determinada à 255 nm (comprimento de onda que produz o máximo de absorção da suspensão concentrada em partículas bacteriofágicas) e à 320 nm (comprimento de onda onde há pouca absorção da luz a partir dos cromóforos dos fagos) (ver Quadro 3). A subtração da Abs₃₂₀, um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz a partir dos cromóforos dos fagos, é suposta corrigir grosseiramente o espalhamento de luz produzido a partir das partículas fágicas e partículas contaminantes não-fágicas tais como debris provenientes das paredes celulares bacterianas lisadas.

em:

Quadro 3. Dados utilizados para preparar a curva de calibração com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar das partículas bacteriofágicas (JG004) inteiras.

Alíquota de suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas (µL)	Volume final da diluição (mL)	Número de PFU's na alíquota de suspensão fágica concentrada	Concentração de partículas fágicas (PFUs/mL)	Abs _{255 nm}	Abs _{320 nm}	Abs _{255nm} - Abs _{320nm}
150,00	5,00	4,4738x10 ⁸	8,94750x10 ⁷	0,2450	0,0510	0,1940
200,00	5,00	5,9650x10 ⁸	1,19300x10 ⁸	0,5230	0,1080	0,4150
250,00	5,00	7,4563x10 ⁸	1,49125x10 ⁸	0,8840	0,1830	0,7010
300,00	5,00	8,9475x10 ⁸	1,78950x10 ⁸	1,1800	0,2430	0,9370
350,00	5,00	1,0439x10 ⁹	2,08775x10 ⁸	1,5040	0,3140	1,1900

Fonte: elaboração própria.

Realizando um ajuste linear aos dados apresentados no Quadro 3 (ver Figura 13), obteve-se a equação linear Abs_{255nm} - $Abs_{320nm} = 8,3487x10^{-9} x$ [Partículas bacteriofágicas, PFUs/mL]- 0,5696 (r² = 0,99887), e aplicando a equação de Beer-Lambert aos dados permitiu-se obter o coeficiente de extinção molar das partículas (inteiras) do bacteriófago JG004 como sendo $\varepsilon = 8,3487x10^{-09}$ (PFUs / mL)⁻¹ • cm⁻¹ e, desta forma, produziu-se uma fórmula (Equação (2)) para o cálculo da concentração física das partículas bacteriofágicas.

Figura 13. Curva de calibração obtida para a relação entre a concentração de partículas bacteriofágicas em suspensão e a absorbância da solução à 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas a um comprimento de onda de 320 nm.



Fonte: elaboração própria.

Concentração de partículas bacteriofágicas =
$$\frac{Abs_{@255nm} - Abs_{@320nm}}{8,3487 \times 10^{-9}} \text{ viriões} \cdot \text{mL}^{-1}$$
(2)

A Equação (2) foi então aplicada para calcular a concentração de partículas fágicas (viriões / mL) no sobrenadante das emulsões múltiplas após centrifugação à 12500 rpm durante 10 min à 4 °C. Para estas determinações, alíquotas de 2 mL da emulsão múltipla A/O/A foram introduzidas em tubos Eppendorf e centrifugadas à 12500 rpm durante 10 min à 4 °C. Após centrifugação, 200 µL do sobrenadante foram cuidadosamente retirados, diluídos para um total de 2000 µL com água ultrapura, transferidos para cubeta de quartzo com 1 cm de percurso óptico, e a absorbância foi medida aos comprimentos de onda de 255 nm e 320 nm. Para zerar o espectrofotômetro aos dois comprimentos de onda, foi utilizada uma emulsão múltipla placebo A/O/A, preparada exatamente da mesma maneira que a emulsão múltipla A/O/A que usou 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos, mas usando em vez desta 1000 µL de uma mistura de LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL). A eficiência de encapsulação (EE, %) foi então determinada utilizando a Equação (3).

EE (%) =
$$\frac{i-s}{i} \times 100$$
 (3)

onde *i* é o número de viriões fágicos oferecidos inicialmente para preparar a emulsão múltipla e contidos em 2 mL da emulsão múltipla A/O/A, e *s* é o número de viriões fágicos no sobrenadante da alíquota de 2 mL após a centrifugação nas condições mencionadas anteriormente.

4.2.4. Caracterização físico-química das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas

As emulsões do tipo A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através da determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), índice de polidispersão (PI) e potencial Zeta (ZP), por DLS (espalhamento dinâmico de luz-laser), viscosidade, espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), análise por rastreamento de nanopartículas (NTA), análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), e crio/NS-microscopia eletrônica de transmissão (crio/NS-MET).

71

4.2.4.1. Análises por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)

Estas análises permitiram a determinação do tamanho hidrodinâmico médio (HS) das partículas integrantes das emulsões do tipo A/O/A, do índice de polidispersão (PI) e do potencial Zeta (ZP). Para as análises por DLS das várias emulsões recém-produzidas, prepararam-se diluições de amostras das emulsões seguindo indicações do fabricante do equipamento (50 μ L de emulsão em 20 mL de água ultrapura, isto é, 1:400), homogeneizou-se com a ajuda de uma pipeta Pasteur de plástico e, com a ajuda da mesma pipeta, introduziu-se um dado volume da diluição da emulsão na cubeta (cerca de 2/3 do volume da mesma) (eletrodo com a ref. AQ-1284) específica do equipamento ZetaPALS NanoBrook 90PlusPALS para realizar a análise da amostra por DLS (laser operando com uma potência de 40 mW a λ = 661 nm) (sempre em triplicata) com determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), potencial Zeta (ZP) e índice de polidispersão (PI). As mesmas emulsões foram também seguidas ao longo de um período de armazenamento à 4 °C (cerca de 1 ano), em termos da evolução dos mesmos parâmetros, isto é, HS, PI e ZP, para avaliação da estabilidade das mesmas.

O potencial elétrico que prevalece no plano de corte de uma partícula, o qual está a uma pequena distância da sua superfície e resulta da medida da distribuição de mobilidade de uma dispersão de partículas carregadas à medida que estas são sujeitas a um campo elétrico, é conhecido como potencial Zeta (ζ), calculado de acordo com a equação de Smoluchowski, i.e. $\zeta = (4\pi\eta\mu_e)/D$, onde η é a viscosidade da suspensão à 25 °C, *D* é a constante dielétrica da solução à 25 °C e μ_e é a mobilidade eletroforética das partículas (μ m•s⁻¹•V⁻¹•cm⁻¹).

A mobilidade pode ser definida como a velocidade de uma partícula por unidade de campo elétrico, e é determinada aplicando um campo elétrico à dispersão de partículas e medindo a sua velocidade média. Os resultados obtidos (em triplicata) permitem a determinação do tamanho hidrodinâmico (HS) das nanovesículas lipídicas com núcleo aquoso e do índice de polidispersão (PI), enquanto o potencial Zeta (ZP) é determinado a partir de análises microeletroforéticas.
4.2.4.2. Análises por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho, tanto da suspensão fágica como de amostras da emulsão múltipla contendo entidades fágicas encapsuladas e de amostras da emulsão múltipla sem entidades fágicas encapsuladas (emulsão placebo), foram obtidos usando um espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.) na gama de números de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ e usando apodização de Happ-Genzel.

Um espectro de infravermelho é a combinação das transformadas de Fourier para todos os números de onda considerados. Qualquer pico característico de uma dada amostra é representado pelo pico de maior intensidade, sendo a restante ondulação considerada ruído. Este ruído, para não ser identificado como pico, pode ser diminuído por vários processos. A apodização é um deles, e consiste em fazer decair suavemente a intensidade do interferograma para zero nas extremidades do pico principal, por aplicação de uma função matemática ao interferograma, antes da Transformada de Fourier. A apodização de Happ-Genzel é considerada a melhor escolha para a maioria das aplicações, pois suprime melhor as "réplicas" laterais e com menor redução da resolução.

4.2.4.3. Análises por difração de raios-X (XRD)

Difratogramas de raios-X de amostras da suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas, de amostras das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas (ME10 e ME1000) e da emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), foram obtidos num Difratômetro de raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japan), usando radiação de raios-X filtrada através de um alvo de Cu. A varredura de raios-X foi realizada à ângulos de difração de 2-Theta (de 5º a 90º, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2°•min⁻¹), com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA e potência de raios-X de 3 kW.

4.2.4.4. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)

As nanovesículas lipídicas integrantes das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas foram também analisadas por rastreamento de nanopartículas num dispositivo NanoSight NS300 da Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido), com a temperatura da amostra totalmente programada através do software do equipamento de rastreamento de nanopartículas (NTA). O sistema consistiu num feixe de luz laser verde a 532 nm e numa câmera sCMOS de alta resolução, para realizar as análises de rastreamento de nanopartículas. Amostras das emulsões múltiplas A/O/A foram diluídas 5000x em água ultrapura (1 µL de amostra em 4999 µL de água ultrapura) antes da realização das análises de NTA (sempre em quintuplicata).

As análises de rastreamento de nanopartículas (NTA) forneceram informações adicionais de tamanho, distribuição e concentração de partículas, e permitiram determinar o coeficiente de difusão das partículas.

4.2.4.5. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A caracterização termogravimétrica de amostras da suspensão concentrada em partículas bacteriofágicas, de amostras das emulsões múltiplas A/O/A com partículas fágicas encapsuladas e da emulsão múltipla placebo foi realizada via análises termogravimétricas (TG) enquanto as análises térmicas foram realizadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC).

As análises de TG foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.), usando cadinhos de alumínio para conter as amostras (19-34 mg) sob atmosfera inerte (argônio). Para as análises, as amostras foram aquecidas desde cerca de 20 °C até 600 °C e os resultados (perda de peso) foram registrados a uma taxa de amostragem de 2,0 s por ponto de dados.

Para as análises por DSC utilizou-se um microcalorímetro diferencial exploratório também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.). Para cada ensaio calorimétrico, 21-26 mg de amostra foram pesados (com o auxílio de uma microsseringa) diretamente para o interior de cadinhos de alumínio de alta pressão, os quais foram devidamente selados por pressão. Um cadinho de alumínio de referência foi também preparado, por simples selagem de ar no interior de um cadinho vazio. As amostras foram

então sujeitas a um aumento linear de temperatura, de cerca de 20 °C até 250 °C, a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C min⁻¹, sob uma atmosfera inerte mantida com um fluxo constante de argônio de 50 mL min⁻¹, durante o qual a quantidade de calor absorvido pelas amostras foi registrado a uma taxa de amostragem de 0,2 s por ponto de dados.

4.2.4.6. Avaliação da viscosidade

As emulsões múltiplas A/O/A preparadas foram também avaliadas quanto à sua viscosidade (μ), utilizando a equação de escoamento de Hagen-Poiseuille. A Lei de Poiseuille (ou Lei de Hagen-Poiseuille, também designada por Gotthilf Heinrich Ludwig Hagen (1797-1884) pelas suas experiências em 1839) é uma lei da física relacionada com o fluxo volumétrico laminar em estado estacionário de líquidos viscosos uniformes e incompressíveis (também chamados fluidos Newtonianos) através de um tubo cilíndrico com seção reta circular constante (ver Figura 14), experimentalmente derivada em 1838, formulada e publicada em 1840 e 1846 por Jean Louis Marie Poiseuille (1797-1869) (SUTERA; SKALAK, 1993).

Para as determinações de viscosidade das emulsões múltiplas produzidas, mediu-se o tempo de escoamento (s) de 20 mL de emulsão através do dispositivo ilustrado na Figura 14, após medição dos parâmetros nele explicitados. Todas as determinações foram efetuadas em triplicata.

Figura 14. Dispositivo utilizado para a determinação da viscosidade das emulsões múltiplas A/O/A produzidas, com utilização da equação de escoamento de Hagen-Poiseuille.

 $\mu = \mathbf{K} \cdot \boldsymbol{\rho} \cdot t$ $em que \mathbf{K} = \frac{g \cdot h \cdot \pi \cdot \phi_2^4}{128 \cdot L \cdot V}$ $\mu = viscosidade [kg/s \cdot m]$ $\boldsymbol{\rho} = densidade [g/cm^3]$ t = tempo de escoamento[s] $g = aceleração da gravidade (9.82) [m \cdot s^{-2}]$ h = altura de líquido na seringa [m] $\phi_2 = diâmetro interno do tubo de escoamento[m]$ L = altura do tubo de escoamento[m] $V = volume escoado [m^3]$

Fonte: retirado de BALCÃO; AMORIM (2012).



4.2.4.7. Aspecto macroscópico das emulsões do tipo A/O/A produzidas

O aspecto macroscópico das emulsões múltiplas produzidas foi também avaliado, de forma visual, quanto à presença de fenômenos de cremeação, inversão de fases, aderência às paredes dos tubos Falcon de armazenamento e ausência de crescimento microbiano visível.

4.2.4.8. Avaliação do pH

Esta determinação é importante na avaliação da estabilidade da emulsão múltipla, uma vez que produz informações sobre quaisquer variações na formulação no decorrer do tempo. Tais alterações podem, por um lado, levar a um pH não adequado para a administração no sítio intencionado de ação e, por outro, impactar negativamente na estabilidade no bacteriófago. Foi determinado o pH diretamente nas formulações, sem quaisquer diluições das mesmas.

4.2.4.9. Análises por (crio-/NS-) Microscopia Eletrônica de Transmissão

A preparação das grades de carbono foi feita tanto com amostras não diluídas como com amostras diluídas (1:5 em água ultrapura) das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, emulsão múltipla A/O/A placebo e suspensão concentrada em partículas bacteriofágicas, buscando melhor observação das estruturas.

Para realização da **coloração negativa** das amostras *(Negative Staining, NS)*, estas foram preparadas em grades de cobre (ver Figura 15a,b,c,d,e) com 3 mm de diâmetro (*Ultrathin carbon on a Lacey Carbon Type A 400 mesh copper grid*, Ted Pella Inc., Redding CA, E.U.A.), as quais foram previamente submetidas ao procedimento de *Glow Discharge* (ver Figuras 15f,g) em um equipamento *easiGlow* da PELCO (Redding CA, E.U.A.), com os seguintes parâmetros: corrente de 15 mA, carga negativa, 25 segundos de descarga. Este procedimento visou dotar as grades de cobre (hidrofóbico por natureza) com carga superficial negativa, de forma a promover a aderência e espalhamento da amostra (3 μ L) na sua superfície. A coloração das amostras foi realizada aplicando-se 3 μ L de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) na grade de cobre contendo a amostra, e

deixando secar ao ar (ver Figuras 15a,b,c,d). Após 30 segundos, removeu-se o excesso de solução de acetato de uranila com papel de filtro convencional.

Para o crio-congelamento em gelo amorfo, as amostras foram preparadas em grades de carbono (Lacey Carbon Type A 300 mesh copper grids, Ted Pella Inc., Redding CA, E.U.A.), as quais foram previamente submetidas ao procedimento de Glow Discharge (ver Figuras 15f,g) em um equipamento easiGlow da PELCO (Redding CA, E.U.A.), com os seguintes parâmetros: corrente de 15 mA, carga negativa, 25 segundos de descarga. A congelação em gelo amorfo (crio-preparação) foi realizada utilizando um equipamento robotizado Vitrobot Mark IV (FEI, Eindhoven, Holanda) com temperatura (22 °C) e umidade relativa (100%) controladas (ver Figuras 15g,r,s,t,u,v). As crio-amostras foram preparadas de acordo com os seguintes parâmetros: blot time 3 s; blot force -5; blot wait 20 s, com um único *blot*. Em seguida, 3 µL das amostras foram pingados nas grades (ver Figura 15t) tendo-se deixado assentar por 20 s às referidas temperatura e umidade relativa. As grades foram então secas (blotted) durante 3 s (ver Figura 15u) e vitrificadas mergulhando rapidamente em etano líquido a -145 °C (ver Figuras 15s,v). Etano líquido (produzido por borbulhamento de etano gasoso em nitrogênio líquido, ver Figuras 15h,i,j,k,l,m,n,) foi usado para vitrificar as amostras de emulsão múltipla A/O/A, ricas em água, para a microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET), uma vez que uma fina camada de água rapidamente imersa em etano líquido a -145 °C congela demasiado rapidamente para que a água cristalize (cristalizará em forma amorfa). Esta congelação muito rápida não destrói a estrutura suave das nanovesículas lipídicas com núcleo aguoso presentes no estado líguido, como a formação de cristais de gelo pode fazer. Após imersão em etano líquido, as grades foram mantidas em nitrogênio líquido a -196 °C (ver Figuras 15o,p) até ao momento da análise (ver Figuras 15w,x,y) no microscópio eletrônico de transmissão e mantidas a -173 °C na câmara do microscópio (ver Figura 15z) durante todo o período da análise.

Amostras puras da emulsão múltipla ME1000 foram também preparadas sobre grades de carbono (não sujeitas ao procedimento de *Glow Discharge*), sem qualquer tipo de tratamento ou coloração, simplesmente aplicando 3 µL de amostra em grade de carbono seguido de retirada do excesso de amostra com papel de filtro, deixando depois secar primeiramente à temperatura ambiente durante 1 h, e posteriormente em câmara de vácuo à temperatura ambiente por 7 dias antes da realização das análises por MET.

As **análises de microscopia eletrônica** foram então realizadas num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da JEOL (modelo TEM-1400 PLUS, JEOL, Tokyo, Japão) (ver Figuras 15aa,ab), equipado com filamento de hexaboreto de lantânio (LaB₆), operando a 120kV; o microscópio estava ainda equipado com uma câmera CCD da GATAN INC. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, E.U.A.) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a

aquisição digital de imagens. Para análise dos resultados (imagens e medidas) utilizou-se o software Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton CA, E.U.A.).

Figura 15. Procedimento sequencial de preparação das amostras para as análises por microscopia eletrônica de transmissão (tanto por *negative staining* (NS-MET) como por crio-congelamento (crio-MET)).



Fonte: elaboração própria.

4.2.5. Avaliação do potencial antibacteriano das emulsões múltiplas A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas

As emulsões múltiplas contendo partículas fágicas aprisionadas no núcleo aquoso interno das suas nanovesículas lipídicas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana (lítica), seguindo um procedimento laboratorial simples. Para verificar se o procedimento de nanoencapsulação não exerceu efeitos negativos sobre a atividade lítica das partículas fágicas, emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas foram submetidas ao teste dos halos de lise após aplicação de amostras das emulsões múltiplas sobre um tapete bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa*. Para extração das partículas fágicas, 500 µL de clorofórmio foram adicionados a 1000 µL de emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, num tubo de ensaio. A suspensão resultante foi suavemente agitada num vórtex durante 5 s e centrifugada à 5500 rpm durante 10 min a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi imediatamente recuperado e sujeito ao teste antimicrobiano. Este procedimento foi igualmente repetido para a emulsão múltipla A/O/A que utilizou 1000 µL da suspensão concentrada em partículas bacteriofágicas, mas usando em vez disso 1000 µL de uma mistura de LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL)).

Num tubo de ensaio contendo 3 mL de LB-top ágar, adicionaram-se 100 µL de suspensão bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa* com crescimento à 37 °C durante 18 h em caldo líquido LB broth). Após suave agitação, o top ágar contendo a suspensão bacteriana foi vertido para uma placa de Petri com 90-mm de diâmetro, previamente preparada com 25 mL de LB-bottom ágar, e permitido solidificar à temperatura ambiente. Foram preparadas 8 placas de Petri para permitir duplicata dos testes.

Cada placa de Petri foi então dividida em quatro quadrantes e as amostras foram adicionadas de acordo com dois métodos diferentes: (i) teste de disco, onde um disco de papel de filtro esterilizado foi colocado no centro de cada quadrante tendo-se aplicado em cima de cada disco, separadamente, 20 µL de amostra de sobrenadante contendo bacteriófagos recuperados previamente da emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas, 20 µL de amostra de sobrenadante obtida da emulsão múltipla A/O/A placebo, 10 µL da suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (controle positivo) e 10 µL do placebo da suspensão estoque de fagos (controle negativo); (ii) teste da gota, onde uma pequena gota foi aplicada no centro de cada quadrante, diretamente sobre o LB-bottom ágar sólido, separadamente, 20 µL de amostra de sobrenadante contendo bacteriófagos recuperados previamente da emulsão múltipla A/O/A contendo partículas

bacteriofágicas, 20 μL de amostra de sobrenadante obtida da emulsão múltipla A/O/A placebo, 10 μL da suspensão estoque concentrada em partículas fágicas (controle positivo) e 10 μL do placebo da suspensão estoque de fagos (controle negativo). Este procedimento foi realizado em duplicata.

As placas de Petri foram então incubadas à 37 °C durante 24 h e, após o período de incubação, foram inspecionadas visualmente para a presença de halos de lise. Para testar se o clorofórmio exerceu alguma ação deletéria sobre as partículas fágicas, durante o processo de extração das mesmas a partir das emulsões múltiplas A/O/A, outro teste foi também realizado exclusivamente para **(a)** a emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 µL da suspensão concentrada em bacteriófagos (ME1000), e **(b)** a emulsão múltipla A/O/A placebo preparada com 1000 µL de uma mistura de LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL) (MEPLC), com e sem extração de partículas fágicas usando clorofórmio, usando a abordagem de teste de disco mencionada.

4.2.6. Formulação de soluções isotônicas integrando as emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas, visando a sua administração por nebulização, e avaliação da sua atividade antibacteriana

Soluções isotônicas são soluções que apresentam a mesma tonicidade que os fluídos biológicos com os quais serão misturadas/contatadas, geralmente consideradas equivalentes a uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (m/v). A emulsão múltipla A/O/A produzida e com comprovada atividade antimicrobiana frente à cultura de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada na formulação da solução isotônica, em vários níveis de concentração.

Para preparar as soluções isotônicas integrando a emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 µL de suspensão concentrada de bacteriófago (ME1000), foram transferidos 10 mL de solução salina esterilizada a 0,9% (m/v) NaCl em água ultrapura, para tubos Falcon estéreis. Foram preparadas soluções isotônicas com três concentrações diferentes em emulsão múltipla, a saber, 0,3% (v/v), 0,6% (v/v) e 0,9% (v/v) de emulsão múltipla ME1000. Para isso, 30 µL, 60 µL ou 90 µL da emulsão múltipla A/O/A ME1000 foram adicionados a tubos Falcon individuais e devidamente homogeneizados por agitação suave. Para determinação do potencial antibacteriano destas soluções isotônicas, 500 µL ou 1000 µL de cada solução isotônica foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4 mL de top ágar e 300 µL de suspensão bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa* com crescimento prévio à 37 °C durante 18 h em caldo líquido LB broth). Após agitação suave, o top ágar contendo a

suspensão bacteriana e a solução isotônica adicionada foi vertido para placa de Petri de 90 mm de diâmetro, previamente preparada com 25 mL de LB-bottom ágar, tendo-se deixado solidificar à temperatura ambiente. As placas de Petri foram então incubadas à 37 °C durante 24 h e, passado o período de incubação, foram inspecionadas visualmente quanto à presença de halos de lise.

4.2.7. Avaliação do potencial de citotoxicidade das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, pelo ensaio MTT

A avaliação da citotoxicidade dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A (ME10, ME1000 e MEPLC), bem como da suspensão de bacteriófago e seu placebo, assim como dos produtos finais que consistem de soluções isotônicas contendo 0,3% (v/v), 0,6% (v/v) e 0,9% (v/v) da ME1000, para as linhagens celulares (permanentes) V79, A549 e 3T3 (avaliação da viabilidade celular) foi realizada utilizando o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio). Para a proliferação das células, foram utilizados frascos específicos para cultura celular contendo meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%, m/m) e antibiótico (100 UI/ mL de penicilina e 100 µL de sulfato de estreptomicina) (1%, m/m), a pH 7,4 e 37 °C, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Uma vez atingida a confluência, as células foram desaderidas utilizando tripsina e utilizadas de acordo com a metodologia de teste. Nestes ensaios, o plagueamento foi realizado através da inoculação de aproximadamente 1x10⁴ células viáveis em cada poço de uma microplaca com 96 poços, utilizando um volume de amostra de 100 µL, seguido por incubação durante 48 horas até atingir a semi-confluência. A análise de viabilidade celular utilizando a técnica de MTT começou com o plaqueamento de uma suspensão celular contendo 0,5x10⁵ células/mL. Após 24 h (tempo necessário para a aderência das células e estabilidade celular) as células foram colocadas em contato com as amostras durante um período de tempo adicional de 24 h, em concentrações volumétricas variando de 0 a 17.5% (v/v) para as emulsões múltiplas e seus placebos assim como para a suspensão de bacteriófagos e seu placebo, e para as soluções (isotônicas) salinas foram diluídas para 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% e 1% (v/v). As placas foram então mantidas durante 24 h em uma cabine de aquecimento a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esta etapa, as amostras foram lavadas com tampão PBS estéril e as células expostas ao reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 0,5 mg/mL). A viabilidade celular foi determinada utilizando a redução do MTT. Após 3 horas a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂, o número de células viáveis foi determinado por medição da quantidade de MTT convertido em formazano (um composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais. Para isso, foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço da placa e as leituras de absorbância realizadas a um comprimento de onda de 570 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA da ROBONIK INDIA PRIVATE LTD (modelo *Readwell PLATE*, Maharashtra, Índia). Todos os testes foram realizados em quintuplicata para cada concentração de amostra testada. A análise de resultados foi efetuada assumindo como 100% de viabilidade celular a média dos valores de absorbância obtidos para o controle não tratado. Partindo deste pressuposto, os cálculos de viabilidade celular (%) relativamente ao controle negativo foram realizados para cada concentração de amostra.

4.2.8. Avaliação do potencial de apoptose e necrose das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, via citometria de imagem (Tali[®])

A viabilidade celular foi medida utilizando um kit para apoptose Tali[®] (consistindo em Annexin V Alexa Fluor[®] 488 e Propidium Iodide, Invitrogen, Carlsbad CA, E.U.A.) e um citômetro de imagem Tali, o qual permitiu a contagem dos números de células viáveis, apoptóticas e necróticas (mortas). A citometria de imagem Tali[®] é baseada nas imagens das células e suas interações com os reagentes Annexin V Alexa Fluor[®] 488 (o qual tem afinidade para a fosfatidil serina) e iodeto de propídio (que tem afinidade para o DNA), tornando-se possível distinguir entre as percentagens de células viáveis, células em apoptose e células necróticas. As células que foram tratadas com as amostras diluídas (suspensão concentrada de bacteriófagos, placebo da emulsão múltipla A/O/A (MEPLC), emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10), emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 µL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000)) a uma concentração de 10% das amostras de partida e com o produto final (testado a uma concentração de 30%), durante 24 horas, foram centrifugadas e concentradas para 1x10⁶ células por mL. Alíquotas de 100 µL desta suspensão de células foram preparadas de acordo com as especificações do Kit de apoptose Tali[®], e os testes foram realizados em triplicata. Após o tratamento, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio de 2 mL, centrifugados à 1500 rpm durante 5 min e o sobrenadante resultante foi descartado. O material remanescente foi re-suspendido com 100 µL de Annexin binding *buffer (ABB)*, foram adicionados 5 µL de *Annexin V Alexa Fluor*[®] 488 e o conteúdo mantido no escuro e à temperatura ambiente durante 20 min. Após este período, o material foi centrifugado à 1500 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µL de ABB e 1 µL de Tali[™] iodeto de propídio (PI), com a solução resultante a ser deixada em repouso durante 5 min à temperatura ambiente. O material resultante (25μ L) foi colocado numa lâmina de vidro específica para leitura, tendo sido avaliadas a viabilidade, a apoptose e a necrose. Índices relativos de apoptose e necrose dos grupos tratados (amostras) foram medidos considerando a razão entre os valores de necrose e apoptose dos grupos tratados em relação ao grupo de controle negativo, de acordo com as equações (4) e (5).

Índice relativo de necrose =
$$\frac{N \text{úmero de células necrosadas no grupo tratado}}{N \text{úmero de células necrosadas no grupo de controle negativo}}$$
(4)

Índice relativo de apoptose = $\frac{Número de células apoptóticas no grupo tratado}{Número de células apoptóticas no grupo de controle negativo}$ (5)

4.2.9. Avaliação do potencial de dano ao DNA (genotoxicidade) das soluções isotônicas integrando a emulsão múltipla A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas, a diferentes concentrações volumétricas, via ensaio Cometa™

Os produtos finais, consistindo em soluções isotônicas (10 mL) contendo 30 μ L, 60 μ L e 90 μ L da emulsão múltipla A/O/A ME1000, produzindo concentrações volumétricas de, respectivamente, 0,3% (v/v), 0,6% (v/v) e 0,9% (v/v), foram avaliados quanto ao potencial para causar dano ao DNA através do ensaio de genotoxicidade Cometa[®].

Cada grupo de tratamento envolveu 10 µL de cultura celular (V79-4, células normais de pulmão de hamster Chinês; A549, células de carcinoma de pulmão humano; e 3T3, fibroblastos de embrião de camundongo albino Suíço) em 110 µL de ágarose de baixo ponto de fusão (0,6%, m/v), com as misturas a serem colocadas em lâminas de microscópio prérevestidas com ágarose de ponto de fusão normal (1,5%, m/v). Lamínulas foram então posicionadas sobre as amostras nas lâminas de microscópio e as lâminas foram colocadas sob condições de refrigeração para que a polimerização ocorresse. Após polimerização, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram tratadas com uma solução de lise resfriada à 4 °C (NaCl 2,5 mol/L, EDTA 0,1 mol/L, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 10 mmol/L e 1% (m/m) de Triton X-100[®], pH 10) durante 60 min. Os grupos de tratamento foram, em seguida, incubados num tampão de eletroforese (NaOH 0,3 mol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 13) durante 20 min, seguido por análise electroforética durante 20 min a 1,3 V/cm. Após eletroforese, as lâminas foram cobertas com uma solução neutralizante (Tris 0,4 mol/L, pH 7,5) durante 5 min, lavadas três vezes com água deionizada, e deixadas em repouso durante a noite à temperatura ambiente. Antes da coloração, as lâminas secas foram deixadas numa solução

de fixação (ácido tricloroacético (15%, m/v), sulfato de zinco (5%, m/v) e glicerol (5%, v/v)) durante 10 min, após o que as lâminas foram lavadas três vezes com água ultrapura. Seguindo-se a estes procedimentos, as lâminas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente durante 1,5 h, período após o qual foram re-hidratadas com água ultrapura e coradas durante aproximadamente 15 min com uma solução de coloração com prata consistindo em solução A (nitrato de amônio 0,2% (m/v), nitrato de prata 0,2% (m/v), ácido tungstosilícico 0,5% (m/v), formaldeído 0,15% (v/v) e carbonato de sódio 5% (m/v)) e solução B (carbonato de sódio 5% (m/v)) (34:66, v/v). Subsequentemente, as lâminas foram banhadas em água ultrapura e depois numa solução para parar a reação (ácido acético 1% (v/v)). Finalmente, as lâminas foram novamente lavadas suavemente com água ultrapura e deixadas secar à temperatura ambiente. A coloração com prata é análoga à de fluorescência, durante a qual a carga positiva dos cátions de prata permitem-lhes ligar-se ao DNA e aos fragmentos DNA, produzindo uma coloração característica.

Durante os procedimentos que envolvem materiais celulares, tanto a luz natural como a luz de lâmpadas fluorescentes foram evitadas de forma a prevenir a sua possível interferência sobre os resultados. As análises foram realizadas utilizando um microscópio óptico Zeiss Axiovert-60 (Carl-Zeiss, Göschwitzer Str., Jena, Alemanha) e pelo menos 100 células foram contadas em cada lâmina, com 3 lâminas para cada ensaio (aproximadamente 300 células). As análises foram realizadas em triplicata, totalizando 900 células para a análise de cada solução isotônica testada.

As análises de ensaio Cometa[®] foram realizadas atribuindo uma pontuação de 0 a 4, de acordo tanto com a quantidade de DNA na cauda como com o comprimento da cauda: pontuação 0, correspondendo a células intactas (sem qualquer espalhamento); pontuação 1, correspondendo a células com danos mínimos (espalhamento de luz, com uma cauda muito curta); pontuação 2, correspondendo àquelas células com danos médios (espalhamento suave e cauda grande); pontuação 3, correspondendo àquelas células com danos severos (espalhamento grande e cauda grande); e pontuação 4, correspondendo àquelas células com dano máximo (núcleo mínimo, espalhamento grande e cauda grande) (SEABRA et al., 2014). Para este método visual, o número de células encontradas para cada pontuação foi multiplicado pelo valor da pontuação; todos os valores foram somados no final da análise de cada lâmina. Como a pontuação dependeu do número de células observadas, um índice de dano de cauda (ou dano de DNA) foi criado, normalizando a pontuação atribuída à lâmina pelo número de células analisadas na lâmina.

4.2.10. Avaliação da estabilidade das emulsões múltiplas A/O/A produzidas, contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas

As emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas foram avaliadas quanto à sua estabilidade temporal com base na manutenção do tamanho hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH. A atividade antimicrobiana foi verificada no início, e ao fim de 3 e 6 meses durante o período de estudo (que durou praticamente 1 ano). O armazenamento das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas e da emulsão múltipla placebo foi realizado sob condições de refrigeração (4 °C).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou a estabilização estrutural e funcional de partículas fágicas estritamente líticas para *Pseudomonas aeruginosa*, no interior do núcleo aquoso interno de emulsões múltiplas do tipo A/O/A, com o objetivo final de preparação de um potencial sistema bioterapêutico para o tratamento por nebulização de pneumonia bacteriana causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Neste sentido, o trabalho de pesquisa desenvolvido exigiu a realização de diversas etapas sequenciais tanto para a propagação das partículas fágicas no seu hospedeiro específico como para a preparação da emulsão múltipla e sua caracterização físico-química e biológica. A Figura 16 apresenta resumidamente as etapas envolvidas neste trabalho de pesquisa.





Fonte: elaboração própria.

5.1. Propagação e purificação do concentrado bacteriofágico

A propagação das partículas fágicas na suspensão estoque do seu hospedeiro bacteriano específico (*Pseudomonas aeruginosa*) (ver Figura 17) resultou numa suspensão concentrada de partículas fágicas, tendo sido seguida da determinação do título fágico.

Figura 17. Resultados dos ensaios de propagação do bacteriófago JG004 no seu hospedeiro específico, *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando a formação de unidades formadoras de placas (PFUs) para toda a sequência de diluições decimais da suspensão estoque de bacteriófago: (a) 1x10⁻¹
¹, (b) 1x10⁻², (c) 1x10⁻³, (d) 1x10⁻⁴, (e) 1x10⁻⁵, (f) 1x10⁻⁶, (g) 1x10⁻⁷, (h) 1x10⁻⁸, (i) 1x10⁻⁹, (j) 1x10⁻¹⁰.



Fonte: elaboração própria.

O plaqueamento das diluições decimais em série desta suspensão concentrada em partículas fágicas, como descrito na seção 4.2.1.4. dos Procedimentos experimentais, permitiu a determinação do número de unidades formadoras de placas (PFU's) (ver Figura 18) para diluições decimais selecionadas.

Figura 18. Quantificação microbiológica do título fágico da suspensão concentrada (propagada) de bacteriófago JG004: (a) 1×10^{-5} , 30 °C, >300 PFUs; (b) 1×10^{-6} , 30 °C, 253 PFUs; (c) 1×10^{-7} , 30 °C, 31 PFUs; (d) 1×10^{-7} , 37 °C, 28 PFUs; (e) 1×10^{-7} , 25 °C, 35 PFUs.



Fonte: elaboração própria.

É possível observar a formação de um tapete fágico para diluições mais baixas, até 1x10⁻⁵, indicando uma completa propagação do bacteriófago e consequente lise de todas as células bacterianas (ver Figura 17). A quantidade de viriões por mL de suspensão estoque de bacteriófago foi quantificada via determinação do número de unidades formadoras de placas quando a suspensão foi adicionada à bactéria hospedeira, utilizando a Equação (1).

Cada placa de lise corresponde a uma unidade de bacteriófago. A incubação da bactéria com o bacteriófago a três temperaturas diferentes (30 °C, 37 °C e 25 °C) não produziu qualquer diferença na proliferação dos bacteriófagos (ver Figura 18), fornecendo assim indicação de que tanto o bacteriófago como a bactéria demonstram atividade similar dentro desta gama de temperaturas (ver Figura 18). Obteve-se assim, uma concentração média de partículas fágicas de (2,98±0,42)x10⁹ viriões/mL (ver Figura 18 e Quadro 4) para a suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas, após a propagação da suspensão estoque.

Quadro 4. Resultados microbiológicos obtidos a partir dos ensaios de determinação das unidades formadoras de placas (PFUs), permitindo a determinação do título fágico da suspensão concentrada de bacteriófagos.

Temperatura (°C)	Número de PFUs	Diluição	Volume de inóculo (mL)	Concentração de partículas fágicas (PFU/mL)
37	28	1,0x10 ⁻⁷	0,100	2,8000x10 ⁹
30	31	1,0x10 ⁻⁷	0,100	3,1000x10 ⁹
30	253	1,0x10 ⁻⁶	0,100	2,5300x10 ⁹
25	35	1,0x10 ⁻⁷	0,100	3,5000x10 ⁹
	PFU's/ı	(2,982500 ± 0,416203) x 10 ⁹		

Fonte: elaboração própria.

Adicionalmente, desenvolveu-se um ensaio espectrofotométrico que permitisse a quantificação de partículas fágicas em suspensão antes e após o processo de produção das emulsões múltiplas. Partindo do título fágico calculado com base nos procedimentos microbiológicos descritos anteriormente, realizaram-se cinco diluições em água ultrapura (até um volume total de 5,0 mL) usando diferentes volumes da suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas produzida e a absorbância das diluições resultantes foi determinada tanto à 255 nm (comprimento de onda que produz a máxima absorção da suspensão concentrada de fagos, ver Figura 19) como à 320 nm (comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos fagos) (ver Quadro 3).

Subtraindo A₃₂₀, um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos fágicos, tem como objetivo corrigir grosseiramente o espalhamento de luz produzido pelas partículas fágicas e contaminantes particulados não-fágicos tais como debris celulares. Por inspeção da Figura 19, um mínimo de absorção pode também ser observado em torno de 245 nm; quando este mínimo está ausente do espectro, muitos contaminantes estão provavelmente presentes na suspensão, o que geralmente acontece quando ela contém poucos viriões. Esta não foi, todavia, a situação encontrada neste trabalho de pesquisa, com a suspensão fágica concentrada produzida.

Figura 19. Espectro de varredura de comprimentos de onda da suspensão (propagada) de partículas bacteriofágicas, permitindo a observação do comprimento de onda que produz a máxima absorção da suspensão concentrada em partículas fágicas.



Fonte: elaboração própria.

Realizando um ajuste linear aos dados exibidos no Quadro 3 e aplicando a equação de Beer-Lambert aos dados, permitiu-se o cálculo do coeficiente de extinção molar das partículas (inteiras) de bacteriófago JG004 como sendo ε = 8,3487x10⁻⁰⁹ (PFU's/mL)⁻¹·cm⁻¹. A Equação (2) foi então aplicada para calcular a concentração física de partículas fágicas na suspensão concentrada de bacteriófago, produzindo o valor de 1,575x10⁹ viriões/mL.

A concentração de partículas fágicas obtida por leituras espectrofotométricas foi assim da mesma ordem de grandeza mas cerca de 47% inferior àquela obtida por procedimentos microbiológicos. Tomando em consideração a elevada quantidade de partículas fágicas físicas na suspensão concentrada, os resultados obtidos a partir das leituras espectrofotométricas são adequados, por exemplo, para a quantificação da eficiência de encapsulação, uma vez que um quociente de valores calculados por este procedimento eliminará praticamente qualquer erro da determinação.

5.2. Preparação e caracterização da emulsão múltipla A/O/A, em termos de tamanho hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta

Um trabalho de pesquisa anterior (GLASSER et al., 2016a), sobre a otimização estatística dos parâmetros de formulação conducentes à produção de uma emulsão múltipla A/O/A estável, seguindo um planejamento experimental fatorial completo, definiu como variáveis mandatórias um nível elevado de entidade proteica, um nível elevado de surfactante lipofílico (lecitina) e um nível baixo de surfactante hidrofílico (poloxâmero P188), integradas com uma velocidade alta de agitação para homogeneização. Seguindo este conjunto de parâmetros processuais otimizados (dados reportados por GLASSER et al. (2016a,b)), três emulsões múltiplas A/O/A foram produzidas (ver Quadro 2), isto é, uma emulsão múltipla A/O/A com 10 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos na fase aquosa interna (ME10), uma emulsão múltipla A/O/A com 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos na fase aquosa interna (MEPLC, ou emulsão múltipla A/O/A placebo). Os resultados obtidos pela análise por DLS das várias emulsões múltiplas A/O/A formuladas encontram-se no Quadro 5 e na Figura 20.

Quadro 5. Valores de resposta médios (n=3) e desvios padrão associados para HS, PI e ZP, das três emulsões múltiplas A/O/A, duas delas contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas na fase aquosa interna (ME10 e ME1000) e uma sendo emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), ao longo do período de armazenamento à 4 °C.

Tamaa	ME10			ME1000			MEPLC			Valor
Tempo	HS±σ	_	ZP±σ	HS±σ	_	ZP±σ	HS±σ	_	ZP±σ	de
(d)	(nm)	PI±σ	(mV)	(nm)	PI±σ	(mV)	(nm)	PI±σ	(mV)	HLB
0	161,57 ± 1,80	0,206 ± 0,010	-31,51 ± 1,00	188,54 ± 2,20	0,208 ± 0,010	-30,18 ± 1,60	169,00 ± 1,10	0,200 ± 0,010	-20,43 ± 2,30	
7	157,12 ± 0,60	0,271 ± 0,010	-21,47 ± 1,10	176,79 ± 2,30	0,278 ± 0,010	-22,45 ± 0,90	164,82 ± 0,60	0,272 ± 0,010	-23,21 ± 1,80	
14	165,12 ± 2,20	0,283 ± 0,010	-18,31 ± 2,70	180,93 ± 3,80	0,299 ± 0,010	-22,13 ± 1,20	174,86 ± 6,00	0,281 ± 0,010	-18,30 ± 1,90	
21	160,38 ± 2,00	0,278 ± 0,010	-27,79 ± 0,50	175,79 ± 4,20	0,287 ± 0,00	-28,12 ± 1,50	167,53 ± 2,80	0,273 ± 0,010	-23,36 ± 0,60	
35	159,20 ± 1,40	0,264 ± 0,010	-25,77 ± 0,60	176,47 ± 1,40	0,290 ± 0,010	-25,60 ± 1,60	170,28 ± 3,00	0,272 ± 0,010	-23,68 ± 1,30	
51	163,09 ± 2,30	0,279 ± 0,010	-21,57 ± 2,50	176,04 ± 5,30	0,292 ± 0,010	-27,01 ± 3,10	167,46 ± 0,60	0,268 ± 0,010	-19,71 ± 1,90	
64	165,13 ± 1,30	0,275 ± 0,010	-22,07 ± 1,80	175,31 ± 2,70	0,281 ± 0,010	-26,33 ± 1,90	170,31 ± 0,80	0,270 ± 0,010	-20,13 ± 1,20	
77	162,60 ± 1,54	0,273 ± 0,000	-20,16 ± 1,17	175,46 ± 2,59	0,278 ± 0,010	-24,53 ± 1,46	172,04 ± 0,74	0,269 ± 0,010	-20,24 ± 0,55	
92	166,05 ± 2,10	0,268 ± 0,010	-21,33 ± 1,21	173,12 ± 1,73	0,283 ± 0,010	-22,51 ± 0,93	168,15 ± 1,30	0,270 ± 0,010	-20,10 ± 1,03	
113	168,15 ± 0,98	0,275 ± 0,008	-20,01 ± 0,83	179,03 ± 0,90	0,277 ± 0,006	-21,15 ± 1,23	170,33 ± 1,33	0,249 ± 0,012	-18,93 ± 1,05	
126	166,42 ± 2,10	0,271 ± 0,007	-19,53 ± 1,03	180,10 ± 1,47	0,287 ± 0,013	-20,34 ± 1,11	171,53 ± 1,73	0,248 ± 0,009	-19,31 ± 0,87	13,418
141	164,85 ± 1,00	0,276 ± 0,006	-18,69 ± 1,16	178,37 ± 2,77	0,269 ± 0,007	-19,89 ± 1,41	169,57 ± 1,65	0,256 ± 0,011	-18,15 ± 0,75	
155	165,20 ± 1,73	0,285 ± 0,004	-13,28 ± 0,12	178,56 ± 1,93	0,292 ± 0,005	-20,80 ± 0,59	173,34 ± 2,15	0,283 ± 0,003	-19,41 ± 1,17	
169	166,15 ± 1,53	0,279 ± 0,015	-20,57 ± 1,13	178,53 ± 1,15	0,280 ± 0,001	-23,72 ± 1,51	175,30 ± 1,23	0,283 ± 0,011	-20,51 ± 1,74	
183	167,10 ± 3,01	0,280 ± 0,003	-20,10 ± 1,15	179,11 ± 2,03	0,279 ± 0,005	-22,31 ± 1,53	178,30 ± 2,00	0,278 ± 0,003	-21,13 ± 2,03	
204	164,43 ± 1,73	0,279 ± 0,001	-23,15 ± 2,55	180,03 ± 1,58	0,283 ± 0,005	-30,15 ± 1,03	180,13 ± 1,57	0,278 ± 0,011	-21,10 ± 1,15	
219	165,35 ± 3,90	0,281 ± 0,003	-32,79 ± 3,96	178,81 ± 2,10	0,285 ± 0,009	-32,03 ± 1,26	179,34 ± 3,17	0,277 ± 0,005	-21,70 ± 3,11	
232	168,13 ± 1,53	0,280 ± 0,005	-30,54 ± 2,00	180,35 ± 1,74	0,282 ± 0,006	-31,75 ± 2,12	169,73 ± 1,20	0,269 ± 0,003	-20,89 ± 3,19	
253	170,10 ± 1.73	0,279 ± 0.003	-28,15 ±	179,73 ±	0,280 ± 0.003	-28,21 ±	173,15 ±	0,271 ± 0.001	-19,75 ±	
288	175,27 ±	0,285 ±	-27,31 ±	180,35 ±	0,291 ±	-30,54 ±	178,31 ±	0,280 ±	-20,93 ±	
329	179,63 ± 2,03	0,288 ± 0,004	-30,21 ± 2,03	181,91 ± 2,82	0,308 ± 0,005	-37,17 ± 2,17	185,39 ± 2,34	0,285 ± 0,004	-24,14 ± 2,61	

Fonte: elaboração própria.

Figura 20. Evolução temporal dos valores médios (n=3) e desvios padrão associados do Tamanho hidrodinâmico de partícula (HS) (a), Índice de polidispersão (PI) (b), Potencial Zeta (ZP) (c) e pH (d) das nanovesículas lipídicas contendo partículas bacteriofágicas aprionadas no núcleo aquoso interno, integrantes dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A, ao longo do período de armazenamento (círculos azul-claro, ME10; círculos rosa, ME1000; círculos cinza, MEPLC).



Fonte: elaboração própria.

Uma maior quantidade de partículas fágicas físicas não promoveu quaisquer alterações nos valores de potencial Zeta (ver Figura 20c), mas amplificou as propriedades antibacterianas da emulsão múltipla (como será discutido na seção 5.9.). A adição de um eletrólito (ácido clorídrico) à fase aquosa interna promoveu a manutenção dos valores de potencial Zeta (ver Figura 20c) ao longo do tempo, presumivelmente devido a uma acumulação de íons adsorvidos na superfície interna das nanovesículas lipídicas, prevenindo assim fenômenos de agregação e coalescência.

Ainda que a energia de agitação mecânica seja importante para produzir a dispersão, não é no entanto suficiente; ela apenas supera a barreira de tensão superficial durante o período da homogeneização. Assim, a forma mais simples para estabilizar o sistema é reduzir a tensão superficial, de forma a diminuir a energia livre derivada da expansão da área superficial global (OLIVEIRA et al., 2004). Assim, optou-se neste trabalho por aumentar o nível de surfactante lipofílico na produção das emulsões múltiplas A/O/A, uma vez que os agentes tensoativos desempenham um papel importante na estabilização das emulsões. No entanto, a maior parte dos surfactantes não consegue reduzir a tensão interfacial para níveis capazes de contrariarem toda a energia livre de superfície provocada pelo tremendo aumento na área superficial durante a homogeneização e por isso as emulsões são normalmente consideradas sistemas termodinamicamente instáveis (PIANOVSKI et al., 2008; SCHMIDTS et al., 2009).

A carga global na superfície das partículas em suspensão afeta a distribuição iônica na sua vizinhança imediata, produzindo uma dupla camada elétrica em torno de cada partícula. Quando uma partícula se move, os íons dentro da sua fronteira movem-se com ela, e vice-versa. O potencial Zeta é o potencial que existe nesta fronteira, com a sua intensidade sendo uma indicação da estabilidade potencial no sistema coloidal (SCHULTZ et al., 2008), e depende da concentração de íons no solvente. Assim, a principal razão para medir o potencial Zeta reside na previsão da estabilidade coloidal, que por sua vez depende das interações entre partículas. O potencial Zeta é uma medida das forças repulsivas entre partículas, e uma vez que a vasta maioria dos sistemas aquosos coloidais é estabilizada por repulsão electrostática, quanto maiores forem as forças repulsivas entre partículas menor será a probabilidade delas se aproximarem e formarem agregados, conduzindo assim a um sistema coloidal mais estável. Como se pode ver no Quadro 5 e na Figura 20, a produção dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A contendo quantidades variáveis de partículas físicas bacteriofágicas aprisionadas levou à produção de partículas bastante homogêneas com tamanhos hidrodinâmicos médios (n=3) de (161,57 ± 1,80) nm (ME10) e (188,54 ± 2,20) nm (ME1000) e valores médios (n=3) de potencial Zeta de (-31,51 ± 1,00) mV (ME10) e (-30,18 ± 1,60) mV (ME1000), e exibindo índices médios (n=3) de polidispersão de 0,206 ±

0,010 (ME10) e 0,208 ± 0,010 (ME1000). Estes valores foram produzidos para um parâmetro processual de velocidade de agitação de 12500 rpm. O tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos (índice de polidispersão) foram medidos em triplicata em amostras das emulsões múltiplas A/O/A via Espalhamento Dinâmico de Luz Laser (DLS) (adequado para partículas com diâmetros entre 5 nm e 3 µm), enquanto o potencial Zeta foi medido em triplicata em amostras das emulsões múltiplas A/O/A por microeletroforese, com todos os resultados aqui apresentados sendo valores médios (ver Figura 20 e Quadro 5) com desvios padrão associados, para as emulsões múltiplas A/O/A produzidas com partículas bacteriofágicas encapsuladas, em função do tempo de armazenamento à 4 °C. O armazenamento dos sistemas de emulsão múltipla com partículas fágicas encapsuladas (ver Figura 20) à 4 °C durante 329 dias levou à manutenção dos tamanhos hidrodinâmicos de partícula entre 161,57 nm e 179,63 nm (ME10) e entre 188,54 nm e 181,91 nm (ME1000) (ver Figura 20a), com um pequeno aumento dos índices de polidispersão durante os primeiros sete dias os quais foram mantidos ao longo do restante período de armazenamento (ver Figura 20b), e com um pequeno aumento nos valores do potencial Zeta, durante os primeiros sete dias, presumivelmente, devido à concentração de íons na interface das nanovesículas lipídicas (ver Figura 20c), os quais foram mantidos ao longo do restante período de armazenamento (ver Figura 20c). Nanovesículas lipídicas placebo (controle) também foram produzidas, sem partículas fágicas encapsuladas, e armazenadas sob as mesmas condições; para estas, a mesma tendência foi encontrada para o tamanho hidrodinâmico médio de partícula, junto com um pequeno aumento nos valores do potencial Zeta. Em emulsões múltiplas do tipo A/O/A (tais como as nanovesículas lipídicas produzidas neste trabalho e contendo núcleo aquoso, dispersas em água), existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos, e uma correlação negativa com a constante dielétrica do emulsificante (Tween 80, um surfactante não-iônico e emulsificante com um valor de HLB (balanço hidrofílicolipofílico) de 15,0 (SCHMIDTS et al., 2009)). Aumentando o peso molecular (tal como no Softisan 100[™], com resíduos de ácidos graxos entre C₁₀-C₁₈) e diminuindo a constante dielétrica (tal como no Tween 80) indica uma maior hidrofobicidade, levando a uma maior impregnação da interface e a uma emulsão múltipla mais estável (BALCÃO et al., 2014b), o que está em clara concordância com a estabilidade observada para os sistemas de emulsão múltipla produzidos neste trabalho, tanto em termos de manutenção do tamanho hidrodinâmico médio de partícula e polidispersão, como dos valores do potencial Zeta. A superior estabilidade de emulsões contendo Tween 80 pode ser relacionada com o fato de que o Tween 80 possui uma cadeia oleato com 18 átomos de carbono e uma ligação insaturada, o que conduz a uma camada de interface O/A mais estável e subsequentemente a uma maior estabilidade da emulsão (SCHMIDTS et al., 2009). A maior hidrofobicidade dos

sistemas de emulsão múltipla A/O/A produzidos neste trabalho encontra ainda suporte no valor médio ponderado (calculado) para o seu HLB (13,418, ver Quadro 5).

Para produzir este valor de HLB, a expressão de SCHMIDTS *et al.* (2009) para o cálculo do HLB ponderado foi devidamente aplicada (ver Equação (6)).

$$HLB_{\text{emulsão}}_{\text{múltipla A/O/A}} = \frac{HLB_{\text{I}} \times \left(\frac{\phi(a/o)}{a}\right) \times \text{wt}\%_{\text{I}} + HLB_{\text{II}} \times \text{wt}\%_{\text{II}}}{\left(\frac{\phi(a/o)}{a}\right) \times \text{wt}\%_{\text{I}} + \text{wt}\%_{\text{II}}}$$
(6)

onde HLB_{l} é o valor de HLB do emulsificante interno (emulsificante I) usado para a emulsão primária (a/o) (calculado como HLB_l = {[(%lecitina, m/m)*HLB_{lecitina}]+[(%Tween80, m/m)*HLB_{Tween80}]}, onde HLB_{lecitina}=4 e HLB_{Tween80}=15), $\phi(a/o)/a$ é a fração de emulsão primária (a/o) na emulsão múltipla a/o/a, $wt\%_{l}$ é a fração mássica (%, m/m) do emulsificante I na emulsão primária (a/o), HLB_{ll} é o valor de HLB do emulsificante II (emulsificante usado para a fase aquosa externa, isto é, $HLB_{poloxâmero 188}$ =29), e $wt\%_{ll}$ é a fração mássica (%, m/m) do emulsificante II na emulsão múltipla.

Uma partícula física de bacteriófago JG004 é constituída por um capsídeo proteico hexagonal que mede cerca de 67 nm e uma bainha contráctil (cauda) com cerca de 115nm, segundo determinações realizadas neste trabalho através de análises por crio-MET (ver seção 5.6.6.). Devido à flexibilidade da bainha do fago, é possível que caiba uma partícula de bacteriófago dentro das nanovesículas formadas nas emulsões múltiplas obtidas. O Quadro 5 apresenta os valores médios de tamanho hidrodinâmico de partícula, obtidos através de análises por DLS. Verifica-se uma proximidade no tamanho hidrodinâmico das nanovesículas formadas em todas as emulsões múltiplas avaliadas, sendo a formulação EM1000 a que apresenta maior tamanho hidrodinâmico das suas nanovesículas lipídicas, possivelmente devido à maior quantidade de bacteriófago nela oferecido.

O índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição de tamanhos, parâmetro importante na manutenção da estabilidade do sistema coloidal, foi baixo (aproximadamente 0,200) o que indica a formação de sistemas essencialmente monodispersos para todas as formulações, conforme se pode observar no Quadro 5.

5.3. Avaliação da viscosidade e do pH das emulsões múltiplas do tipo A/O/A

Especialmente para aplicações (bio)farmacêuticas, formulações com baixa viscosidade são importantes para permitir uma boa dissolução em água, para que a formulação possa ser convenientemente carreada, por exemplo, na forma de soluções isotônicas. O valor médio (n=3) obtido para a viscosidade (μ) das emulsões múltiplas A/O/A formuladas com partículas bacteriofágicas encapsuladas foi de $\bar{\mu} = (4,77 \pm 0,06) kg \cdot s^{-1} \cdot m^{-1}$.

As propriedades físicas de formulações farmacêuticas podem ter um efeito nas taxas de nebulização e tamanho de partículas. A viscosidade, força iônica, osmolaridade, pH e tensão superficial podem impedir a nebulização de algumas formulações. Se o pH for muito baixo, ou se a solução for hiper- ou hipo-osmolar, o aerosol pode induzir broncoconstrição, tosse e irritação da mucosa pulmonar (ESCHENBACHER; BOUSHEY; SHEPPARD, 1984; WEBER et al., 1997; LABIRIS; DOLOVICH, 2003). As emulsões A/O/A produzidas exibiram uma baixa viscosidade, como referido acima, a um valor de pH próximo de 6,0 (ver Figura 19d). Estas são características de grande importância para administração de uma dada formulação por aerossolização.

O potencial hidrogeniônico das amostras de emulsão múltipla com entidades fágicas encapsuladas recém preparadas, e da amostra da emulsão múltipla sem entidades fágicas encapsuladas (emulsão placebo), foram obtidas através da medição direta, sem diluição da amostra, com eletrodo de vidro combinado, à temperatura de 25 °C. Os valores de pH da ME10 e da MEPLC foram bem semelhantes, levemente ácidos, no entanto o pH obtido para a ME1000 foi próximo do neutro (ver Figura 20d). Os bacteriófagos estão suspensos em uma mistura de meio de cultura e tampão fágico, que foi esterilizado por filtração na etapa de propagação e purificação, e este sistema tamponante, em maior quantidade na emulsão ME1000, é o responsável pela diferenciação do pH frente às outras amostras.

5.4. Aspecto macroscópico das emulsões múltiplas do tipo A/O/A

Após a preparação de cada emulsão múltipla A/O/A, avaliou-se o seu aspecto macroscópico. Esta análise é importante já que permite identificar fenômenos de coalescência, floculação e/ou cremeação característicos de nanoemulsões com pouca estabilidade (SCHULLER; ROMANOWSKY, 1998). Não foram detectados quaisquer fenômenos de instabilidade das emulsões recém-produzidas com partículas bacteriofágicas encapsuladas na fase aquosa interna, tendo estas apresentado sempre um aspecto leitoso

e uniforme. Independentemente dos seus parâmetros processuais (10 μ L ou 1000 μ L da suspensão concentrada de partículas bacteriofágicas na fase aquosa interna), as emulsões apresentaram-se bastante fluidas, translúcidas e sem qualquer aderência visível às paredes dos tubos Falcon onde foram armazenadas (ver Figura 21).

Figura 21. Aspecto leitoso, sem floculação, sem cremeação e sem aderência às paredes do tubo, das emulsões do tipo A/O/A recém produzidas.



Fonte: elaboração própria.

5.5. Determinação da eficiência de encapsulação

Após centrifugação de alíquotas de 2 mL tanto do sistema ME1000 como do sistema MEPLC, 200 μ L do sobrenadante do sistema ME1000 foram cuidadosamente recolhidos, diluídos para 2000 μ L com água ultrapura (i.e., uma diluição 1:10), introduzidos numa cubeta de quartzo, e a absorbância lida nos comprimentos de onda de 255 nm e 320 nm, usando como branco, para ambos os comprimentos de onda, a emulsão múltipla A/O/A placebo (i.e., MEPLC). Usando esta mesma abordagem para a suspensão concentrada de bacteriófago, com 40 μ L de sobrenadante diluídos para 2000 μ L com água ultrapura (i.e., uma diluição 1:50), onde o branco foi preparado usando uma mistura de LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL) para zerar o espectrofotômetro para ambos os comprimentos de onda, produzindo Abs_{255nm}-Abs_{320nm}=0,263 (0,310-0,047), a aplicação da Equação (2) levou a uma concentração de partículas fágicas na suspensão concentrada de bacteriófago igual a 1,575x10⁹ viriões/mL (Bacteriófagos livres = ((0,310-0,047)/8,3487x10⁻⁹)x50 = 1,575x10⁹ viriões/mL). Usando os resultados obtidos das leituras de absorbância (Abs_{255nm}-Abs_{320nm}=0,142 (0,176-0,034)) com o sobrenadante do sistema ME1000 na Equação (2),

obteve-se uma concentração de partículas fágicas de $1,701\times10^8$ viriões/mL (Bacteriófagos livres = $((0,176-0,034)/8,3487\times10^{-9})\times10 = 1,701\times10^8$ viriões/mL) para o sobrenadante do sistema ME1000. Usando a Equação (3), onde a quantidade de viriões oferecidos para preparar 2 mL de ME1000 foi igual a $3,150\times10^9$ viriões e a quantidade de viriões no sobrenadante dos 2 mL do sistema ME1000 foi igual a $3,402\times10^8$ viriões, a eficiência de encapsulação (EE) de partículas fágicas do sistema ME1000 foi de EE(%) = $((3,150\times10^9-3,402\times10^8)/3,150\times10^9)\times100 = 89.2\%$.

É importante lembrar que esta eficiência de encapsulação está relacionada exclusivamente com viriões de fagos, uma vez que as leituras de absorbância foram realizadas de forma a excluir debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas liberadas por lise celular bacteriana.

5.6. Caracterização físico-química das emulsões múltiplas do tipo A/O/A

As características físico-químicas das emulsões múltiplas do tipo A/O/A são afetadas por um conjunto de variáveis processuais (GLASSER et al., 2016a,b; SEVERINO et al., 2011). Neste sentido, as emulsões múltiplas do tipo A/O/A sem (emulsão placebo, MEPLC) e com entidades proteicas (partículas bacteriofágicas) encapsuladas, foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através da determinação por DLS (espalhamento dinâmico de luz-laser) ao longo de um período de armazenamento à 4 °C, em termos de tamanho hidrodinâmico de partícula (HS), índice de polidispersão (PI) e potencial Zeta (ZP).

O estudo da forma de associação das partículas bacteriofágicas às substâncias utilizadas na produção da emulsão múltipla do tipo A/O/A foi efetuado através de análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (XRD), rastreamento de nanopartículas (NTA) e análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Foram ainda efetuadas análises por criomicroscopia eletrônica de transmissão (crio-MET) e por microscopia eletrônica de transmissão após coloração negativa com acetato de uranila (NS-MET).

5.6.1. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permite a identificação de grupos funcionais. Cada grupo funcional em particular absorve radiação em uma frequência característica do espectro infravermelho. Assim, um gráfico de intensidade versus frequência de radiação, conhecido como espectro de infravermelho, permite a caracterização de grupos funcionais em um dado material (SKOOG et al., 2007), o que faz com que a espectrofotometria FTIR seja bastante usada em análises estruturais de sistemas nanoestruturados. Esta técnica analítica pode permitir tornar claras possíveis interações entre as partículas bacteriofágicas encapsuladas e o envelope lipídico das nanovesículas lipídicas com núcleo aquoso integrantes da emulsão múltipla do tipo A/O/A, através da análise dos grupos funcionais dos agentes envolvidos no processo. A Figura 22 exibe os espectros de infravermelho da emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC, ver Figura 22d), da emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 10 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10, ver Figura 22e), da emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000, ver Figura 22f), e da suspensão concentrada de bacteriófagos (ver Figura 22g).

Os picos de intensidade aos números de onda de 3300 cm⁻¹ (MEPLC, espectro **d** na Figura 22 e espectro **a** na Figura 23), 3300 cm⁻¹ (ME10, espectro **e** na Figura 22 e espectro **b** na Figura 23), 3350 cm⁻¹ (ME1000, espectro **f** na Figura 22 e espectro **c** na Figura 23) e 3250 cm⁻¹ (suspensão concentrada de bacteriófago, espectro **g** na Figura 22 e espectro **d** na Figura 23) são característicos de estiramentos do grupo -OH e indicam a presença de ligações com moléculas de água. Estes picos são mais intensos nos espectros **d**, **e** e **f** devido à natureza aquosa das emulsões múltiplas produzidas (ver Figuras 22d, 22e e 22f, e Figuras 23a, 23b e 23c). Nos espectros de infravermelho **d**, **e** e **f** (ver Figura 22) podem observar-se picos entre 2853 e 2924 cm⁻¹ (característicos de estiramentos sp³ do grupo CH), 1746 cm⁻¹ (ver Figura 22d) e 1742 cm⁻¹ (ver Figuras 22e e 22f), característicos de estiramento C=O (dímero, ligado a H), e no espectro de infravermelho **g** um pico a 1600 cm⁻¹ ¹ (ver Figura 22g e Figura 23d), característico do grupo carbonila (-C=O). Figura 22. Espectros FTIR de amostras de lecitina (a), poloxâmero 188 (b), Softisan100[™] (c), emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC) (d), emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 10 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10) (e), emulsão múltipla A/O/A com partículas fágicas encapsuladas preparada com 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000) (f), e suspensão concentrada de bacteriófagos (g). Os espectros FTIR de infravermelho foram recolhidos na região de números de onda de 4000 cm⁻¹ a 400

cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹, num espectrofotômetro FTIR da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.).



Fonte: elaboração própria.

A Figura 23 mostra a sobreposição de alguns dos espectros de infravermelho obtidos, para melhor visualização de possíveis interações.

Figura 23. Sobreposição dos espectros de infravermelho FTIR de amostras de emulsão múltipla A/O/A placebo (a, MEPLC), emulsão múltipla A/O/A contendo 10 μL de bacteriófago encapsulado (b, ME10), emulsão múltipla A/O/A contendo 1000μL de bacteriófago encapsulado (c, ME1000) e suspensão fágica concentrada (d).



Fonte: elaboração própria.

No espectro de infravermelho da suspensão concentrada de bacteriófago (ver Figura 22g e Figura 23d), um pico que aparece à 2931 cm⁻¹ é provavelmente atribuível ao estiramento assimétrico do grupo CH₂, um pico que aparece à 1525 cm⁻¹ é provavelmente atribuível à deformação angular de um grupo -NH₂ (ou o grupo amina terminal ou um grupo amina de resíduos de lisina nas proteínas capsular ou de fibras da cauda do bacteriófago), um pico que aparece à 1399 cm⁻¹ é provavelmente atribuível a uma curvatura no plano de C-O-H, outro pico que aparece à 1457 cm⁻¹ é muito provavelmente atribuível ao grupo carboxilato (-COO-), um pico que aparece à 1067 cm⁻¹ provavelmente atribuível ao PO₄, um pico que aparece à 985 cm⁻¹ é provavelmente atribuível a uma torsão em dobra fora do plano do grupo O-H, e um pico que aparece à 1243 cm⁻¹ é provavelmente atribuível a um estiramento do grupo C-O.

Comparando os espectros de infravermelho das emulsões múltiplas sem (Figura 22d e Figura 23a) e com (Figuras 22e e 22f, e Figuras 23b e 23c) partículas fágicas encapsuladas, são visíveis picos na região de 1107 cm⁻¹ a 1030 cm⁻¹, característicos de torsões -C=O. No espectro de infravermelho da suspensão concentrada de bacteriófago (Figura 22g e Figura 23d), um pico característico aparece à 1067 cm⁻¹ devido ao estiramento da ligação -P-O- em grupos fosfato. Uma comparação entre os espectros de infravermelho das emulsões múltiplas A/O/A sem (Figura 22d e Figura 23a) e com (Figuras 22e e 22f, e Figuras 23b e 23c) partículas fágicas encapsuladas, poderá permitir concluir que não existe deslocamento de grandes picos principais, nem a existência dos picos característicos do espectro de infravermelho de partículas fágicas livres (1525 cm⁻¹, 1399 cm⁻¹, 620 cm⁻¹ e 533 cm⁻¹ (este último provavelmente atribuível a torsões da ligação C-C)), o que indica que praticamente todas as partículas fágicas oferecidas na preparação das emulsões múltiplas ME10 e ME1000 foram de fato encapsuladas, estando por isso praticamente ausentes na fase aquosa externa das emulsões. Adicionalmente, comparando os espectros de infravermelho das emulsões múltiplas contendo partículas fágicas encapsuladas (Figuras 22e e 22f, e Figuras 23b e 23c), um pico característico à 1107 cm⁻¹ (Figura 22e e Figura 23b) e 1101 cm⁻¹ ¹ (Figura 22f) com intensidade mais elevada no espectro **f** (Figura 22f e Figura 23c), indica a presença de maiores quantidades de partículas fágicas nesta última.

5.6.2. Análises por difração de raios-X (XRD)

A singularidade dos padrões de difração de substâncias cristalinas, a capacidade de distinguir entre elementos e seus óxidos, e a possibilidade de identificar compostos químicos, formas polimórficas e cristais mistos, através de análises não-destrutivas, são as vantagens decisivas das análises por difração de raios-X sobre outras técnicas analíticas. Os difratogramas obtidos pelas análises de difração de raios-X (XRD) realizadas à suspensão concentrada de bacteriófago e às emulsões múltiplas A/O/A sem (MEPLC) e com partículas fágicas encapsuladas (ME1000), com comprovada atividade antibacteriana, podem ser encontrados na Figura 24.

Figura 24. Difratogramas de raios-X (XRD) de amostras de lecitina (curva cinza), poloxâmero 188 (curva vermelha), Softisan100[™] (curva azul), emulsão múltipla placebo A/O/A sem quaisquer partículas fágicas (MEPLC) (curva preta), emulsão múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas (preparada com 1000 µL da suspensão concentrada de bacteriófago, ME1000) (curva verde), e da suspensão concentrada de bacteriófago (curva púrpura). O difratograma na curva marrom foi produzindo subtraindo o difratograma normalizado da MEPLC do difratograma normalizado da ME1000. Os difratogramas de raios-X foram produzidos usando raios-X filtrados por alvo de Cu. As análises foram realizadas a ângulos de difração de 2-Theta (de 5º a 90º, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2º.min⁻¹) com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente de 30 mA e potência de raios-X de 3 kW, num difratómetro de raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão).



Fonte: elaboração própria.

Picos de elevada intensidade (amplitude) e base estreita estão relacionados com materiais cristalinos, enquanto aqueles picos de base larga estão relacionados com materiais amorfos. Uma vez que a intensidade dos picos nos padrões de difração de raios-X também depende da concentração de entidade bioativa, um aumento de intensidade tanto dos picos como do padrão de difração era esperado para a emulsão múltipla A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas (ME1000, ver Figuras 24 e 25, curvas verdes) em relação à emulsão múltipla controle (MEPLC, sem partículas fágicas encapsuladas, ver

Figuras 24 e 25, curvas a preto). Os difratogramas das emulsões ME10 e ME1000 (ver Figura 25) apresentam o mesmo padrão de intensidades, mas com diferentes amplitudes.

Figura 25. Detalhe dos difratogramas de raios-X (XRD) de amostras da emulsão múltipla placebo A/O/A sem partículas fágicas (MEPLC) (curva preta), da emulsão múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas (preparada com 1000 μL da suspensão concentrada de bacteriófago, ME1000) (curva verde), e da suspensão concentrada de bacteriófago (curva púrpura), para 15 < 2θ < 35. O difratograma na curva marrom foi produzindo subtraindo o difratograma normalizado da MEPLC do difratograma normalizado da ME1000.



Fonte: elaboração própria.

A normalização da intensidade em difratogramas selecionados (ver Figura 25, suspensão concentrada de bacteriófago, emulsão múltipla A/O/A placebo sem partículas fágicas encapsuladas (MEPLC, ver Figura 25), e emulsão múltipla A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas (ME1000, ver Figura 25) foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor máximo de intensidade em cada difratograma, permitindo assim uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X das várias emulsões múltiplas. Os difratogramas de raios-X das três emulsões múltiplas A/O/A, sem (MEPLC, ver Figura 25) e com (ME10 e ME1000, ver Figura 25) partículas fágicas encapsuladas exibiram uma banda larga com bastante ruído, com picos bem definidos na região de 18,00 \leq 2 Theta \leq 25,00, onde os picos mais pequenos e bem definidos produzidos indicam resíduos

cristalinos do lipídeo (Softisan 100^{TM} , ver Figura 24 e Figura 25) utilizado na preparação das emulsões múltiplas. Em particular, os difratogramas de raios-X revelaram a presença de dois sinais, um a $2\theta = 21,50^{\circ}$ e outro a $2\theta = 23,26^{\circ}$ (ver Figura 25), que são ambos característicos da forma polimórfica ortorrômbica frequentemente observada em triacilgliceróis complexos tais como o Softisan 100^{TM} (BUNJES; UNRUH, 2007).

A subtração do difratograma da emulsão múltipla MEPLC ao difratograma da emulsão múltipla ME1000 (isto é, ME1000-MEPLC) permitiu o cancelamento do efeito da matriz lipídica integrante das nanovesículas lipídicas com núcleo aquoso e claramente não exibe picos que se destaquem na curva. Isto permite concluir que a quantidade de partículas bacteriofágicas na fase aquosa externa foi demasiado baixa para absorver energia dos raios-X que atingiram a amostra durante a análise, observando assim o carácter amorfo das nanovesículas lipídicas contendo partículas fágicas encapsuladas. Esta conclusão é de fato suportada pelo pico raso observado na curva marrom na região de 19,00 \leq 2 Theta \leq 40,00 (ver Figura 25).

5.6.3. Análises por rastreamento de nanopartículas (NTA)

Tanto as emulsões múltiplas ME10 e ME1000, contendo partículas fágicas encapsuladas, a emulsão múltipla placebo (MEPLC), assim como a suspensão fágica concentrada, foram também analizadas por rastremento de nanopartículas num dispositivo NanoSight LM14C da Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido). A temperatura do meio de dispersão foi completamente programada através do software do dispositivo de rastreamento de nanopartículas, com as análises a serem realizadas a 24,999 °C. As amostras (1µL de amostra de emulsão múltipla previamente diluída em 4999 µL de água ultrapura) foram atingidas por um laser de luz verde com comprimento de onda de 532 nm e os movimentos Brownianos das nanovesículas lipídicas foram capturados por uma câmera sCMOS de elevada resolução, para realizar as análises por rastreamento de nanopartículas. Na Figura 26 podem ser encontrados fotogramas congelados das partículas na suspensão concentrada de bacteriófagos (ver Figura 26a), das nanovesículas lipídicas integrantes das emulsões múltiplas A/O/A contendo partículas fágicas encapsuladas (ME10 e ME1000, ver Figuras 26b e 26c respectivamente),e das nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão múltipla placebo A/O/A (MEPLC, ver Figura 26d), permitindo observar as partículas e a ausência de agregação das mesmas.

Figura 26. Fotogramas de elevada resolução da (a) suspensão concentrada de bacteriófagos, (b) emulsão múltipla A/O/A ME10, (c) emulsão múltipla A/O/A ME1000, e (d) emulsão múltipla placebo A/O/A (MEPLC), capturados por uma câmera sCMOS de elevada resolução, após irradiação das amostras com um laser de luz verde ao comprimento de onda de 532 nm, usando um dispositivo NanoSight da Malvern Instruments Ltd (modelo LM14C, Worcestershire, Reino Unido).



Fonte: elaboração própria.

Comparando os resultados obtidos pela técnica de NTA, que é mais sensível e precisa do que a técnica de análise por DLS, percebe-se que não existiram diferenças significativas entre as determinações realizadas pelas duas técnicas, com o coeficiente de variação (CV, %) das determinações ficando abaixo de 10% entre as medições realizadas pelas duas técnicas de análise (ver Quadro 6).

Quadro 6. Comparação entre os resultados obtidos para o tamanho hidrodinâmico médio das nanovesículas lipídicas integrantes das várias emulsões múltiplas, pelas duas técnicas analíticas (DLS *vs.* NTA).

	Emulsão múltipla A/O/A							
Determinação	ME10		ME1000		MEPLC			
	Análise por DLS	Análise por NTA	Análise por DLS	Análise por NTA	Análise por DLS	Análise por NTA		
Tamanho hidrodinâmico médio de partícula (nm)	161,57	180,02	188,54	185,02	169,00	179,04		
σ	13,05		2,49		7,10			
CV (%)	7,64		1,33		4,08			

Fonte: elaboração própria.

A técnica de análise NTA forneceu ainda informações sobre a concentração aproximada de partículas nas emulsões múltiplas A/O/A analisadas, com a emulsão múltipla ME10 apresentando $(2,44\pm6,69)\times10^{12}$ partículas/mL, a emulsão múltipla ME1000 apresentando $(2,39\pm7,33)\times10^{12}$ partículas/mL e a emulsão múltipla MEPLC apresentando $(2,34\pm2,19)\times10^{12}$ partículas/mL. Obtiveram-se, assim, concentrações de partículas bastante semelhantes nas várias emulsões, o que contribui para a confirmação da reprodutibilidade do processo de produção das emulsões múltiplas A/O/A.

Os resultados produzidos pelas análises (realizadas em quintuplicatas) permitiram o cálculo do coeficiente de difusão das nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão múltipla preparada com 1000 μ L da suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000) e com comprovada atividade antibacteriana. A concentração de partículas foi determinada como sendo aproximadamente 2,39x10¹² partículas/mL, e a viscosidade dinâmica da emulsão (meio de dispersão) foi de η = 0,888704 cP (ou 0,000888704 kg/(m.s)). Assumindo um diâmetro hidrodinâmico de partícula homogêneo para as nanovesículas lipídicas (como foi na verdade o caso para o sistema de emulsão múltipla ME1000) de 188,54 nm, o coeficiente de difusão das nanovesículas lipídicas contendo partículas fágicas encapsuladas pode ser calculado utilizando a equação de Stokes-Einstein (ver Equação (7)):

$$D = \frac{k_{\rm B} \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \tag{7}$$

onde **D** é o coeficiente de difusão, k_B é a constante de Boltzmann (1,3806488x10⁻²³ m².kg/(s².K)), **T** é a temperatura absoluta (K), η é a viscosidade dinâmica (kg/(m.s)), e *r* é o raio hidrodinâmico (m) da partícula.

Assim, o coeficiente de difusão das nanovesículas lipídicas integrantes do sistema de emulsão múltipla ME1000 foi calculado como sendo 2,607x10⁶ nm².s⁻¹ (ou 2,607x10⁻¹² m².s⁻¹). Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa para o coeficiente de difusão das nanovesículas lipídicas integrantes do sistema de emulsão múltipla ME1000 são comparáveis com, e da mesma ordem de grandeza (10⁻¹² m².s⁻¹) dos resultados publicados por Katayama *et al.* (2009). Tipicamente, os coeficientes de difusão para moléculas variam desde 10⁻¹⁰ a 10⁻⁷ m².s⁻¹, mas os coeficientes de difusão para nanopartículas são tipicamente da ordem de grandeza de 10⁻¹² m².s⁻¹ (KATAYAMA *et al.*, 2009). A lecitina tem sido reportada como estabilizante de emulsões múltiplas A/O/A (SCHMIDTS *et al.*, 2009), com a estabilidade aumentada relacionada com uma alteração no coeficiente de difusão da

água e de substâncias solúveis em água sujeitas à composição da fase oleosa. Quanto mais baixo o coeficiente de difusão, mais estável a emulsão múltipla é (KATAYAMA *et al.*, 2009; SCHMIDTS *et al.*, 2009), e isto foi de fato observado durante o armazenamento do sistema de emulsão múltipla produzido (ME1000) com partículas fágicas encapsuladas. Observações macroscópicas do nanossistema com partículas fágicas aprisionadas não mostraram separação visível de fases, exibindo ausência de aderência às paredes do recipiente de contenção sob temperaturas de refrigeração.

Adicionalmente, foram produzidos gráficos de intensidade (unidades de absorbância) em função do tamanho hidrodinâmico da partícula após irradiação das amostras com um laser de luz verde ao comprimento de onda de 532 nm para (a) suspensão concentrada de bacteriófagos, (b) emulsão múltipla placebo (MEPLC), (c) emulsão múltipla ME10, e (d) emulsão múltipla ME1000 (ver Figura 27). Como pode ser observado na Figura 27a, a suspensão concentrada de bacteriófago integrou partículas com tamanhos até 1200 nm, muito provavelmente devido aos debris bacterianos presentes na suspensão concentrada de bacteriófagos.

Figura 27. Gráficos de intensidade (unidades de absorbância) em função do tamanho hidrodinâmico da partícula para (a) suspensão concentrada de bacteriófagos, (b) emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), (c) emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10), e (d) emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10), e (d) emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000), produzidos pelo dispositivo NanoSight da Malvern Instruments Ltd (model0 LM14C, Worcestershire, Reino Unido), após irradiação das amostras com um feixe laser de luz verde ao comprimento de onda de 532 nm.



Fonte: elaboração própria.
No entanto, a produção dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A usando 10 µL (ME10) ou 1000 µL (ME1000) da suspensão concentrada de bacteriófagos excluiu totalmente tais partículas de tamanhos maiores (ver, por exemplo, as Figuras 27c e 27d) mas reteve as partículas de bacteriófago no interior do núcleo aquoso das suas nanovesículas lipídicas, uma conclusão ainda mais suportada pelos ensaios de atividade antibacteriana realizados com ambos os sistemas de emulsão múltipla A/O/A e que serão objeto de discussão mais à frente.

5.6.4. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Uma avaliação cuidadosa das curvas termogravimétricas (ver Figura 28a) de ambos os sistemas de emulsão múltipla A/O/A usando ou 10 µL (ME10) ou 1000 µL (ME1000) da suspensão concentrada de bacteriófagos, bem como do sistema de emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), permite a identificação de dois grandes eventos de perda de massa, atribuíveis à perda de água. O primeiro evento de perda de água ocorre desde cerca de 50 °C até 110 °C (ver Figura 28a), provavelmente relacionado com a perda de água da fase aquosa externa, enquanto que o segundo evento, que se extende desde cerca de 120 °C até 185 °C (ver Figura 28a), está muito provavelmente ligado à perda do lipídeo constituínte das nanovesículas com consequente perda da água da fase aquosa interna. Como esperado, a curva termogravimétrica da suspensão concentrada de bacteriófagos exibiu apenas um evento principal de perda de massa, extendendo-se desde cerca de 50 °C até 105 °C (ver Figura 28a), devido à natureza aquosa da suspensão possuindo apenas entidades proteicas (partículas fágicas) e debris celulares bacterianos. A 1ª derivada da curva de perda de massa (i.e., a taxa de variação de massa, ver Figura 28b) pode ser usada para indicar os pontos aos quais a perda de massa é mais aparente (pontos de inflexão), isto é, 110 °C e 180 °C para o sistema de emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), 105 °C e 180 °C para o sistema de emulsão múltipla A/O/A usando 1000 µL (ME1000) da suspensão concentrada de bacteriófago, 100 °C e 180 °C para o sistema de emulsão múltipla A/O/A usando 10 µL (ME10) da suspensão concentrada de bacteriófago e 100 °C para a suspensão concentrada de bacteriófagos. A compatibilidade entre o Tween 80 (i.e. poly(oxyethylene) sorbitan monooleate) e outros componentes da fase aquosa interna, atribuída à ligações de hidrogênio e a mais baixa energia de rede cristalina deste polímero, teve um impacto importante no processo de perda de água tanto da emulsão não carregada

com partículas fágicas (MEPLC) como das emulsões carregadas com partículas fágicas (ME10 e ME1000) (ver Figura 28b).

Figura 28. Curvas termogravimétricas (a) e 1ª derivada das curvas de perda de massa (b) de amostras da suspensão concentrada de bacteriófagos (linhas azuis), emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC, linhas rosa), emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10, linhas cinza), e emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000, linhas verdes). As análises foram realizadas num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.).



Fonte: elaboração própria.

Sendo entidades de natureza proteica essencialmente inertes, as partículas fágicas não são higroscópicas por natureza e não são esperadas reter mais água quando aprisionadas no interior do núcleo aquoso das nanovesículas lipídicas, e de fato isto pode ser observado a partir da visualização das Figuras 28a e 28b, onde não pode ser observado qualquer deslocamento nas curvas termogravimétricas (ver Figura 28a) dos sistemas de

emulsão múltipla MEPLC, ME10 e ME1000, com a perda de água do núcleo interno das nanovesículas lipídicas ocorrendo à mesma (elevada) temperatura muito provavelmente devido à ligações de hidrogênio entre moléculas de água e de Tween 80. Isto pode ser confirmado por observação da Figura 28b, onde tal ausência de deslocamento pode ser vista mais claramente no segundo pico. No entanto, os perfis de perda de água de todas as formulações A/O/A não diferiram substancialmente uns dos outros. O sistema de emulsão múltipla ME1000 passou por um processo de perda de massa em duas etapas, e é estável até pelo menos 50 °C. A análise por TG das nanovesículas lipídicas revelou uma perda de massa de cerca de 87.5% até uma temperatura de 120 °C, que pode ser atribuída à perda da fase aquosa externa dos sistemas de emulsão múltipla. O sistema matricial das nanovesículas lipídicas, no entanto, revelou uma perda de massa de cerca de 10% quando aquecido até 200 °C, como se pode ver nas Figuras 28a e 28b.

Análises por calorimetria exploratória diferencial dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A usando 10 µL (ME10) ou 1000 µL (ME1000) da suspensão concentrada de bacteriófagos, bem como do sistema de emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC) forneceram uma visão sobre o estado e grau de cristalinidade, e o comportamento de fusão de materiais tais como as nanovesículas lipídicas produzidas. A adição (aprisionamento) de partículas fágicas nas nanovesículas lipídicas de núcleo aquoso promoveu um ligeiro decréscimo nos picos de temperatura de fusão (picos de absorção a 110,34 °C, 167,08 °C e 196,18 °C e calores absorvidos associados (entalpias de fusão) de 1,429 J/mg, 0,2659 J/mg e 0 J/mg, respectivamente, para o sistema de emulsão múltipla placebo (MEPLC, ver Figura 29a) (ausência de partículas fágicas aprisionadas), para picos de absorção a cerca de 108,21 °C, 152,44 °C e 191,22 °C e calores absorvidos associados (entalpias de fusão) de 1,518 J/mg, 0,1170 J/mg e 0,0225 J/mg, respectivamente, para o sistema de emulsão múltipla ME1000 com partículas fágicas aprisionadas (ver Figura 29c)), denotando um encurtamento do intervalo de temperaturas de fusão no caso do sistema de emulsão múltipla ME1000 (ver Figuras 29a e 29c).

A quantidade de calor absorvido pelas nanovesículas lipídicas com partículas fágicas aprisionadas (sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000) foi 6% superior àquele absorvido pelas nanovesículas vazias (sistema de emulsão múltipla A/O/A placebo MEPLC). No entanto, a inclusão de partículas fágicas nas nanovesículas lipídicas levou a um decréscimo significativo no pico de absorção de calor (108,21 °C), quando comparado com aquele da suspensão concentrada de bacteriófagos (210,56 °C), devido à amorfização do sistema. A mesma tendência foi verificada quando se compararam os sistemas de emulsão múltipla MEPLC e ME1000. Quando se analisou a emulsão múltipla A/O/A preparada com a quantidade mais elevada de partículas fágicas (1000 µL da suspensão concentrada de

bacteriófagos, ME1000) no interior do núcleo aquoso das suas nanovesículas lipídicas, obteve-se uma entalpia de fusão de 1,518 J/mg_{nanoemulsão}, a um pico de temperatura de 108,21 °C, um valor apenas 6,23% maior do que aquele obtido para o sistema de emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC), o que provavelmente contribui para o efeito estabilizante do procedimento de nanoencapsulação.

Figura 29. Termogramas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras de (a) emulsão múltipla A/O/A placebo (MEPLC, linhas rosa), (b) emulsão múltipla A/O/A preparada com 10 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME10, linhas cinza), (c) emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 μL de suspensão concentrada de bacteriófagos (ME1000, linhas verdes), e (d) suspensão concentrada de bacteriófago (linhas azuis). As análises foram realizadas num microcalorímetro exploratório diferencial da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.).



Fonte: elaboração própria.

Os resultados obtidos a partir das análises térmicas por DSC realizadas nos sistemas particulados carregados e não carregados com partículas bacteriofágicas (ver Figura 29) estão em concordância com aqueles obtidos a partir dos estudos de difração de raios-X (ver Figuras 24 e 25), uma vez que, como pode ser visto por observação dos termogramas de DSC, o aprisionamento das partículas fágicas no interior do núcleo aguoso das nanovesículas lipídicas levou a uma cristalinidade diminuída com encurtamento do perfil de fusão. A amorfização do envelope lipídico após aprisionamento das partículas bacteriofágicas (ver Figuras 24, 25 e 29) muito provavelmente amplificou a capacidade de acomodação das nanovesículas lipídicas para uma macromolécula tal como a partícula bacteriofágica. Devido a uma rigidez diminuída, uma redução na taxa de liberação das partículas aprisionadas foi muito provavelmente certa, o que por sua vez poderá explicar a alta estabilidade observada para o sistema de emulsão múltipla contendo partículas fágicas aprisionadas (ver Figura 20). Uma avaliação cuidadosa dos termogramas de DSC exibidos na Figura 29 permite observar três eventos endotérmicos distintos: um a 196,18 °C (emulsão múltipla placebo, MEPLC) que se moveu para 191,22 °C (sistema de emulsão múltipla ME1000), implicando em um decréscimo na cristalinidade; um a 167,08 °C (emulsão múltipla placebo, MEPLC) que se moveu para 152,44 °C (sistema de emulsão múltipla ME1000); e um a 110,34 °C (emulsão múltipla placebo, MEPLC) que se moveu para 108,21 °C (sistema de emulsão múltipla ME1000). Notavelmente, os eventos térmicos representados na Figura 29 e os difratogramas de raios-X representados nas Figuras 24 e 25 denotam uma clara transição de um estado mais cristalino das nanovesículas lipídicas (ver Figura 29a, emulsão múltipla MEPLC) para um estado mais amorfo (ver Figura 29c, emulsão múltipla ME1000), devido ao aprisionamento de uma entidade proteica tal como a partícula fágica utilizada no presente trabalho de pesquisa, levando assim ao aumento de estabilidade observada para o sistema de emulsão múltipla ME1000 (ver Figura 20). Em relação ao termograma da suspensão concentrada de bacteriófago (ver Figura 29d), os dois picos que aparecem a 203,68 °C e 210,56 °C estão muito provavelmente relacionados com a natureza lipídica dos debris celulares bacterianos presentes na suspensão. O termograma produzido para o sistema de emulsão múltipla ME10 (ver Figura 29b) exibe apenas dois eventos principais de absorção de calor (ver Figura 29b), um a 140,30 °C e outro a 175,18 °C. Uma vez que este sistema de emulsão múltipla foi produzido usando uma quantidade muito menor de partículas bacteriofágicas (i.e., 100x menor do que aquela que foi oferecida na preparação do sistema de emulsão múltipla ME1000), a ausência do terceiro pico (presente em torno de 191,22 °C na emulsão múltipla ME1000) está muito provavelmente relacionada com a quantidade virtualmente nula de debris celulares bacterianos.

Claramente, o alargamento da gama de perfil de fusão no sistema ME10 ($\Delta T = 34,88$ °C) por um fator de 1.27x ($\Delta T = 44,23$ °C no sistema ME1000), implica uma cristalinidade diminuída da emulsão múltipla ME1000 devido à amorfização do envelope lipídico após aprisionamento de (uma ou mais) partículas fágicas.

5.6.5. Avaliação da atividade antibacteriana dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas

A atividade antibacteriana dos dois sistemas de emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas aprisionadas, produzidos ou com 10 µL (ME10) ou com 1000 µL (ME1000) de suspensão concentrada de bacteriófago, foi avaliada *in vitro* contra uma cepa patogênica de *Pseudomonas aeruginosa*. Os dois sistemas de emulsão múltipla exibiram eficiências bastante diferentes dependendo da quantidade de partículas fágicas oferecidas durante o procedimento de nanoencapsulação (ver Figura 30).

O sistema de emulsão múltipla ME10 foi preparado oferecendo 1,575x10⁷ viriões, enquanto que o sistema de emulsão múltipla ME1000 foi preparado oferecendo 1,575x10⁹ viriões. Como pode ser observado na Figura 30, a suspensão concentrada de bacteriófago demonstrou uma atividade lítica muito elevada, como era esperado (ver Figuras 30a-d, quadrantes inferiores esquerdos), constituíndo assim o controle positivo. A emulsão múltipla placebo (MEPLC), assim como o placebo da suspensão fágica composta de meio de cultura e tampão fágico, não apresentaram atividade lítica, compondo assim o controle negativo do estudo. No entanto, o sistema de emulsão múltipla ME10 falhou em exibir qualquer atividade antibacteriana (ver Figuras 30c e 30d, quadrantes superiores esquerdos), provavelmente devido a um (ou mais) dos seguintes fatores: (i) a velocidade de homogeneização utilizada para produzir a emulsão múltipla, mas este não foi um fator limitante para a referida ausência de atividade antibacteriana, uma vez que vários pesquisadores reportaram que não houve perda de viabilidade fágica com velocidades de homogeneização de 14000 rpm (PUAPERMPOONSIRI et al., 2009). Neste trabalho de pesquisa, a velocidade de homogeneização foi mantida a um máximo de 12500 rpm, bem abaixo do valor mencionado por aqueles pesquisadores; (ii) a temperatura à qual as partículas fágicas foram sujeitas durante a preparação da emulsão múltipla, mas este também não foi um fator limitante para a sua falta de atividade antibacteriana uma vez que a temperatura máxima do procedimento aqui descrito foi sempre igual ou inferior a 39 °C (temperatura de fusão do Softisan100™ é de cerca de 35 °C); ou (iii) a (muito) mais baixa quantidade de viriões fágicos oferecidos para produzir o sistema de emulsão múltipla ME10, pode assim ter sido o fator limitante e,

na verdade, as análises de atividade antibacteriana realizadas com este sistema de emulsão múltipla produzido com apenas 1,575x10⁷ viriões não revelaram qualquer atividade antibacteriana (ver Figuras 30c e 30d, quadrantes superiores esquerdos). Mas, após aumentar a quantidade de viriões fágicos em duas ordens de grandeza para 1,575x10⁹ viriões, o sistema de emulsão múltipla resultante (ME1000) integrando nanovesículas lipídicas com núcleo aquoso contendo partículas fágicas encapsuladas permitiu observar uma atividade antibacteriana pronunciada (ver Figuras 30a e 30b, quadrantes superiores esquerdos).

Figura 30. Atividade antimicrobiana dos sistemas de emulsão múltipla contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, produzidos com 1000 µL (a e b) e 10 µL (c e d) da suspensão concentrada de bacteriófago. Quadrante superior esquerdo: 20 µL de emulsão múltipla aplicada em disco de papel de filtro estéril (a (ME1000) e c (ME10)) ou gota de 20 µL de emulsão múltipla (b (ME1000) e d (ME10)) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante superior direito: 20 µL de emulsão múltipla placebo (MEPLC) aplicada em disco de papel de filtro estéril (a (ME1000) e c (ME10)) ou gota de 20 µL de emulsão múltipla placebo (b (ME1000) e d (ME10)) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante inferior esquerdo: 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago aplicada em disco de papel de filtro estéril (a e c) ou gota de 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago (b e d) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; Quadrante inferior direito: 10 µL de meio de diluição fágico estéril aplicado em disco de papel de filtro estéril (**a** e **c**) ou gota de 10 µL de meio de diluição fágico estéril (b e d) aplicados diretamente na superfície de top-ágar Luria-Bertani preparado com 100 µL de suspensão bacteriana de Pseudomonas aeruginosa; (e) Quadrante superior esquerdo: 20 µL de sobrenadante da emulsão múltipla ME1000 após extração com clorofórmio e centrifugação; Quadrante superior direito: 20 µL de emulsão múltipla ME1000; Quadrante inferior esquerdo: 20 µL de sobrenadante da emulsão múltipla MEPLC após extração com clorofórmio e centrifugação; Quadrante inferior direito: 10 µL de suspensão concentrada de bacteriófago.



Fonte: elaboração própria.

Emulsões múltiplas placebo para os sistemas ME10 e ME1000 foram também produzidas e testadas para a presença de atividade antibacteriana e, como esperado, os resultados obtidos não exibiram qualquer atividade antibacteriana (ver Figuras 30a-d,

quadrantes superiores direitos). Para testar se o meio de diluição dos viriões fágicos poderia de alguma forma inibir o crescimento bacteriano, uma suspensão placebo foi também preparada misturando LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL), devidamente esterilizada e testada da mesma forma que os sistemas de emulsão múltipla e a suspensão concentrada de bacteriófago. Como esperado, os resultados obtidos não exibiram qualquer atividade antibacteriana (ver Figuras 30a-d, quadrantes inferiores direitos). Adicionalmente, e porque os viriões fágicos nos sistemas de emulsão múltipla ME10 e ME1000 foram extraídos das nanovesículas lipídicas com clorofórmio antes de realizar os testes para atividade antibacteriana, o potencial antibacteriano do sistema de emulsão múltipla ME1000 foi comparado quando se usou clorofórmio ou não antes do plaqueamento. A Figura 30e exibe no seu quadrante superior esquerdo o resultado obtido para o sobrenadante do sistema ME1000 após extração com clorofórmio e centrifugação, no seu quadrante superior direito o resultado obtido para o sistema ME1000 sem qualquer tipo de extração realizada, no seu quadrante inferior esquerdo o resultado obtido para o sobrenadante da emulsão múltipla placebo (MEPLC) após extração com clorofórmio e centrifugação, e no seu quadrante inferior direito o resultado obtido para a suspensão concentrada de bacteriófago. Como pode ser observado, a extração das partículas fágicas das nanovesículas lipídicas com clorofórmio não exerceu qualquer efeito deletério sobre a atividade das partículas fágicas.

5.6.6. Análises micro-estruturais e morfológicas por (crio-/NS-) Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizadas com amostras da suspensão concentrada de bacteriófago e do sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000 (a qual apresentou atividade antibacteriana positiva) por dois processos diferentes, isto é, crio-MET e MET com Coloração Negativa (*Negative Staining MET*, ou NS-MET). A Figura 31 exibe fotomicrografias de crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET) da suspensão concentrada de bacteriófago, mostrando (a) a profusão de partículas fágicas suspensas numa camada de gelo ocupando vários dos orifícios contidos na grade de carbono usada para preparar a amostra, apenas para mostrar a representatividade da análise, (b) várias partículas fágicas aderidas à debris celulares bacterianos, (c) um detalhe de várias partículas fágicas aderidas à debris celulares bacterianos permitindo observar as fibras da cauda e as cápsides hexagonais mostrando a presença (seta verde inserida) e ausência (seta branca inserida) de dsDNA, (g) uma única partícula fágica permitindo observar claramente a morfologia do bacteriófago JG004 com a sua cápside hexagonal característica e as fibras da cauda (seta amarela inserida). A Figura 31 também exibe fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa (NS-MET) de (d) uma partícula fágica, (e) e (f) o sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000 produzido, a diferentes magnificações, e (h) e (i) partículas fágicas permitindo observar claramente a estrutura helicoidal da sua baínha contrátil (setas rosa inseridas). A estrutura das nanovesículas lipídicas integrantes do sistema de emulsão múltipla ME1000 pode encontrar-se nas Figuras 31e e 31f, mas as análises por NS-MET não permitiram distinguir partículas fágicas no interior do sistema de emulsão múltipla A/O/A.

O processo de coloração das partículas com acetato de uranilo envolve uma secagem suave da amostra ao ar seguida da aplicação de 3 μ L de uma solução aquosa de acetato de uranilo a 2% (m/m) na grade de cobre contendo a amostra. Ainda que muito suave, tal secagem é suficiente para promover a deformação das partículas, e isto pode de fato ser claramente observado nas fotomicrografias (**d**), (**e**), (**f**), (**h**) e (**i**) na Figura 31.

Pelo contrário, as análises de MET após vitrificação das amostras permite a observação das partículas como elas realmente são, sem quaisquer alterações na sua forma, uma vez que as amostras são vitrificadas com as partículas suspensas numa fina camada de gelo amorfo. Não obstante este fato, as análises de MET após coloração negativa das amostras permite a observação das partículas com um maior contraste (ver, por exemplo, as fotomicrografias (**d**), (**e**), (**f**) e (**h**) na Figura 31).

A voltagem de aceleração é um parâmetro de imagem importante uma vez que influencia vários outros parâmetros óptico-eletrônicos que são importantes para a resolução, como a profundidade de campo do microscópio eletrônico de transmissão (MET) (des GEORGES et al., 2014). À medida que a voltagem aumenta, também aumenta a energia dos elétrons e, como consequência, os elétrons interagem menos com a matéria ao longo de uma dada espessura e portanto produzem menos contraste, o que é um parâmetro crítico em crio-MET (des GEORGES et al., 2014). Este foi, na verdade, o caso com as análises realizadas e aqui apresentadas, uma vez que o MET utilizado para a realização das análises operou a 120 kV, uma energia de elétrons suficiente para produzir imagens com contraste não tão bom.

Também, nas análises por Crio-MET, as partículas são suspensas numa camada de gelo cuja espessura pode ser muito maior do que as próprias partículas, o que contribui ainda mais para um mau contraste das fotomicrografias. Adicionalmente, a amostra dentro do campo de visão pode não ser completamente plana. Isto poderia ser resolvido favoravelmente por uma voltagem mais elevada, que produz uma maior profundidade de

campo, no entanto isso provocaria o derretimento da camada de gelo, danificando a amostra.

Etano líquido foi usado para vitrificar as amostras de sistema de emulsão múltipla A/O/A rico em água para as análises por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET), uma vez que um fino filme de água rapidamente imerso em etano líquido a -145 °C congela demasiado rapidamente para que a água cristalize (cristaliza de forma amorfa). Este rápido congelamento, mergulhando rapidamente as amostras em etano líquido, não rompe a estrutura dos fagos e das nanovesículas lipídicas moles com núcleo aquoso presentes no estado líquido, como a formação de cristais de gelo pode fazer. As análises por Crio-MET permitiram assim a observação de partículas num estado hidratado quase nativo uma vez que as amostras foram vitrificadas, mantendo as partículas suspensas numa fina camada de gelo amorfo. Não obstante, as fotomicrografias (e) e (f) da Figura 31 permitem observar claramente a estrutura das nanovesículas lipídicas integrantes do sistema de emulsão múltipla ME1000, bem como a total ausência de fenômenos de agregação.

Adicionalmente, uma observação cuidadosa das fotomicrografias (e) e (f) de microscopia eletrônica de transmissão exibidas como Figura 31 permite observar a existência de uma linha escura que delimita cada partícula. Tal linha escura poderá corresponder a uma acumulação do tensoativo lipídico (lecitina de soja) na interface entre as nanovesículas lipídicas e a fase aquosa externa. Tal acumulação pode ser ainda mais evidenciada devido ao fato de que nessa interface a maior opacidade à passagem dos elétrons traduz na verdade numa maior concentração de átomos de carbono nessa mesma interface. Assim, a carga negativa do tensoativo lipídico que muito provavelmente se acumulou nessa zona de interface pode na verdade ter contribuído para o baixo valor de potencial Zeta das nanovesículas lipídicas contendo partícula(s) bacteriofágica(s) encapsulada(s) no seu núcleo aquoso.

Figura 31. Fotomicrografias de Crio-MET da suspensão concentrada de bacteriófago, mostrando (a) a profusão de partículas fágicas na grade de carbono usada para preparar a amostra, (b) várias partículas fágicas aderidas à debris celulares bacterianos, (c) uma porção ampliada de várias partículas fágicas aderidas à debris celulares bacterianos permitindo observar as fibras da cauda e a cápside com e sem dsDNA, (g) zoom de uma partícula fágica; Fotomicrografias de NS-MET de (d) uma partícula fágica, (e) e (f) sistema de emulsão múltipla ME1000 produzido, a diferentes magnificações, e (h) e (i) partículas fágicas permitindo observar claramente a estrutura helicoidal da sua baínha contrátil. As fotomicrografias (j) e (k) foram obtidas com amostras de emulsão múltipla ME1000 não tratadas (puras), aplicadas diretamente sobre grades de carbono.



Fonte: elaboração própria.

Nas fotomicrografias (j) e (k) da Figura 31, obtidas com amostras não tratadas (puras) da emulsão múltipla A/O/A ME1000, podem observar-se as nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão ainda que as imagens estejam bastante difusas devido à espessura da amostra seca sobre as grades de carbono. Pode ainda observar-se uma partícula bacteriofágica na fotomicrografia (j) (seta azul-claro inserida), mas não se podem retirar conclusões em absoluto sobre se a mesma estaria encapsulada na nanovesícula lipídica ou se estaria sobreposta àquela. No entanto, a maior densidade de átomos de carbono na partícula bacteriofágica (de natureza proteica) poderá permitir sugerir que a mesma estaria encapsulada.

5.6.7. Determinação do potencial de citotoxicidade dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas, pelo ensaio MTT

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos de ambos os sistemas de emulsão múltipla A/O/A preparados com 10 μ L (ME10) ou 1000 μ L (ME1000) da suspensão concentrada de bacteriófago, bem como da suspensão concentrada de bacteriófago e dos placebos do sistema de emulsão múltipla (MEPLC) e da suspensão de bacteriófagos (a partir de agora designados como "os produtos") sobre a viabilidade celular, os produtos foram avaliados usando diferentes concentrações. Os dados de viabilidade celular obtidos por exposição aos produtos encontram-se representados na Figura 32 para as duas linhagens celulares avaliadas.

Figura 32. Resultados dos testes de viabilidade celular (via ensaios MTT) usando as linhagens celulares A549 e V79 cultivadas em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade do placebo da suspensão concentrada de bacteriófago, da suspensão concentrada de bacteriófago, do placebo dos sistemas de emulsão múltipla (MEPLC) e dos sistemas de emulsão múltipla ME10 e ME1000, durante um período de tratamento de 24 h a diferentes concentrações. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.



Fonte: elaboração própria.

Nos ensaios de viabilidade celular usando as linhagens celulares A549 e V79, os produtos foram dispersos em meio de cultura DMEM. Os ensaios MTT mostram a viabilidade celular encontrada após exposição à concentrações crescentes do produto, permitindo estabelecer a metade da concentração máxima inibitória (IC_{50}), uma medida da eficácia de uma substância para inibir uma função biológica ou bioquímica específica, a qual determina a concentração de produto necessária para matar 50% das células. Esta medida quantitativa indica, portanto, quanto de um determinado produto é necessário para inibir um dado processo biológico (ou componente de um processo, isto é, uma enzima, célula, recetor celular ou microrganismo) em 50%. Nas concentrações de produto testadas na linhagem celular A549, tanto na suspensão concentrada de bacteriófagos como no seu placebo não apresentaram elevada toxicidade, com estas células apresentando uma viabilidade de cerca de 80% com uma concentração de produto em torno de 10%. Em relação aos sistemas de emulsão múltipla A/O/A, tanto a MEPLC como a ME10 e a ME1000 promoveram uma queda na viabilidade celular produzindo os valores de IC_{50} exibidos no Quadro 7.

Quadro 7. Resultados obtidos para os valores IC₅₀ pelos ensaios MTT com as linhagens celulares A549 e V79, expostas à suspensão concentrada de bacteriófago, ao placebo da suspensão bacteriofágica, e aos sistemas de emulsão múltipla MEPLC, ME10 e ME1000.

Linhagem celular	Produto usado no tratamento	IC ₅₀
A549	Suspensão concentrada de bacteriófago	Não citotóxica até 17,5 %
	Placebo da suspensão bacteriofágica	Não citotóxica até 17,5 %
	MEPLC	4,55 %
	ME10	6,11 %
	ME1000	6,87 %
V79	MEPLC	4,76 %
	ME10	4,23 %
	ME1000	3,38 %

Fonte: elaboração própria.

De acordo com os resultados incluídos no Quadro 7, podemos observar que as células A549 apresentaram uma elevada resistência aos tratamentos com os produtos, sendo necessária uma elevada concentração dos produtos para atingir 50% de morte celular. Com a linhagem celular A549, o tratamento com os produtos ME10 e ME1000 não apresentou diferenças significativas, enquanto que com a linhagem celular V79 foi possível verificar uma maior toxicidade após tratamento com o produto ME1000 (ver Figura 32 e Quadro 7). É importante notar que as linhagens celulares usadas, ainda que sejam ambas de pulmão, possuem diferenças no que diz respeito aos organismos de origem, sendo a linhagem V79 células normais de pulmão de Hamster e a linhagem A549 células carcinogênicas de pulmão humano, e assim poderá existir uma diferença na resposta celular devido ao metabolismo diferenciado das linhagens.

5.6.8. Determinação do potencial de apoptose e necrose dos sistemas de emulsão múltipla A/O/A com partículas bacteriofágicas encapsuladas, por citometria de imagem (Tali[®])

A citometria de imagem Tali[®] baseia-se nas imagens das células e suas interações com os reagentes *Annexin V Alexa Fluor 488* (que tem afinidade para a fosfatidilserina) e iodeto de propídio (que tem afinidade para o DNA), tornando possível distinguir a porcentagem de células viáveis, células apoptóticas e células necróticas. Os resultados,

obtidos a partir das análises de tipo de morte celular, foram obtidos usando 10% da concentração dos produtos originais (ver Figura 33). Ainda que as células A549 tenham apresentado um valor de IC₅₀ superior àquele do das células V79, quando foram avaliadas com uma concentração de 10% dos produtos originais, apresentaram um baixo índice de viabilidade, com a grande maioria das células morrendo por necrose celular (ver Figura 33), exceto para o tratamento com o produto ME1000, o qual promoveu morte celular por apoptose em maior proporção. Os tratamentos realizados com a linhagem celular V79 promoveram um baixo índice de morte celular, com a grande maioria da morte celular ocorrendo por apoptose.

Figura 33. Índices relativos de necrose e apoptose celular em linhagens celulares A549 e V79 após tratamento com o placebo da suspensão bacteriofágica, com a suspensão concentrada de bacteriófago, com o placebo da emulsão múltipla (MEPLC) e com os sistemas de emulsão múltipla ME10 e ME1000, com concentrações fixadas a 10% dos valores iniciais. Os valores estão expressados como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.



Fonte: elaboração própria.

A partir dos resultados exibidos na Figura 33, pode concluir-se que os produtos estudados apresentam uma baixa citotoxicidade quando em concentrações inferiores a 10% daquela dos produtos originais (estoque). As diferentes linhagens celulares parecem responder de forma diferenciada aos tratamentos, no entanto são necessários mais estudos

de forma a assegurar que o produto (ME1000) é considerado seguro para aplicações terapêuticas, principalmente em relação às dosagens a serem utilizadas, e é importante lembrar nesta altura que este trabalho de pesquisa utilizou altas concentrações do produto. Tem também de ser considerado que, ainda que a suspensão concentrada de bacteriófago não tenha apresentado qualquer toxicidade celular, provando que a sua utilização é segura, e que o procedimento de nanoencapsulação resultou num produto (ME1000) que parece promover sofrimento celular durante as primeiras 24 h, é necessário verificar se a estabilidade celular é recuperada após este período inicial de tempo através de novas análises de viabilidade x tempo. Os resultados destas análises mostram que as células tratadas com os produtos exibiram uma baixa viabilidade celular, apresentando um total de células inferior àquele do controle negativo. As células tratadas com os produtos testados apresentaram um elevado índice de apoptose e necrose, o qual pode ser encontrado principalmente nos dados relativos exibidos na Figura 33. Os resultados mostram que a MEPLC tem efeito na viabilidade celular, assim como os produtos ME10 e ME1000, sendo possível usá-los em concentrações abaixo de 4% (v/v) (ME10) ou 1% (v/v) (ME1000), uma vez que estas foram as concentrações IC₅₀ encontradas para cada amostra testada.

5.7. Avaliação da estabilidade do sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, ao longo do período de armazenamento à 4 °C

Para avaliar a estabilidade do sistema de emulsão múltipla A/O/A durante o período de armazenamento, as emulsões múltiplas contendo 10 µL de bacteriófago encapsulado, 1000 µL de bacteriófago encapsulado e placebo, denominadas aqui, respectivamente, ME10, ME1000 e MEPLC foram mantidas a temperatura de refrigeração (4 °C) e, ao longo do período do estudo, foram analisadas por DLS para verificação da manutenção dos parâmetros de tamanho hidrodinâmico médio de partícula (HS), índice de polidispersão (PI) e potencial Zeta (ZP). A evolução temporal destes parâmetros, assim como dos valores de pH, pode ser visualizada na Figura 20.

Como se pode observar na Figura 20d, houve uma queda nos valores de pH da emulsão múltipla A/O/A ME10 e da emulsão múltipla placebo MEPLC, as quais já apresentavam um valor levemente mais ácido em comparação com o sistema de emulsão múltipla ME1000 recém preparada. Esta queda nos valores de pH se deu devido à ausência do efeito tamponante, presente na emulsão múltipla A/O/A ME1000, a qual foi preparada com um maior volume (1000 µL) de suspensão concentrada de bacteriófago, que na sua

composição inclui tampão fosfato. Para a emulsão múltipla A/O/A ME1000, a variação de pH ao longo do período de armazenamento foi menor, variando desde um valor inicial de pH de 6,40 até um valor de pH de 5,06 ao fim de 329 dias de armazenamento a 4 °C (ver Figura 20d). A variação de pH para o sistema de emulsão múltipla ME1000 foi pequena, demonstrando desta forma que existe a necessidade de utilização de um modificador tamponante para manter este parâmetro estável ao longo de um período de armazenamento.

Como se pode ver no Quadro 5 e na Figura 20, a produção de emulsões múltiplas A/O/A contendo quantidades variáveis de partículas bacteriofágicas encapsuladas, sob armazenamento a 4 °C pelo período de 329 dias, levou à manutenção de partículas bastante homogêneas, com variação nos índices de polidispersão entre 0,206 e 0,288 (ME10) e entre 0,208 e 0,308 (ME1000), variação nos valores médios de potencial Zeta entre -31,51 e -30,21 mV (ME10) e entre -30,18 e -37,17 mV (ME1000) e variação nos valores médios de tamanho hidrodinâmico de partícula entre 162 nm e 180 nm (ME10) e entre 189 nm e 182 nm (ME1000).

A atividade antimicrobiana do sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000, a qual apresentou eficácia antibacteriana *in vitro* no início do estudo (ver seção 5.6.5.), foi igualmente avaliada no final de um período de três meses de armazenamento a uma temperatura controlada de 4 °C, juntamente com a emulsão múltipla placebo (MEPLC, controle negativo), com a suspensão concentrada de bacteriófago (controle positivo) e com o placebo da suspensão fágica (controle negativo) (ver Figura 34). Foram utilizadas as técnicas de teste de atividade antimicrobiana do disco e da gota, descritas anteriormente na seção 4.2.5. dos Procedimentos experimentais.

Como é possível observar nas imagens das placas de cultura resultantes (ver Figura 34), a atividade antimicrobiana do sistema de emulsão múltipla ME1000 foi mantida, tanto ao fim de 3 meses como ao fim de 6 meses de armazenamento à 4 °C, demonstrando, desta forma, que o processo de nanoencapsulação das partículas bacteriofágicas em sistemas de emulsão múltipla do tipo A/O/A permitiu a estabilização estrutural e funcional das partículas víricas e manteve suas características fisiológicas líticas contra seu hospedeiro específico, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 34. Resultados dos testes de atividade antibacteriana realizados em cultura de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica do teste de halo em disco (a) e pela técnica do teste da gota (b), após 3 meses de armazenamento (A, ME1000; B, MEPLC; C, suspensão concentrada de bacteriófago; D, placebo da suspensão fágica preparado misturando LB-top ágar (4 mL) e tampão fágico (3 mL)), e (c) pela técnica do teste de halo em disco após 6 meses de armazenamento a 4 °C (A, 20 µL ME1000; B, 10 µL ME1000; C, 20 µL suspensão concentrada de bacteriófago; D, 20 µL MEPLC).



Fonte: elaboração própria.

5.8. Caracterização biológica das soluções salinas isotônicas formuladas com o sistema de emulsão múltipla A/O/A ME1000

5.8.1. Potencial antibacteriano das soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla A/O/A contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas

A emulsão múltipla A/O/A preparada com 1000 µL de suspensão concentrada de bacteriófago (ME1000) apresentou atividade antimicrobiana positiva tendo sido por isso eleita para a continuação do trabalho de pesquisa com a formulação do produto final, uma solução salina isotônica (NaCl, a 0,9% (m/v)) para administração via nebulização tendo como alvo o local da infecção.

Soluções isotônicas são soluções que têm a mesma tonicidade dos fluídos biológicos com os quais elas serão misturadas/contactadas, sendo geralmente consideradas equivalentes a uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (m/v). Devido às quantidades muito baixas (selecionadas de acordo com os resultados obtidos de IC50) de emulsão múltipla ME1000 adicionadas à solução salina, as misturas resultantes já eram naturalmente isotônicas e adequadas para administração por nebulização. Os resultados obtidos para as propriedades antibacterianas destas soluções isotônicas, formuladas com a emulsão múltipla ME1000, podem ser encontrados na Figura 35 para diferentes volumes incorporados com diferentes concentrações volumétricas, isto é, 0,3% (v/v) (**a** (500 μ L) e **b** (1000 μ L)), 0,6% (v/v) (**c** (500 μ L) e **d** (1000 μ L)), e 0,9% (v/v) (**e** (500 μ L) e **f** (1000 μ L)).

Como pode ser verificado por inspeção da Figura 35 (ver setas inseridas), diferentes padrões de lise foram produzidos quando as partículas fágicas foram encapsuladas (i) ou permaneceram em forma livre no sistema de emulsão múltipla ME1000 (ii), uma vez que a determinação da eficiência de encapsulação das partículas fágicas resultou em 89,2% do total de viriões oferecidos na formulação da emulsão múltipla ME1000, e a característica de agregação dos fagos livres já foi observada anteriormente neste trabalho através das análises morfológicas realizadas por MET, que demonstrou que os bacteriófagos livres tendem a permanecer juntos, aderidos aos debris da parede celular bacteriana (ver Figuras 31a, 31b, 31c, 31h e 31i). A ação lítica das partículas bacteriofágicas encapsuladas (ver Figura 35, i) sugere a migração das partículas bacteriofágicas aprisionadas na fase aquosa interna das nanovesículas lipídicas, para a fase aquosa externa, onde está a bactéria alvo, através da característica anfótera do tensoativo lecitina de soja que está presente na interface entre a fase aquosa e oleosa da emulsão primária A/O, mimetizando assim uma barreira biológica.

Uma vez que o volume normalmente projetado durante um jato de nebulização é da ordem de grandeza de 500 µL, e porque (pelo menos em teoria) uma única partícula fágica seria suficiente para erradicar completamente uma infecção bacteriana, todas as soluções isotônicas testadas seriam altamente eficazes na erradicação de uma infecção pulmonar bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 35. Atividade antimicrobiana das soluções isotônicas preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 encapsulando partículas bacteriofágicas, usando o teste antimicrobiano de incorporação. Resultados de atividade antibacteriana de 500 μL (a) e 1000 μL (b) da solução isotônica preparada com 30 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,3%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, de 500 μL (c) e 1000 μL (d) da solução isotônica preparada com 60 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,6%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, 500 μL (f) da solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução isotônica preparada com 90 μL de ME1000 em 10 mL de solução salina estéril (0,9%, v/v) com cultura de *Pseudomonas aeruginosa*. As setas inseridas identificam os halos de lise produzidos por partículas fágicas encapsuladas (i) ou por partículas fágicas livres (ii).



Fonte: elaboração própria.

5.8.2. Determinação do potencial de citotoxicidade das soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, pelo ensaio MTT

Os primeiros ensaios de citotoxicidade realizados ao sistema de emulsão múltipla ME1000 retornaram uma concentração em torno de 1,0% (v/v) para administração segura da emulsão múltipla contendo partículas fágicas encapsuladas.

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos das soluções isotônicas preparadas com diferentes porcentagens volumétricas do sistema de emulsão múltipla ME1000 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas sobre a viabilidade celular, três soluções isotônicas foram avaliadas usando diferentes concentrações volumétricas de ME1000. Os dados de viabilidade celular obtidos após exposição a estas soluções isotônicas podem ser encontrados na Figura 36 para as três linhagens celulares avaliadas.

Figura 36. Resultados dos testes de viabilidade celular (via ensaios MTT) usando as linhagens celulares V79, 3T3 e A549 cultivadas em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade das soluções isotônicas preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 às concentrações de 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), durante um período de tratamento de 24 h a diferentes concentrações. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.



Fonte: elaboração própria.

Quando se testou a viabilidade da solução estoque concentrada de ME1000, verificouse que concentrações entre 3% a 9% (v/v) exibiram uma boa viabilidade celular para as diferentes linhagens celulares, e por isso novas soluções salinas foram preparadas a concentrações de 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v) por forma a serem testadas em relação aos seus potenciais efeitos sobre a viabilidade celular, ou por análises MTT ou por citometria de imagem. Para as análises MTT, as soluções salinas (isotônicas) foram diluídas para 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% e 1% (v/v) e, para a viabilidade celular, necrose e apoptose, as soluções salinas foram sempre testadas a uma concentração de 30% (v/v). Os resultados obtidos (ver Figura 36) mostram que, nesta concentração, as diferentes linhagens celulares não apresentaram morte celular acima de 50%, com o tipo de célula mais sensível sendo a V79, a qual, a uma concentração de 35% (v/v) das soluções isotônicas exibiu 50% de morte celular tal como medido por este método colorimétrico.

5.8.3. Determinação do potencial de apoptose e necrose das soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, via citometria de imagem (Tali[®])

Os resultados obtidos pela técnica de citometria de imagem (ver Figura 37) mostram claramente que, quando testadas a 30% (v/v) das diferentes concentrações das soluções salinas isotônicas, as células exibiram uma elevada viabilidade não apenas nas linhagens 3T3 e A549, mas também nas restantes linhagens celulares estudadas. É possível observar que a maior parte das mortes celulares na linhagem V79 ocorre devido a necrose e não devido a indução por apoptose celular, e nas linhagens celulares 3T3 e A549 é possível observar um equilíbrio entre os dois tipos de morte celular (ver Figura 37).

Figura 37. Índices de necrose e apoptose celular nas linhagens celulares V79, 3T3 e A549, após tratamento com as soluções isotônicas preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5), com desvios padrão inferiores a 0,1 em todos os casos.



Fonte: elaboração própria.

Com base nos resultados obtidos relativamente aos testes de viabilidade celular (tanto por MTT como por citometria de imagem), é possível argumentar que as soluções isotônicas testadas exibiram uma boa viabilidade celular através de uma baixa toxicidade celular.

5.8.4. Determinação do potencial de estresse oxidativo das soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000

Os possíveis efeitos de estresse oxidativo das soluções isotônicas preparadas com diferentes percentagens volumétricas do sistema de emulsão múltipla ME1000 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas encontram-se na Figura 38 para as três linhagens celulares avaliadas, na forma de índices relativos de estresse. Figura 38. Índices relativos de estresse das linhagens celulares V79, 3T3 e A549 após o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com as soluções isotônicas (IS) preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% (v/v) dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de cinco determinações (n=5; Análise estatística Two-Way ANOVA ao nível de significância de 5%), com aqueles resultados estatisticamente diferentes dos do controle marcados com '*'. Os valores estão expressados como médias de três determinações (n=3), com desvios padrão associados (σ): V79 (controle, 1,0000±0,6000; IS@0,3%, 15,1470±1,0000; IS@0,6%, 9,9125±0,3000; IS@0,9%, 7,4917±2,0000),
A549 (controle, 1,0000±0,7000; IS@0,3%, 9,7683±0,1900; IS@0,6%, 9,1681±0,0900; IS@0,9%, 10,0354±0,1600), 3T3 (controle, 1,0000±0,9000; IS@0,3%, 7,3400±0,1600; IS@0,6%, 6,9200±0,3000; IS@0,9%, 8,7650±1,5400).



Fonte: elaboração própria.

Os testes de estresse oxidativo realizados revelaram que o tratamento das células com todas as soluções isotônicas resultou em níveis de estresse celular significativamente mais elevados do que o do controle positivo (análise estatística Two-Way ANOVA ao nível de significância de 5%, com aqueles resultados estatisticamente diferentes dos do controle marcados com '*'), existindo pequenas variações entre linhagens celulares (ver Figura 38). Em geral, um aumento no estresse oxidativo reflete-se em níveis mais elevados de apoptose celular, o que é possível verificar neste trabalho de pesquisa quando se comparam os resultados obtidos nas análises de estresse oxidativo com os resultados de apoptose/necrose, permitindo observar claramente um aumento na apoptose das células da linhagem celular V79, principalmente com a solução isotônica a uma concentração de 0,3% (v/v) (ver Figura 38).

5.8.5. Determinação do potencial de danos ao DNA (genotoxicidade) das soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, via ensaio Cometa™

Neste trabalho de pesquisa, os efeitos genotóxicos das soluções isotônicas integrando quantidades variáveis do sistema de emulsão múltipla ME1000 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas, em linhagens celulares de pulmão, foram avaliados pelo ensaio Cometa[™], o qual detecta quebras no DNA após qualquer dano, ou direto induzido pela emulsão múltipla ME1000, ou efeitos de dano indiretos ligados ao processo de reparação do DNA. Na verdade, o ensaio Cometa[™] é capaz de detectar quantitativamente o dano ao DNA causado por agentes alquilantes ou oxidantes e intercalantes. Para avaliar quaisquer possíveis danos genéticos às células conferidos pelas soluções isotônicas salinas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000, o ensaio Cometa[™] foi realizado com linhagens celulares de pulmão (V79 e A549), permitindo observar diferenças não significativas entre o controle e as linhagens celulares de pulmão que foram expostas às soluções isotônicas (ver Figura 39).

Figura 39. Índices de dano ao DNA das linhagens celulares de pulmão V79 e A549 após exposição às soluções isotônicas (IS) preparadas com o sistema de emulsão múltipla ME1000 a 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v), com concentrações fixadas a 30% dos valores iniciais. Os valores estão expressos como médias de três determinações (n=3), com desvios padrão associados (σ): V79 (controle, 1,0000±0,1296; IS@0,3%, 0,6000±0,0502; IS@0,6%, 0,7000±0,0003; IS@0,9%, 1,3600±0,2380), A549 (controle, 1,0000±0,0231; IS@0,3%, 1,1000±0,0002; IS@0,6%, 0,9200±0,0365; IS@0,9%, 0,8700±0,0595).



Fonte: elaboração própria.

Isto significa que as soluções isotônicas testadas não possuem características que promovam lesões ao DNA. No entanto, o ensaio Cometa™ é realizado com uma exposição celular de 1 h, porque é um procedimento pré-teste sem a necessidade de quaisquer divisões celulares. Comparando-se estes resultados com os resultados gerados tanto pelas análises de estresse oxidativo como pelas determinações de apoptose/necrose, é possível observar que as linhagens celulares de pulmão V79 e A549 não exibiram um elevado índice de apoptose, ainda que sinalizando um aumento no estresse oxidativo em relação àquele do controle. A Figura 39 representa os efeitos genotóxicos (índice de dano ao DNA) das linhagens celulares de pulmão V79 e A549 incubadas com as soluções isotônicas integrando quantidades variáveis do sistema de emulsão múltipla ME1000 contendo partículas bacteriofágicas encapsuladas. Para as linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano (A549) e pulmão normal de hamster Chinês (V79), as soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000 não mostraram efeitos genotóxicos significativos às três concentrações de ME1000 testadas (isto é, 0,3%, 0,6% e 0,9%, v/v). Estes resultados estão em clara concordância com a ausência de efeitos citotóxicos observados para ambas as linhagens celulares (ver Figura 36). Assim, a ausência de efeitos citotóxicos está em linha com a ausência de danos ao DNA (SEABRA et al., 2014), como se pode comprovar pela pontuação abaixo de 2 em todos os resultados obtidos (ver Figura 39).

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho de pesquisa, o desenvolvimento de nanovesículas lipídicas com núcleo aquoso contendo partículas bacteriofágicas aprisionadas, integrando uma formulação de emulsão múltipla, foi proposto visando a incorporação em uma solução isotônica direcionada para o tratamento por nebulização de infecções pulmonares bacterianas. Um lipídeo com baixa temperatura de fusão foi considerado o mais adequado para a fase oleosa descontínua. Não foi observada qualquer separação de fases no sistema de emulsão múltipla selecionado, o qual se manteve estável sob temperaturas de refrigeração.

Em sistemas de emulsão múltipla do tipo A/O/A, tais como os desenvolvidos neste trabalho de pesquisa, existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o comprimento da cadeia carbonada de ácido graxo e uma correlação negativa com a constante dielétrica do emulsificante. Aumentando o peso molecular (tal como no Softisan100[™]) e diminuindo a constante dielétrica (tal como no Tween80[™]) indica uma maior hidrofobicidade, levando a uma maior impregnação da interface e, por isso, a uma emulsão múltipla mais estável. Uma importante contribuição para esta elevada estabilidade foi, muito provavelmente, os valores altamente negativos do potencial Zeta obtidos para o sistema de emulsão múltipla ME1000, promovendo repulsão eletrônica das partículas e mantendo-as em suspensão, também corroborada pelo coeficiente de difusão calculado para as nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão múltipla, isto é, 2,607x10⁻¹² m².s⁻¹, uma ordem de grandeza relacionada com a estabilidade de uma emulsão múltipla.

Adicionalmente, o aprisionamento de entidades proteínas bioativas (tais como as partículas bacteriofágicas) promove uma alteração nas condições termodinâmicas do nanoambiente ao redor de cada partícula devido ao fato de que os movimentos das moléculas de solvente (aquoso) na sua microvizinhança ficam seriamente reduzidos pelo efeito de estarem contidos no inteior do núcleo aquoso da matriz, levando assim a uma estabilidade termodinâmica aumentada. O resultado final é uma potenciação da viscosidade rotacional, translacional e vibracional da partícula fágica, promovendo uma arquitetura tridimensional mais rígida da partícula com concomitante diminuição da entropia e promovendo, assim, a sua estabilização estrutural e funcional (BALCÃO et al., 2013a,b; BALCÃO et al., 2014; BALCÃO; VILA, 2015).

A emulsão múltipla ME1000, assim como as soluções salinas isotônicas preparadas com 0,3%, 0,6% e 0,9% (v/v) da emulsão múltipla ME1000, apresentaram atividade antibacteriana positiva, mesmo após um período de armazenamento de quase um ano, demonstrando assim que a formulação de emulsão múltipla A/O/A manteve a estabilidade

estrutural e funcional da entidade proteica e promoveu a manutenção da atividade lítica contra a bactéria hospedeira *Pseudomonas aeruginosa*. Para as linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano (A549) e células normais de pulmão de hamster Chinês (V79), as soluções isotônicas integrando o sistema de emulsão múltipla ME1000 não mostraram efeitos genotóxicos significativos às três concentrações de ME1000 testadas, o que está em clara concordância com a ausência de efeitos citotóxicos observados para ambas as linhas celulares, nos testes de viabilidade celular.

O uso do sistema de emulsão múltipla ME1000 na formulação de soluções isotônicas para administração por nebulização no tratamento de infecções pulmonares bacterianas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* apresentaria vantagens importantes inerentes, quando comparado com as formulações antimicrobianas químicas atuais, pois bacteriófagos específicos e estritamente líticos são predadores naturais das bactérias e auto-replicantes, sendo virtualmente inofensivos para as células e tecidos humanos. Desta forma, apresentam-se como uma alternativa altamente viável no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos químicos convencionais.

A Figura 40 apresenta um resumo gráfico do trabalho de pesquisa aqui descrito, culminando na verificação da manutenção da atividade lítica das partículas bacteriofágicas aprisionadas no núcleo aquoso interno das nanovesículas lipídicas integrantes da emulsão múltipla A/O/A desevolvida.



Figura 40. Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.

Fonte: elaboração própria.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Ainda que o trabalho de pesquisa desenvolvido tenha seguido uma evolução natural (e sequencial), permitindo retirar algumas principais (e complementares) conclusões, uma visão mais profunda deve ser adquirida em relação à caracterização do produto final desenvolvido, isto é, a formulação isotônica. Este capítulo apresenta, sucintamente, uma série de áreas potencialmente frutíferas para pesquisa num futuro próximo, abrangendo estudos que vão um pouco mais além e que partem daqueles apresentados até agora nesta dissertação.

Não obstante o fato de que esta dissertação tenha tentado consistentemente e compreensivamente caracterizar um novo produto (solução isotônica formulada com uma emulsão múltipla do tipo A/O/A) e o correspondente processo de produção (homogeneização de alta velocidade de agitação em duas etapas), existe um número de áreas que fazem interface, mais ou menos diretamente, com aquelas e que se espera conduzam a uma melhor compreensão e a um *design* mais racional.

O estudo da propagação das partículas bacteriofágicas deveria ser complementado e validado via repetição do trabalho desenvolvido mas isolando e propagando bacteriófagos a partir de fontes naturais (águas de esgoto, efluentes hospitalares, águas de rio), purificando extensivamente as partículas fágicas e avaliando a sua (potencial) toxicidade, com remoção de partículas fágicas lisogênicas e endotoxinas bacterianas.

O estudo de atividade lítica poderia ser estendido via repetição do trabalho de pesquisa realizado com vários isolados clínicos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Avaliação das características reológicas das formulações isotônicas com concentrações volumétricas variáveis do sistema de emulsão múltipla desenvolvido, bem como caracterização da distribuição e estrutura das nanovesículas lipídicas por ressonância magnética nuclear, seguido de tentativas para correlacioná-las uma com a outra.

Avaliar o perfil de deposição das nanovesículas lipídicas em função da pressão e do volume do jato de nebulização, avaliando o efeito da pressão na manutenção das características líticas das partículas bacteriofágicas.

Em adição aos testes de atividade antibacteriana *in vitro*, a avaliação da atividade antibacteriana *in vivo* usando modelos animais seria crucial para aferir a eficácia do produto desenvolvido.

A propagação de partículas bacteriofágicas com um fermentador à escala piloto usando vários isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, e a produção de um coquetel

de partículas bacteriofágicas estritamente líticas justificariam (e possivelmente confirmariam) as conclusões apresentadas neste trabalho e forneceriam uma base mais sólida para a análise da economia do processo.

Adicionalmente, e porque o nanosistema desenvolvido integra nanovesículas lipídicas compartimentadas com nucleo aquoso contendo entidades proteicas hidrofílicas (partículas fágicas) aprisionadas, poder-se-ia avaliar o potencial de aprisionamento simultâneo de peptídeos antimicrobianos (hidrofílicos/hidrofóbicos) na camada oleosa que apresentassem atividade sinérgica com as partículas fágicas, como por exemplo a β -defensina-3 humana (HbetaD-3).

Finalmente, a estabilização da formulação isotônica para armazenamento à temperatura ambiente e a avaliação econômica do processo agregaria valor ao trabalho desenvolvido até ao momento.

REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. The Bacteriophages, Richard Calendar (Ed.), 2nd edition, ISBN-13: 978-0-19-514850-3, Oxford University Press, 2006.

ABEDON, S. T.; KUHL, S. J.; BLASDEL, B. G.; KUTTER, E. M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66-85. 2011.

ACKERMANN, H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. Archives of Virology, v. 152, n. 2, p.227-243. 2007.

ALVES, L. N. S.; OLIVEIRA, C. R.; SILVA, L. A. P.; GERVÁSIO, S. M. D.; ALVES, S. R.; SGAVIOLI, G. M. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em Unidade de Terapia Intensiva. **Journal of the Health Sciences Institute**. v. 30, n. 1, p. 44-47. 2012.

ASHWORTH, J. M. Outline studies in biology: Cell differentiation. 1. Ed. Londres: Chapman and Hall, 1973.

ATTERBURY, R. J. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 601-612. 2009.

BALCÃO, V. M.; AMORIM, L. R. Biotecnologia – Protocolos Laboratoriais para Ciências da Saúde [Biotechnology – Laboratory Protocols for Health Sciences], Fundação Fernando Pessoa Publishers, Porto, Portugal, 108 pps (manual) + 20 pps (exercise book). 2012.

BALCÃO, V. M.; AZEVEDO, A. F.; CASTRO, L. M.; COSTA, C. I.; SANTOS, S.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; TEIXEIRA, J. A.; AZEREDO, J. C. Design of a lipid nanovesicle system encapsulating bacteriophages integrated in a multiple emulsion formulation: a proof-of-concept. Nanotech 2010 (Technical Proceedings of the 2010 NSTI Nanotechnology Conference & Expo, June 21-24, 2010, Anaheim CA, USA, In Chapter 7: Nano Medical Sciences; NSTI-Nanotech 2010, vol. 3, p. 459 – 462. 2010.

BALCÃO, V. M.; BARREIRA, S. V. P.; NUNES, T. M.; CHAUD, M. V.; TUBINO, M.; VILA, M. M. D. C. Carbohydrate hydrogels with stabilized phage particles for bacterial biosensing: bacterium diffusion studies. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172 n. 3, p. 1194-1214. 2014a.

BALCÃO, V. M.; COSTA, C. I.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; AMORIM, M.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. P.; VILA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 425-431. 2013b.

BALCÃO, V. M.; GLASSER, C. A.; CHAUD, M. V.; DEL FIOL, F. S.; TUBINO, M.; VILA, M.
M. D. C. Biomimetic aqueous-core lipid nanoballoons integrating a multiple emulsion formulation: a suitable housing system for viable lytic bacteriophages. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 123, p. 478-485. 2014b.

BALCÃO, V. M.; GLASSER, C. A.; CHAUD, M. V.; VILA, M. M. D. C. Water-in-Oil-in-Water nanoencapsulation systems, In: SAGIS, L. (Ed.). **Microencapsulation and Microspheres for Food Applications**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015.

BALCÃO, V. M.; MOREIRA, A. R.; MOUTINHO, C. G.; CHAUD, M. V.; TUBINO, M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of phage particles in carbohydrate matrices for bacterial biosensing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 55-69. 2013a.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 25-41. 2015

BALOGH, B.; JONES, J. B.; IRIARTE, F. B.; MOMOL, M. T. Phage therapy for plant disease control. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 48-57. 2010.

BOGOVAZOVA, G. G.; VOROSHILOVA, N. N.; BONDARENKO, V. M.; GORBATKOVA, G. A.; AFANAS'EVA, E. V.; KAZAKOVA, T. B.; SMIRNOV, V. D.; MAMLEEVA, A. G.; GLUKHAREV, I. A.; ERASTOVA, E. I.; KRYLOV, I. A.; OVCHERENKO, T. M.; BATURO, A. P.; YALSYK, G. V.; AREFYEVA, N. A. Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from Klebsiella bacteriophages. **Zhurnal Mikrobiologii**, **Epidemiologii**, **i Immunobiologii**, v. 3, p. 30-33. 1992.

BRADLEY, J. S. Old and new antibiotics for pediatric pneumonia. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 17, n. 1, p. 57-64, mar. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 20 de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

BROXMEYER, L.; SOSNOWSKA, D.; MILTNER, E.; CHACÓN, O.; WAGNER, D.; MCGARVEY, J.; BARLETTA, R. G.; BERMUDEZ, L. E. Killing of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracelular bacterial pathogens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1155-1160, set. 2002.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 379-402, jul. 2007.

CAMNER, P. Clearance of particles from the human tracheobronchial tree. **Clinical Science**, Londres, n. 59, p. 79-84, ago.1980.

CARLTON, R. M. Phage therapy: past history and future prospects. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, Nova York, v. 47, n. 5, p. 267-274. 1999.

CARMODY, L. A.; GILL, J. J.; SUMMER, E. J.; SAJJAN, U. S.; GONZALEZ, C. F.; YOUNG, R. F.; LIPUMA, J. J. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of Burkholderia cenocepacia pulmonary infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 2, p. 264-271. 2009.

CHAN, B. K., ABEDON, S. T., LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 769–783. 2013.

CHERNOMORDIK, A. B. Bacteriophage and their therapeutic-prophylatic use. **Meditsinskaia Sestra**, v. 48, n. 6, p. 44-47. 1989.

CHHIBBER, S.; KAUR, S.; KUMARI, S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating Klebsiella pneumoniae B5055-mediated lobar pneumonia in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p.1508-1513. 2008.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.1, p.7-13. 2005.

DAVEY, P.; BROWN, E.; FENELON, L.; FINCH, R.; GOULD, I.; HOLMES, A.; RAMSAY, C.; TAYLOR, E.; WIFFEN, P.; WILCOX, M. Systematic review of antimicrobial drug prescribing in hospitals. **Emerging Infections Diseases**, v. 12, n.2, p. 211-216. 2006.

DAVIS S. S.; WALKER, I. M. Multiple emulsions as targetable delivery systems. **Methods in Enzymology**, v. 149, p. 51–64. 1987.

DAY, L.A.; WISEMAN, R.L. A comparison of DNA packaging in the virions of fd, Xf, and Pf1, In: DENHARDT, D.T.; DRESSLER, D.; RAY, D.S. (Eds.). **The Single-Stranded DNA Phages,** Nova York: Cold Spring Harbor, p. 605-625. 1978.

DEBARBIEUX, L.; LEDUC, D.; MAURA, D.; MORELLO, E.; CRISCUOLO, A.; GROSSI, O.; BALLOY, V.; TOUQUI, L. Bacteriophages can treat and prevent Pseudomonas aeruginosa lung infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 7, p.1096-1104. 2010.

des GEORGES, A.; HASHEM, Y.; BUSS, S. N.; JOSSINET, F.; ZHANG, Q.; LIAO, H. Y.; FU, J.; JOBE, A.; GRASSUCCI, R. A. LANGLOIS, R.; BAJAJ, C.; WESTHOF, E.; MADISON-ANTENUCCI, S.; FRANK, J. High-resolution cryo-EM structure of the Trypanosoma brucei Ribosome: a case study, In: Gabor T. Herman and Joachim Frank (Eds.) **Computational Methods for Three-Dimensional Microscopy Reconstruction**, capítulo 5, p. 97-132, Birkhäuser. 2014.

DEVARAJAN, V.; RAVICHANDRAN, V. Nanoemulsions as modified drug delivery tool. **Pharmacie globale - International Journal of Comprehensive Pharmacy**, vol. 2, n. 4, p. 1-6, abr. 2011.

EDGAR, R.; FRIEDMAN, N.; MOLSHANSKI-MOR, S.; QIMRON, U. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 744-751. 2012.

ESCHENBACHER, W. L.; BOUSHEY, H. A.; SHEPPARD, D. Alteration in osmolarity of inhaled aerosols causes bronchoconstriction and cough, but absence of a permeant anion causes cough alone. **The American review of respiratory disease**, v. 129, n. 2, p. 211-215. 1984.

EL SOLH, A.; ALHAJHUSAIN, A.A. Update on the treatment of Pseudomonas pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, p. 229–238, jun. 2009.

ESCOBAR-PARAMO, P.; GOUGAT-BARBERA, C.; HOCHBERG, M. E. Evolutionary dynamics of separate and combined exposure of Pseudomonas fluorescens SBW25 to antibiotics and bacteriophage. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 6, p. 583-592. 2012.

FELDMAN, C. Pneumonia in the elderly. **The Medical clinics of North America**, v. 85, n. 6, p. 1441-1459, nov. 2001.

FILE JR, T. J. Community-acquired pneumonia: New guidelines for management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 161-164, abr. 2001.

FLAHERBY, J. P.; WEINSTEIN, R. A. Nosocomial infections caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, p. 236-248. 1996.

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, p. 493-518, mai. 2012.

FURTADO, G. H. C.; BERGAMASCO, M. D.; MENEZES, F. G.; MARQUES, D.; SILVA, A.; PERDIZ, L. B.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. **Journal of Critical Care,** v. 24, p. 625.e9-625.e14, dez. 2009.

GLASSER, C. Otimização da metodologia de preparação de emulsões do tipo A/O/A integrando nanogotas lipídicas com núcleo aquoso, para estabilização proteica. 207 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmcêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2016.
GLASSER C. A.; VILA, M. M. D. C.; PEREIRA, J. C.; CHAUD, M. V.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. M.; TUBINO, M.; BALCÃO, V. M. Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization: Part I: experimental factorial design. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 65-74. 2016a.

GLASSER C. A.; VILA, M. M. D. C.; PEREIRA, J. C.; CHAUD, M. V.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. M.; TUBINO, M.; BALCÃO, V. M. Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part II: process and product characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy** (ISSN: 0363-9045). [http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2016.1188109]. 2016b.

GOLSHAHI, L.; SEED, K. D.; DENNIS, J. J.; FINLAY, W. H. Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of Burkholderia cepacia complex. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 21, n. 4, p. 351-360, dez. 2008.

HAGENS, S.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n.1, p. 58-68. 2010.

HALM, E. A.; TEIRSTEIN, A. S. Clinical practice. Management of community-acquired pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2039-2045, dez. 2002.

HANLON, G. W. Bacteriophages: An appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal oh Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 118-128, ago. 2007.

HANSON, J. A.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M.; LI, Z.; MASON, T. G.; DEMING, T. J. Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides. **Nature**, v. 455, p. 85-88, set. 2008.

HERMOSO, J. A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, P. Taking aim on bacterial pathogens: From phage therapy to enzybiotics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 461-472. 2007.

HORHOTA, S.T.; SAIM, S. Supercritical fluid extraction of mould lubricant from hard shell capsules. US Patent 6228394 (B1), 21 set. 1998, 08 mai. 2001. Disponível em: < https://www.google.ch/patents/US6228394>. Acesso em: 17 set. 2016.

HOUSBY, J. N.; MANN, N. H. Phage therapy. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 11-12, p.536-540. 2009.

HUNG, C. H.; KUO, C. F.; WANG, C.H.; WU, C. M.; TSAO, N. Experimental phage therapy in treating Klebsiella pneumoniae-mediated liver abscesses and bacterimia in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p.1358-1365. 2011.

HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, p. 217-248, mar. 2010.

Imagem: Ciclo de vida dos bacteriófagos. Disponível em < http://www2.bc.cc.ca.us/ bio16/images/lyticcycle.jpg>.Acesso em: 01 jun. 2016.

Imagem: Mecanismo de ação dos bacteriófagos líticos. Disponível em < http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24064/ch06.html>. Acesso em: 01 jun. 2016.

INNOPHAGE, Ltd.: Innovative Bacteriophage Solutions. Disponível em: <<u>http://www.innophage.com/</u>>. Acesso em 01 mar. 2016.

INTRALYTIX Inc.: Safety by Nature. Disponível em: <<u>http://www.intralytix.com/</u>>. Acesso em 01 mar. 2016.

JOŃCZYK, E.; KLAK, M.; MIEDZYBRODZKI, R.; GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 3, p.191-200. 2011.

KATAYAMA, K.; NOMURA, H.; OGATA, H.; EITOKU, T. Diffusion coefficients for nanoparticles under flow and stop-flow conditions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 10494-10499, set. 2009.

KUTTER, E.; DE VOS, D.; GVASALIA, G.; ALAVIDZE, Z.; GOGOKHIA, L.; KUHL, S.; ABEDON, S. T. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n.1, p.69-86. 2010.

KVACHADZE L.; BALARJISHVILI, N.; MESKHI, T.; TEVDORADZE, E.; SKHIRTLADZE, N.; PATARIDZE, T.; ADAMIA, R.; TOPURIA, T.; KUTTER, E.; ROHDE, C.; KUTATELADZE, M. Evaluation lytic activity of staphylococcal bacteriophage against freshly isolated clinical pathogens. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 643-50. 2011.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, pp. 600–612, 2003.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, mar. 2010.

LAMB, H. M.; ORMROD, D.; SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Ceftriaxone: An update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. **Drugs**, v. 62, n. 7, p. 1041-1089, mai. 2002.

LEVIN, B. R.; BULL, J. J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p.166–173. 2004.

LIMPER AH. Overview of Pneumonia. In: GOLDMAN L.; AUSIELLO D. **Goldman's Cecil Medicine**. 23° edição, capítulo 97: Philadelphia, Pa: Saunders. 2007.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases,** Londres, v. 36(Sup. 1), p. 11–23. 2003.

LU, T. K., COLLINS, J. J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n.12, p. 4629-4634. 2009.

MASON, C.; NELSON, S. Pulmonary host defences: Implications for therapy. **Clinics in Chest Medicine**, v. 20, n. 3, p. 475-488, set. 1999.

MAURA, D.; DEBARBIEUX, L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p.851-859. 2011.

McGANN, P.; SNESRUD, E.; MAYBANK, R.; COREY, B.; ONG, A. C.; CLIFFORD, R.; HINKLE, M.; WHITMAN, T.; LESHO, E.; SCHAECHER, K. E. Escherichia coli Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of mcr-1 in the USA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 60, n. 6, Jun. 2016. Disponível em: <<u>http://aac.asm.org/content/early/2016/05/25/AAC.01103-16.long</u>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

MERABISHVILI, M.; PIRNAY, J. P.; VERBEKEN, G.; CHANISHVILI, N.; TEDIASHVILI, M.; LASHKHI, N.; GLONTI, T.; KRYLOV, V.; MAST, J.; VAN PARYS, L.; LAVIGNE, R.; VOLCKAERT, G.; MATTHEUS, W.; VERWEEN, G.; DE CORTE, P.; ROSE, T.; JENNES, S.; ZIZI, M.; DE VOS, D.; VANEECHOUTTE, M. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. **Public Library of Science Medicine ONE**, Estados Unidos, v. 4, n. 3, p. e4944. 2009.

MILLER, E. S.; KUTTER, E.; MOSIG, G.; ARISAKA, F.; KUNISAWA, T.; RÜGER, W.; Bacteriophage T4 Genome. **Microbiologyand Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 86-156. 2003.

MORELLO, E.; SAUSSEREAU, E.; MAURA, D.; HUERRE, M.; TOUQUI, L.; DEBARBIEUX, L. Pulmonary bacteriophage therapy on Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. **Public Library of Science ONE**, v. 6, n. 2, p. e16963. 2011.

NAKOU, A.; WOODHEAD, M.; TORRES, A. MRSA as a cause of community-aquired pneumonia. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 5, p. 1013-1014. 2009.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R. P.; MEANEY, W.; FITZGERALD, G. F.; ELBREKI, M. F.; COFFEY, A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p.1836-1842. 2005.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R.P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 801-819. 2009.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsions: structure and application as drug delivery systems. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138. 2004.

PARRACHO, H. M.; BURROWES, B. H.; ENRIGHT, M. C.; MCCONVILLE, M. L.; HARPER, D. R. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 6, p.279-286. 2012.

PAYS, K.; GIERMANSKA-KAHN, J.; POULIGNY, B.; BIBETTE, J.; LEAL-CALDERON, F. Double emulsions: how does release occur? **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1-3, p. 193-205, fev. 2002.

PELGRIFT, R. Y., FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug delivery Reviews**, EUA, v.65, p. 1803-1815. 2013.

PEREPANOVA, T. S.; DARBEEVA, O. S.; KOTLIAROVA, G. A.; KONDRAT'EVA, E. M.; MAĬSKAIA, L. M.; MALYSHEVA, V. F.; BAĬGUZINA, F. A.; GRISHKOVA, N. V. The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflamatory urologic diseases. **Urologiia i Nefrologiia**, Moscou, v. 5, p. 14-17. 1995.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Development and evaluation of O/W/O multiple emulsions stability containing pequi oil (Caryocar brasiliense). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 155-159. 2008.

PINA, E.; SILVA, M. G.; SILVA, E. G.; UVA, A. S. Infecção relacionada com a prestação de cuidados de saúde: infecções da corrente sanguínea (septicemia). **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Lisboa, v. 28, n. 1, p. 19-30. 2010a.

PINA, E.; FERREIRA, E.; MARQUES, A.; MATOS, B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Lisboa, v. 10, p. 27-39, set. 2010b.

PIRNAY, J.; DE VOS, D.; VERBEKEN, G.; MERABISHVILI, M.; CHANISHVILI, N.; VANEECHOUTTE, M.; ZIZI, M.; LAIRE, G.; LAVIGNE, R.; HUYS, I.; VAN DEN MOOTER, G.; BUCKLING, A.; DEBARBIEUX, L.; POUILLOT, F.; AZEREDO, J.; KUTTER, E.; DUBLANCHET, A.; GÓRSKI, A.; ADAMIA, R. The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure?. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 4, p. 934-937. 2011.

PIRNAY, J.; VERBEKEN, G.; ROSE, T.; JENNES, S.; ZIZI, M.; HUYS, I.; LAVIGNE, R.; MERABISHVILI, M.; VANEECHOUTTE, M.; BUCKLING, A.; DE VOS, D. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. **Future Virology**, v. 7, n.4, p. 379-390. 2012.

POTERA, C. Phage Renaissance: new hope against antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 2, p. 48-53. 2013.

POUILLOT, F.; BLOIS, H.; IRIS, F. Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria. **Biosecurity and Bioterrorism**, v. 8, n. 2, p. 155-169. 2010.

PUAPERMPOONSIRI, U.; SPENCER, J.; VAN DER WALLE, C. F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. **European** Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 72, p. 26–33, mai. 2009.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. in: Rang & Dale FARMACOLOGIA, 8^a. Ed., Elsevier, 2016 (ISBN: 9788535283433).

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; KUSKOWSKI, M. A.; WOLCOTT, B. M.; WARD, L. S.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. **Journal of Wound Care**, v. 18, n. 6, p.237-238. 2009.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, mai. 2011.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; NISSING, C.; RUNKEL, F. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 184-192, Out. 2009.

SCHULLER, R.; ROMANOWSKY, P. Understanding emulsions. **Cosmetic & Toiletries**, v. 113, p. 39-44. 1998.

SCHULTZ, N.; METREVELI, G.; FRANZREB, M.; FRIMMEL, F. H.; SYLDATK, C. Zeta potential measurements as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 39-44, out. 2008.

SCHWARZ, J. C.; KLANG, V.; KARALL, S.; MAHRHAUSER, D.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of aciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 69-75, dez. 2012.

SEABRA, A. B.; PASQUÔTO, T.; FERRARINI, A. C.; SANTOS, M. C.; HADDAD, P. S.; LIMA, R. Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolatedand s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment, **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1207-1218. 2014.

SEMLER, D. D.; GOUDIE, A. D.; FINLAY, W. H.; DENNIS, J. J. Aerosol Phage Therapy Efficacy in *Burkholderia* cepacia Complex Respiratory Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, abr. 2014. Disponível em: <<u>http://aac.asm.org/content/</u>58/7/4005.full>. Acesso em: 12 jun. 2016.

SEVERINO P.; SANTANA M. H. A.; MALMONGE S. M.; SOUTO E. B. Polymers for drug delivery systems formulations. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p.361-368, 2011.

SIGWARD, E.; MIGNET, N.; RAT, P.; DUTOT, M.; MUHAMED, S.; GUIGNER, J. M.; SCHERMAN, D.; BROSSARD, D.; CRAUSTE-MANCIET, S. Formulation and cytotoxicity evaluation of new self-emulsifying multiple W/O/W nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 611-625, fev. 2013.

SINGH, Y. D. Pathophysiology of Community Acquired Pneumonia. **Supplement to JAPI** (Journal of the Association of Physicians of India), Índia, v. 60, p. 07-09, jan. 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis, 6th ed., Canada: Thomson. 2007.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 1, p. 5-14. 2006.

SLIGL W. I.; MARRIE T. J. Severe Community-Acquired Pneumonia. **Critical Care Clinics**, v. 29, n. 3, p. 563-601, jul. 2013.

SMITH, G. P. Phage-Display Vectors and Libraries Based on Filamentous Phage Strain fdtet. Disponível em: http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplay Website/PhageDisplayWebsiteIndex.html>. Acesso em: 31 mai. 2015

SOTO, C. M.; RATNA, B. R. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n.4, p. 426-438. 2010.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; GLENN M. Jr., J. Bacteriophage Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n.3, p. 649–659, mar. 2001.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage therapy. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 437-451, out. 2001.

SUTERA, S. P.; SKALAK, R. The history of Poiseuille's law. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 25, p. 1-19. 1993.

TAMAKI, H.; ZHANG, R.; ANGLY, F. E.; NAKAMURA, S.; HONG, P. Y.; YASUNAGA, T.; KAMAGATA, Y.; LIU, W. T. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 441-452. 2012.

TANJI, Y.; SHIMADA, T.; FUKUDOMI, H.; MIYANAGA, K.; NAKAI, Y.; UNNO, H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling Escherichia coli O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p.280-287. 2005.

TECHNOPHAGE SA: From Science to innovative biopharmaceutical. Disponível em: < http://www.technophage.pt/ >. Acesso em 01 mar. 2016.

TURRINI, R. N. T.; SANTO, A. H. Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 6, p. 485-490. 2002.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6. 2004.

WEBER, A.; MORLIN, G.; COHEN, M.; WILLIAMS-WARREN, J.; RAMSEY, B.; SMITH. A. Effect of nebulizer type and antibiotic concentration on device performance. **Pediatric Pulmonology**, v. 23, p. 249–260. 1997

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181. 2004.

WELSH, D.; MASON, C. Host defence in respiratory infections. **The Medical clinics of North America**, v. 85, n. 6, p. 1329-1347, nov. 2001.

WESTWATER, C.; KASMAN, L. M.; SCHOFIELD, D. A.; WERNER, P. A.; DOLAN, J. W.; SCHMIDT, M. G.; NORRIS, J. S. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1301-1307, abr. 2003.

WHO: World Health Organization. Antimicrobial resistance. Abril, 2015. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/. Acesso em 13 abr. 2016.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 8, p. 1-10. 2013.

WRIGHT, A.; HAWKINS, C. H.; ANGGÅRD, E. E.; HARPER, D. R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, v. 34, n.4, p.349-357. 2009.

YANG, H.; LIANG, L.; LIN, S.; JIA, S. Isolation and characterisation of a virulent AB1 of Acinetobacter baumannii. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, p.131. 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico 10th CIFARP -International Congress of Pharmaceutical Sciences (Ribeirão Preto, Brasil, 5 a 9 de Setembro de 2015).





ANEXO B - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico **7th ANM** - **International Conference on Advanced Nanomaterials** (Aveiro, Portugal, 25 a 27 de Julho de 2016).

7 th International conference on Advanced Nanomaterials 2 rd International conference on Graphene Technology 1 st International conference on Spintronics Materials CERTIFICATE OF PARTICIPATION						
This is to certify that						
Victor Balcão						
has participated in ANM2016 and has presented the work entitled						
Development of an antimicrobial therapeutic system encompassing aqueous-core lipid nanoballoons housing strictly lytic bacteriophage						
particles for Pseudomonas aeruginosa, targeted to the treatment of						
bacterial pneumonia						
in the session of ANM						
<u>Ellay</u>						
25th July 2016, Dr. Elby Titus (Conference Chair)						

Development of an antimicrobial therapeutic system encompassing aqueous-core lipid nanoballoons housing strictly lytic bacteriophage particles for *Pseudomonas aeruginosa*, targeted to the treatment of bacterial pneumonia

Alessandra Rios¹, Marta Vila^{1,3}, Marco Chaud¹, Matthieu Tubino³, Marcelo Farias⁴, Rodrigo Portugal⁴ and Victor Balcão^{1,2,*}

¹LaBNUS - Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, i(bs)² – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil, <u>victor.balcao@prof.uniso.br</u>, <u>presenting author</u>

²CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

³Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil

⁴LNNano/CNPEM - Brazilian National Nanotechnology Laboratory, Campinas/SP, Brazil

SUBJECT

ANM - Advanced Nanomaterials - Poster

INTRODUCTION

Due to the increasing awareness of the worlwide appearance of multiple bacterial resistance to conventional chemical antibiotics, phage particles (natural predators of bacteria) are high-potential candidates for biopharmaceutical applications, due to the fact that these inert particles replicate directly at the site of infection, becoming profusely available where they are most needed¹. However, phage particles are fragile, and therefore their full structural and functional stabilization is required². The aim of this study was to optimize a water-in-oil-in-water multiple emulsion (W/O/W ME) integrating aqueous-core lipid nanoballoons (LN) encasing strictly lytic phage particles with broad lytic spectrum against P. aeruginosa, aiming at their structural and functional stabilization, and entail its thorough physicochemical characterization.

EXPERIMENTAL/THEORETICAL STUDY

Phage particles with broad lytic spectrum able to infect P. aeruginosa, viz. phage DSM JG004, propagated in their host (Figure 1) and duly purified, were imprisoned within W/O/W MEs. Two emulsions were prepared sequentially, a primary emulsion (W/O), followed by emulsification of this emulsion in another (external) aqueous phase (W), thus forming a ME (W/O/W). The inner aqueous phase (1000 µL) was constituted by HCl 1000 mM (20 µL), Tween 80 (10 mg) and strictly lytic phage particles (2.983x109 virions); the intermediate oily phase encompassed glycerol (5 mL), Softisan 100[™] (500 mg) and soybean phosphatidylcholine (375 mg); the outer aqueous phase encompassed poloxamer 188 (250 mg), methylparaben (50 mg) and UP water (40 mL). The W/O/W ME was characterized via DLS for particle hydrodynamic size (HS), size distribution (PI) and particle charge via Zeta potential (ZP); surface morphology and diffusion coefficient via NTA; thermal analyses via TGA and DSC, infrared spectrophotometry with Fourier transform (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and transmission electron microscopy (TEM) following negative staining with uranyl acetate (NS-TEM) or cryo-freezing in liquid ethane (cryo-TEM).

RESULTS AND DISCUSSION

After propagation (see Figure 1) and purification, a phage suspension was obtained with ca. 2.983×10^9 virions/mL (see Figure 2).



Figure 1. Figure 2. Cryo-TEM images of Figure 3. NS-TEM images of Propagation the concentrated phage the W/O/W multiple emutsion of phage suspension (PS) (a), showing produced, at different JG004. the phage tail fibers adhered to magnifications. cell debris (b, zoomed portion of a cryo-TEM image of PS).

Two homogenization cycles of 10 min at 12500 rpm were found to be critical for producing stable LN dispersions with a pH of 6.40, average HS of (188.54±2.20) nm, PI of (0.208±0.010) and ZP of (-30.18±1.60) mV. Figure 3 displays NS-TEM images of the LNs integrating the optimized W/O/W ME housing phage entities, allowing to observe the close-to-spherical shape of the particles and the absence of aggregation. NTA analyses showed a concentration of ca. 2.39×10^{12} particles/mL. The positive antimicrobial activity of the W/O/W ME integrating phage particles, assessed in vitro against a pathogenic strain of P. aeruginosa, further suggests functional stabilization of the phage particles. The diffusion coefficient (D) of the LNs (calculated as 2.6070x10⁻¹² m².s⁻¹, using the Stokes-Einstein equation) was of the same order of magnitude as that of nanoparticles, viz. 10⁻¹² m².s⁻¹. The lower D, the more stable the ME is, and this was indeed observed. XRD, DSC and FTIR analyses of ME without and with imprisoned phage, showed no chemical interaction between the entrapped entity and chemical components.

CONCLUSION

Cytotoxicity and genotoxicity assays confirmed that the nanosystem produced with imprisoned phage JG004 particles was virtually nontoxic, indicating its potential of use in aerossols targeted to control bacterial infections without impacts to the human body.

REFERENCES

1.V.M. Balcão et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 123, 478-485 (2014).

2.V.M. Balcão and M.M.D.C. Vila, Advanced Drug Delivery Reviews 93, 25-41 (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

Project funding by FAPESP (São Paulo, Brazil) (**Ref. No.** 2013/03181-6, **Project PneumoPhageKill**), is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq in the form of a Productivity in Research (PQ) fellowship granted to Victor M. Balcão.



INTRODUCTION

Due to the increasing awareness of the worlwide appearance of multiple bacterial resistance to conventional chemical antibiotics, phage particles (natural predators of bacteria) are high-potential candidates for biopharmaceutical applications, due to the fact that these inert particles replicate directly at the site of infection, becoming profusely available where they are most needed1. However, phage particles are fragile, and therefore their full structural and functional stabilization is required. The aim of this study was to optimize a water-in-oil-in-water multiple emulsion (W/O/W ME) integrating aqueous-core lipid nanoballoons (LN) encasing strictly lytic phage particles with broad lytic spectrum against P. aeruginosa, aiming at their structural and functional stabilization, and entail its thorough physicochemical characterization.

EXPERIMENTAL/THEORETICAL STUDY

Phage particles with broad lytic spectrum able to infect P. aeruginosa, viz. phage DSM JG004, propagated in their host (Figure 1) and was followed by determination of the phage titer. The suspension was purified and imprisoned within W/O/W MEs



Figure 1. Propagation of phage JG004

Two emulsions were prepared sequentially, a primary emulsion (W/O), followed by emulsification of this emulsion in another (external) aqueous phase (W), thus forming a ME (W/O/W). The inner aqueous phase (1000 μ L) was constituted by HCl 1000 mM (20 μ L), Tween 80 (10 mg) and strictly lytic phage particles (2.983x10⁹ virions); the intermediate oily phase encompassed glycerol (5 mL), Softisan 100TM (500 mg) and soybean phosphatidylcholine (375 mg); the outer aqueous phase encompassed poloxamer 188 (250 mg), methylparaben (50 mg) and UP water (40 mL). The W/O/W ME was fully characterized physicochemically,



- ➢ Size distribution (PI)
- > Particle charge via Zeta potential (ZP)
- > Surface morphology and diffusion

Characterization

- coefficient via NTA
- ➤ Thermal analyses via TGA and DSC Infrared spectrophotometry with Fourier transform (FTIR)
- X-ray diffraction (XRD)
 Transmission electron microscopy (TEM) following negative staining with uranyl acetate (NS-TEM) or cryo-freezing in liquid ethane (cryo-TEM)

Optimized multiple emulsions housing phage particles were screened for antimicrobial (lytic) activity and the evaluation of the cytotoxicity of the W/O/W multiple emulsion systems was done.

RESULTS AND DISCUSSION

- > After propagation and purification, a phage suspension was obtained with ca. 2.983x109 virions/mL.
- > Two homogenization cycles of 10 min at 12500 rpm were found to be critical for producing stable LN dispersions with a pH of 6.40, average HS of (188.54 ± 2.20) nm, PI of (0.208 ± 0.010) and ZP of (-30.18 ± 1.60) mV (Figure 2).



Figure 3 displays Cryo-TEM images of phage JG004 suspension (a,b,c,d,g) and NS-TEM imag of the LNs integrating the optimized W/O/W ME housing phage entities (e, f), allowing to observe the close-to-spherical shape of the particles and the absence of aggregatio



py (TEM) image: Figure 3. T

> The diffusion coefficient (D) of the LNs (calculated as 2.6070x10-12 m2.s-1, using the Stokes-Einstein equation) was of the same order of magnitude as that of nanoparticles, viz. 10-12 m2.s-1. The lower D, the more stable the ME is, and this was indeed observed. XRD, DSC and FTIR analyses of ME without and with imprisoned phage, showed no chemical interaction between the entrapped entity and chemical components.

Metting .



Figure 4. IR spectra of MEPLC (a), ME10 (b), ME1000 (c), and isolated phage suspension (d) Figure 5. DSC analyses of (a) EMPLC, pink line, (b) EM10, grey lines, (c) EM1000, green lines, and (d) bacteriophage suspension concentrate, blue lines.

➢ The positive antimicrobial activity of the W/O/W ME integrating phage particles, ed in vitro against a pathogenic strain of P. aeruginosa, further suggests functional stabilization of the phage particles.



Figure 7. Antimicrobial activity of EM1000 (A), EMPLC (B), concentrated phage suspension (C) and phage suspension placebo (D), which corresponds to F1, halo test disks and F2, drop

CONCLUSION

Cytotoxicity and genotoxicity assays confirmed that the nanosystem produced with nprisoned phage JG004 particles was virtually nontoxic, indicating its potential for use in aerossols targeted to control lung bacterial infections without impacts to the human body.

ACKNOWLEDGEMENTS

Project finding by FAPSSP (Sio Paulo, Bradi) (Ref. No. 2013/03181-6, Project PreumoPhageXill), is hereby gratefully advantologied. This work also received support from CNPp, National Council for Scientific and Technological Development Beard, in the form of Bearcark Productivity (PQ) followship granted bYterk Malcio (Ref. No. 3061/32/014-7), and Marco V. Chaud (Ref. No. 309598/2014-1). The authors are grateful to the Electron Microscopy Laboratory (LMP), facility of the Brazilian Nanotechnology. National Laboratory at the Brazilian National Centre for Energy and Materials Science (LNNano/ CNPEM) for help in performing transmission electron microscopy analyses.

- Caultris - Polasaner 100 - Settase 2017 - MC100 - MC100-MEPLC No. of Concession, Name Figure 6. XRD diffractograms of samples of lecithin (grey curve), poloxamer 188 (red curve), Softian100TM (blue curve), (placebo) W/O/W multiple emulsion

(placebo) W/O/W multiple emulsion decoil of plage particles (MEPLC) (black curve), W/O/W multiple emulsion encapsulating plage particles (prepared with 1000 µL of concentrated bacterioplage suspension (ME1000) (green curve), and of the concentrated bacterioplage suspension (purple curve). The diffractory in the brown curve was produced by subtracting the normalized produced by subtracting the normalized diffractogram of MEPLC from the normalized diffractogram of ME1000.

ANEXO C - Artigo científico publicado: Alessandra C. Rios, Carla G. Moutinho,
Flávio C. Pinto, Fernando S. Del Fiol, Angela Jozala, Marco V. Chaud, Marta M.
D. C. Vila, José A. Teixeira, Victor M. Balcão (2016) Alternatives to overcoming
bacterial resistances: *State-of-the-art*, *Microbiological Research* 191: 51-80.

Contents lists available at ScienceDirect







CrossMark

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micres

Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art

Alessandra C. Rios^a, Carla G. Moutinho^{b,c}, Flávio C. Pinto^c, Fernando S. Del Fiol^a, Angela Jozala^a, Marco V. Chaud^a, Marta M.D.C. Vila^a, José A. Teixeira^b, Victor M. Balcão^{a,b,*}

^a LaBNUS–Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, i(bs)2i(bs)²-intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

^b CEB–Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

^c University Fernando Pessoa, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history: Received 11 December 2015 Received in revised form 28 March 2016 Accepted 21 April 2016 Available online 7 May 2016

Keywords: Antibiotics Bacterial resistance Alternatives to conventional antibiotics Bacteriophages and phage therapy Lysin therapy Antimicrobial peptides and bacteriocins Antibodies and vaccines

ABSTRACT

Worldwide, bacterial resistance to chemical antibiotics has reached such a high level that endangers public health. Presently, the adoption of alternative strategies that promote the elimination of resistant microbial strains from the environment is of utmost importance. This review discusses and analyses several (potential) alternative strategies to current chemical antibiotics. Bacteriophage (or phage) therapy, although not new, makes use of strictly lytic phage particles as an alternative, or a complement, in the antimicrobial treatment of bacterial infections. It is being rediscovered as a safe method, because these biological entities devoid of any metabolic machinery do not possess any affinity whatsoever to eukaryotic cells. Lysin therapy is also recognized as an innovative antimicrobial therapeutic option, since the topical administration of preparations containing purified recombinant lysins with amounts in the order of nanograms, in infections caused by Gram-positive bacteria, demonstrated a high therapeutic potential by causing immediate lysis of the target bacterial cells. Additionally, this therapy exhibits the potential to act synergistically when combined with certain chemical antibiotics already available on the market. Another potential alternative antimicrobial therapy is based on the use of antimicrobial peptides (AMPs), amphiphilic polypeptides that cause disruption of the bacterial membrane and can be used in the treatment of bacterial, fungal and viral infections, in the prevention of biofilm formation, and as antitumoral agents. Interestingly, bacteriocins are a common strategy of bacterial defense against other bacterial agents, eliminating the potential opponents of the former and increasing the number of available nutrients in the environment for their own growth. They can be applied in the food industry as biopreservatives and as probiotics, and also in fighting multi-resistant bacterial strains. The use of antibacterial antibodies promises to be extremely safe and effective. Additionally, vaccination emerges as one of the most promising preventive strategies. All these will be tackled in detail in this review paper. © 2016 Published by Elsevier GmbH.

Contents

1.	Introc	luction	52
2. Bacteriophages and phage therapy			
	2.1.	Phage infection process: lysogenic pathway vs. lytic pathway	54
	2.2.	Phage therapy and its pre-requisites	. 55
	2.3.	Advantages and disadvantages of phage therapy when compared to chemical antibiotherapy	. 56
	2.4.	Bacterial resistance to bacteriophages and bacteriophage kinetics	.56
	2.5.	Applications of phage therapy	. 57
3. Lysins and lysin therapy		s and lysin therapy	. 58
	3.1.	Lysin structure	58

* Corresponding author at: Department of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, P-4710-057 Braga, Portugal. *E-mail addresses*: vbalcao@ceb.uminho.pt, vbalcao@gmail.com (V.M. Balcão).

http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008 0944-5013/© 2016 Published by Elsevier GmbH.

	3.2. Advantages, disadvantages and limitations of antimicrobial therapy with lysins		
	3.3.	Applications of lysin therapy	61
		3.3.1. Lysins in medicine and biotechnology	61
		3.3.2. Synergism between lysins and antibiotics	61
		3.3.3. Other applications of lysin therapy	
4.	Antin	imicrobial peptides	
	4.1.	AMP structures, properties and mechanisms of action	63
	4.2.	Advantages and disadvantages of AMPs for antibiotherapy	64
	4.3.	Bacterial resistances to AMPs	65
	4.4.	. Potential applications of AMPs	
		4.4.1. Synergism between AMPs and antibiotics	
5.	Antib	ibiotherapy with bacteriocins	
	5.1.	Structure and mechanism of action of bacteriocins	
	5.2.	. Bacterial resistance to bacteriocins and bacteriocin toxicity	
	5.3.	Application of bacteriocins	
		5.3.1. Application of bacteriocins as biopreservatives	
		5.3.2. Application of bacteriocins as therapeutic agents	
		5.3.3. Application of bacteriocins produced by probiotic bacteria	
6.	Other	er potential alternatives	
	6.1.	Antivirulence strategies	74
	6.2.	. Anti-bacterial antibodies	74
		6.2.1. Radioimmunotherapy	
	6.3.	Vaccines	
7.	New	w sources for new potentially antimicrobial molecules	
8.	Concl	nclusions	
	Trans	nsparency declarations	
	Ackn	<pre>knowledgements</pre>	
	Refer	erences	

1. Introduction

Worldwide, bacterial resistance to antimicrobial therapy has increased dramatically over the past few years, reaching a "new pre-antibiotic era", where society is put in danger. Currently, according to the World Alliance against Antibiotic Resistance (WAAR), antibiotics may completely lose their effectiveness over the next five years due to a combination of both self-medication and irrational prescription and use of these therapeutic agents, which has led to the development of multi-resistant bacterial strains, and in fact, some of them are resistant to all available antibiotics. Therefore, the need to develop feasible alternatives to antibiotics becomes more and more of utmost importance, so as to protect and promote global public health (Goossens et al., 2005; Carlet et al., 2011, 2012b; Carlet and Mainardi, 2012; Escobar-Paramo et al., 2012; Oldfield and Feng, 2014; WHO, 2015).

The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) reported that, each year, 25000 people die from infections caused by multi-resistant bacteria and also added that these microorganisms costs about 1.5 billion euros in extra healthcare services and productivity losses per year to Europe (Carlet and Mainardi, 2012). Additionally, as published in a report by the World Health Organization (Leung et al., 2011), in the USA alone such costs represents ca. 35 billion USD per year. It was found that, certain bacteria such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (which are both pathogenic and commensal bacteria in humans or animals), that in an initial phase were susceptible to conventional antibiotics, started to acquire resistance to the antimicrobial treatment, including to the third-generation cephalosporins (Carlet et al., 2011; Carlet and Mainardi, 2012).

The "globalization of resistance" to antibiotics occurred, for example, with the spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1), an enzyme produced by *Klebsiella pneumoniae* or *Escherichia coli*, which can make them resistant to β -lactam antibiotics. This enzyme was first discovered in India, and later it was disseminated to Pakistan, USA, Canada, Japan and the United Kingdom (Yong et al., 2009; Walsh, 2011; Charan et al., 2012; Tsang et al., 2012; Ojala et al., 2013). Another example of "globalization of resistance" to antibiotics is the appearance, back in 2009, of KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapemenase), an enzyme responsible for the degradation of carbapenem antibiotics (Nordmann et al., 2011). The panorama is more alarming when bacterial resistance linked to bacterial virulence factors, leading to an outbreak as what took place with the haemolytic-uremic syndrome associated with the *Escherichia coli* serotype O104:H4, which occurred in Europe in May 2011, affecting more than 3400 people and killing ca. 50 patients. This bacterial strain was found in salads, causing renal failure, thrombocytopenia and haemolytic anemia (Buchholz et al., 2011).

Bacteria can resist to antibiotics via different resistance mechanisms, viz. (i) reduction in bacterial uptake of the antibiotic; (ii) production of hydrolytic enzymes, such as β -lactamases, that inactivate the antimicrobial drug; (iii) modification of the antimicrobial drug receptor; (iv) reduction of the antimicrobial drug concentration in the intracellular environment by the efflux pumps present in bacterial membranes; (v) modification of the enzymatic pathway, leading to a decrease of the bacterial susceptibility to the antibiotic; and (vi) loss of intracellular enzymes used in the activation of the prodrug (Łęski and Tomasz, 2005; Piddock, 2006; Rouveix, 2007; Stavri et al., 2007; Rang et al., 2012; Romanelli et al., 2010; Wardal et al., 2010; Martínez-Júlvez et al., 2012; Ojala et al., 2013).

Over the last decades, it has been observed an increased use of antibiotics, in large part caused by the increasing numbers of people needing healthcare, as a result of an ageing population and the consequent increase of chronic diseases and healthcare-associated infections (HAI), also known as nosocomial infections, which represents a worldwide public health problem (Pina et al., 2010a,b; Fair and Yitzhak, 2014).

Self-medication provides another "weight" factor that contributes to a widening of this problem and leads to an overconsumption of antibiotics. Drugs are incorrectly used by the population, and are frequently used to treat common colds and/or respiratory tract infections, mainly caused by viruses (Campos et al., 2007; Mainous et al., 2009). Furthermore, the overuse of antibiotics in farm animals, either for therapeutic or prophylactic purposes or even as growth promoters, makes the situation even more dramatic because it induces the selection of pathogenic and commensal microorganisms that are resistant to pharmacological antibiotic molecules (Aarestrup et al., 2000; Donabedian et al., 2003; Wegener, 2003; Jacoby, 2005; Johnsen et al., 2005; Katsunuma et al., 2008).

The discovery of penicillin by Alexander Flemming in 1928 changed radically the history of medicine, treating infections that until then there was no way they could be treated. This new agent started to be utilized in large scale, greatly reducing the rates of morbidity and mortality associated with infectious diseases (Aminov, 2010). Despite the great initial success, soon there was news of microorganisms resistant to the new drug class (Abraham and Chain, 1988). The use of the new class of drugs (antibiotics) was disseminated and, with it, the patterns of resistance. Data from the European Union show that ca. 25,000 persons die annually victims of infections by multiresistant microorganisms. In the United States of America, this number reaches an astounding 63,000 deaths per year (Aminov, 2010). The causes for the appearance and dissemination of bacterial resistance are complex and multifactorial. The major causes are: (i) Overuse. Recent data show that at least 58% of the children with diagnostic of influenza received antibiotics. The unnecessary use of antibiotics selects resistant specimens of normal microbiota, contributing for the dissemination of resistance genes (Nitsch-Osuch et al., 2016). The lack of information or of diagnosis criteria have contributed largely for the excessive use of these pharmaceuticals; (ii) Inadequate prescriptions. Beyond exaggerate use, the number of inadequate prescriptions is also surprising. Studies show errors in the choice of drug and treatment time of about 30-50% of the employment of antibiotics (Ventola, 2015). Subtherapeutic doses of antibiotics induce phenotypic changes in bacteria contributing to the emergence of bacterial resistance (Viswanathan, 2014); (iii) Use in agriculture and livestock. In 2011, in the United States of America, it is estimated that the use, only as growth promoters in livestock, was more than 13000 tons of antibiotics. Meat production in the same year was over 42 million tons, which would give an average of almost 320 mg of antibiotic per kilogram of meat produced in the United States alone (Aarestrup, 2015). The use of antibiotics in meat production has been regarded as largely responsible for the increase in bacterial resistance indicators (Boerlin and Reid-Smith, 2008). By ingesting large amounts of antibiotics, there will be death of susceptible bacteria, with consequent prevalence of resistant organisms. By eating the meat of those animals, the human being acquires these microorganisms, pathogenic or not, but which carry resistance genes, exposing the humans to infections untreatable with antibiotics (Ventola, 2015). Bacterial resistance was reported by the WHO (World Health Organization) and the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) as a global threat for the 21st century. The rise of enzymes that degrade carbapenems (KPC-2 – Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2) and beta-lactam antibiotics (NDM-1 – New Delhi metallo-β-lactamase-1) has placed even further concern in the scientific community worldwide, due to the lack of therapeutic options for the treatment of infections caused by these microorganisms (Liu et al., 2016). For such treatment, the only available options are tigecycline and colistin, used alone or in combination (Falagas et al., 2011).

Finally, yet importantly, resistance to antibiotics has reached such a high level that endangers the human race itself, and with the current crisis both in the European Union and in South-America, the funds available to research and healthcare will be reduced so it can be expected a faster and easier spreading of these resistant bacterial strains in the community and hospitals (Meir et al., 2011). Hence, it becomes urgent to discover new antimicrobial agents with different mechanisms of action from those currently available on the market, as well as new ways to relate with infectious diseases (viz., vaccines, probiotics, among others), and new therapies for the treatment and prevention of infections. It can be an arduous, time-consuming and extremely expensive task, because every year only 0.01% of the new molecules tested (5 in 260,000–530,000) exhibit antimicrobial activity, added to the fact that they have huge production costs, high levels of toxicity and extremely complex synthesis (Fernebro, 2011; Ojala et al., 2013).

It is imperative that new actions are carried out both at the community level and hospitals, in order to change the way in which bacterial infections are diagnosed and treated. It is also crucial to adopt alternative strategies that promote the elimination of these resistant bacterial strains from the environment, namely: (i) phage therapy; (ii) lysin therapy; (iii) bacteriocins; among other potential strategies (Hanlon, 2007; Almeida et al., 2009; Housby and Mann, 2009; Theuretzbacher, 2009; Abedon et al., 2011; Fernebro, 2011; Freire-Moran et al., 2011; Wijagkanalan et al., 2011; Carlet et al., 2012a; Escobar-Paramo et al., 2012; Parracho et al., 2012). Hence, the major goal of this review paper was focused on the research, compilation and analysis of the antimicrobial strategies outlined above, which present themselves as potential and viable alternatives to conventional antimicrobial chemotherapy.

2. Bacteriophages and phage therapy

Bacteriophages, or phages, are viruses that only infect bacterial cells. They are biological entities known for over a century. Phage particles represent the most abundant biological entities on the planet, and total phage abundance in the biosphere has been estimated at 10³⁰, or more (Chibani-Chennoufi et al., 2004). However, only now a special interest on phages has been re-discovered, as a potential alternative or complement to current antimicrobial chemotherapy due to their highly specific and unique properties to fight bacterial strains resistant to conventional antimicrobial drugs (Hermoso et al., 2007; Housby and Mann, 2009; Hagens and Loessner, 2010; Summers, 2012). Phages are biological entities completely devoid of any metabolic machinery, and thus are obligate intracellular parasites that require a bacterium to replicate themselves, through their genetic material, by taking over the biochemical machinery of the bacterial cells (Skurnik and Strauch, 2006; Hermoso et al., 2007; Hyman and Abedon, 2010).

Most phages discovered until the present day are specialized in interacting with bacteria that express specific receptors and, if the bacteria does not show at the surface a specific receptor for a particular bacteriophage, then the phage becomes naturally (and highly) specific for a given bacterial host. It is estimated that for every bacterial cell, there are ten different bacteriophages, some of which are highly specific for their host – meaning that they recognize only one type of receptor (monophage), while others have a broader host range and recognize more than one type of receptor (polyphage) (Skurnik and Strauch, 2006; Hyman and Abedon, 2010; Chan and Abedon, 2012).

Phage therapy has been applied over the past few decades to the treatment of bacterial infections, in countries such as The Republic of Georgia (Eliava Institute and The Center for Phage Therapy, in Tbilisi) and Poland (Institute of Immunology and Experimental Therapy, in Warsaw), where research and development centres were built specifically for bacteriophages aiming at developing phage therapy. The studies conducted in these research centres produced remarkable clinical results. However, and despite the immense potential of bacteriophages for eradicating infections caused by bacterial-resistant strains, up to now only a few clinical trials have been performed in human beings and are accepted by public health authorities, such as Food and Drug Administra-



Fig. 1. Schematic diagram of the lytic and lysogenic infectious cycles of a bacteriophage. Source: adapted from Maura and Debarbieux (2011).

tion (FDA) and European Medicines Agency (EMA) (O'Flaherty et al., 2009; Maura and Debarbieux, 2011).

Concerning their morphology and classification, phages can be divided into six major groups. However, globally speaking, they all exhibit a well-defined structure, usually with an icosahedral capsid involving the genetic material. Within the capsid's core, they may contain single stranded (ssDNA) or double stranded (dsDNA) DNA, or single stranded (ssRNA) or double stranded (dsRNA) RNA, as shown in Table 1 (adapted from Ackermann (2007) and Hanlon (2007)).

Since the 1960s more than 5100 phages have been studied, allowing to conclude that ca. 96% of them possess tails and belong to *Myoviridae, Siphoviridae* and *Podoviridae* families (Dabrowska et al., 2005; Ackermann, 2007; Hanlon, 2007; Wittebole et al., 2013).

2.1. Phage infection process: lysogenic pathway vs. lytic pathway

The process of bacterial infection by its predator (*i.e.*, the bacteriophage) (see Fig. 1) begins when bacteriophage adsorbs onto the surface of the bacterial cell. It is a complex process, consisting of three phases. Initially, there is a contact between phage and bacterium by diffusion and Brownian motions. Subsequently, the phage particle establishes a reversible, nonspecific binding via electrostatic forces, followed by an irreversible binding between the capsid protein of phage and bacterial surface receptor which, depending on the type of phage in question, may be: (i) a glycoprotein, (ii) a lipopolysaccharide, (iii) an aminoacid, (iv) a teichoic acid, or (v) *pili* (Skurnik and Strauch, 2006; Maura and Debarbieux, 2011; Wittebole et al., 2013). After binding of the phage to the bacterial cell surface, a portion of the phage structure (or the phage itself) penetrates into the host, followed by a complete release of the genetic material into the host's intracellular environment.

Depending on the type of phage, either a lytic or a lysogenic response can take place following bacterial infection. Considering the lytic response, caused by strictly lytic phages also commonly called virulent phages, the bacterial host's metabolism is assaulted and re-targeted to the production of new phage particles, by replicating the genetic material of the virus into the cytoplasm, leading to the synthesis of more lytic phage particles in cycles of 30 min which, aided by produced holins and lysins, subsequently causes

lysis of the bacterium. It is also important to refer that the genetic material of the phage is methylated by a DNA adenine methylase, which introduces a methyl group into the carbon 5 of the pyrimidine ring of a cytosine, thereby protecting the exogenous DNA from the destructive action of restriction endonucleases found in the cytoplasm of bacterial cells. Initially, the RNA polymerase is drawn to the site due to the presence of a promoter sequence in the phage genome, and the transcription process leads to the production of viral mRNA which is then translated, leading to the synthesis of viral proteins; this not only inhibits the transcription process of the host's own genome, but both stimulates the replication of the exogenous genetic material and allows the taking over and control of the bacterial cellular machinery, and stimulates the late replication of some genes that encode the capsid proteins and enzymes (holins and lysins) that cause the lysis of the cell wall, which are essential for the release of new virions. This is the type of phage particles sought and used in phage therapy (Weinbauer, 2004; O'Flaherty et al., 2009; Maura and Debarbieux, 2011; Wittebole et al., 2013).

In case of a lysogenic response caused by temperate phages, the phage reproduction happens on a later stage, because the viral genetic material is integrated into the genome of the bacterium. In this situation, the phage is replicated without lysing the host and the bacterium becomes immune to attacks of other phages of the same strain, becoming a lysogenic (and usually more virulent) bacterium (Weinbauer, 2004; Hanlon, 2007; O'Flaherty et al., 2009; Maura and Debarbieux, 2011; Wittebole et al., 2013). This bacterium is characterized by having a prophage, an inactive phage that is integrated in its genome and remains in a latent state for several bacterial cell divisions. The prophage is activated following stress processes or cellular damage of the host, inducing its replication via a lytic pathway, after it exits the bacterial genome. There is then the synthesis and release of new virion particles via extrusion, without occurring the disruption of the bacterial cell membrane (Weinbauer, 2004; Hanlon, 2007; Lu and Collins, 2009; Maura and Debarbieux, 2011; Wittebole et al., 2013).

There is currently a special interest in this type of (lysogenic) phages because, despite these phages can transfer genes containing resistance to antibiotics to another non-resistant bacterial strains, this might be an innovative process that can be exploited from

Table 1

Classification of bacteriophages according to their morphology and type of genetic material.

Structure	Family	Nucleic acid	Morphology	Examples
	Myoviridae	Linear dsDNA	Nonenveloped; Contractile tail	T4
\bigcirc	Siphoviridae	Linear dsDNA	Nonenveloped; Long and noncontractile tail	λ
\bigcirc	Podoviridae	Linear dsDNA	Nonenveloped; Short and noncontractile tail	Τ7
\Diamond	Microviridae	Circular ssDNA	Nonenveloped; Isometric	φX174
Ô	Corticoviridae	Circular dsDNA	Nonenveloped; Isometric	PM2
\bigcirc	Tectiviridae	Linear dsDNA	Nonenveloped; Isometric	PRD1
0	Leviviridae	Linear ssRNA	Nonenveloped; Isometric	MS2
\bigcirc	Cystoviridae	Segmented dsRNA	Enveloped; Spherical	φ6
	Inoviridae	Circular ssDNA	Nonenveloped; Filamentous	fd
0	Plasmaviridae	Circular dsDNA	Enveloped; Pleomorphic	MVL2

Source: adapted from Ackermann (2007).

a therapeutic perspective. Such process makes use of genetically modified lysogenic phages to insert, via lysogenization, specific genes into the genome of resistant bacterium, increasing its susceptibility to a given class of antibiotics (Lu and Collins, 2009; Edgar et al., 2012; Wittebole et al., 2013).

It is essential to note that during the process of phage infection, the phage ensures that only its viral DNA is replicated, avoiding, in this way, the interference of other phages in the process. Finally, in both cycles, after the synthesis of viral proteins and enzymes responsible for capsid formation and the packaging of genetic material, there is the assembly and formation of new virions. These disrupt the cytoplasmic membrane, aided by holins, and then the peptidoglycan layer, aided by lysins, leading to the lysis of the bacterium (lytic process), and thereby expelling the newly formed virions to the extracellular environment (Ackermann, 2007; Maura and Debarbieux, 2011; Wittebole et al., 2013).

2.2. Phage therapy and its pre-requisites

Phage therapy is one of the potential alternative strategies to antibiotherapy, and consists in using strictly lytic bacteriophages as an alternative or complement in the treatment of bacterial infections (Escobar-Paramo et al., 2012; Chan and Abedon, 2012). Despite their status as viruses, bacteriophages are strictly specific to certain prokaryotic cells, which include all pathogenic bacteria known until now. The phage therapy has been proven to be safe and free from adverse side effects, and it is worthy to remember that these biological entities are totally devoid of any metabolic machinery on their own and that they have no affinity whatsoever to eukaryotic cells (Chan and Abedon, 2012).

Strictly lytic phages are the natural predators of bacteria and, when in contact with them, they invade specific bacterial strains and induce a lytic infection process associated with a metabolic dis-



Fig. 2. Reduction in both bacterial numbers (CFU – Colony Forming Units) and phage particle numbers (PFU – Plaque Forming Units) during the process of lytic infection by multiple bacteriophages.

Source: adapted from Parracho et al. (2012).

ruption and cell lysis, reducing the number of bacterial cells present in the infected human host to a number that does not represent a danger to the organism, as illustrated in Fig. 2 (adapted from Kutter et al. (2010) and Escobar-Paramo et al. (2012)).

The exclusive use of monophages as therapeutic agents may not be optimal, because due to the fact that they have a reduced spectrum of action, they may limit the potential of phage therapy in the treatment of bacterial infections, particularly when the bacterial strain that causes the infection is not known. Thus, the spectrum of action can be extended through the use of a phage cocktail, which is a mixture of strictly lytic bacteriophages infecting a wider range of hosts (*i.e.*, several bacterial strains of the same species or different species simultaneously) (Chan and Abedon, 2012).

There is a set of pre-requisites for phage therapy that aims to avoid any failure of this therapeutic approach. Such requirements stipulate that: (i) only phages that have an exclusively lytic activity may be applied in phage therapy; (ii) before applying the antimicrobial therapy with a particular phage, it is absolutely necessary to know the biology and the host range that affects it; (iii) phage preparations must be absolutely free of bacteria and its components, such as proteins (and, specifically, bacterial endolysins), DNA, organelles, among others; (iv) the bacterial receptor where the phage can act is to be well-known, since a mutation that causes a change in the receptor leads to ineffective phage therapy; (v) the phage preparation must be tested in animal models, to ensure therapeutic efficacy, because it may exhibit a different activity *in vivo* (Levin and Bull, 2004; Skurnik and Strauch, 2006; Hermoso et al., 2007; Viertel et al., 2014).

2.3. Advantages and disadvantages of phage therapy when compared to chemical antibiotherapy

The advantages of phages in relation to conventional antibiotics are several, namely: (i) bacteriophage particles are highly specific to a particular bacterial species or strain, depending on the kind of receptor that recognizes them; (ii) they are the natural predators of bacteria; (iii) the community is constantly exposed to these biological (although metabolically inert) entities; (iv) they are ubiquitous in the environment and one of the most abundant entities on the planet; (v) they are easily isolated; (vi) they exhibit high tissue permeability and, concomitantly, a good skin penetration, being able to reach deeper layers of the skin where chronic (infected) wounds may lie; (vii) they can be applied to eradicate pathogenic bacteria without affecting the commensal flora, hence preventing secondary infections; (viii) they do not affect eukaryotic cells, as they have no affinity whatsoever for them; (ix) they present an exponential growth and replicate inside the bacteria and, therefore, accumulate in extremely high concentrations at the site of infection, as long as its bacterial host still exists; (x) successive administrations of phage preparations become fully unnecessary, since while the target bacterium is present phage particles will constantly replicate until the bacterial concentration drops to a value that does not present a danger to the organism in question, being subsequently (and naturally) eliminated by the body; (xi) they possess a high ability to penetrate bacterial biofilms; (xii) they can mutate and overcome bacterial resistance; (xiii) the isolation procedure of new bacteriophages is fairly simple and economical, unlike the process of developing new chemical antibiotics; (xiv) they can be a safe therapeutic option for patients allergic to antibiotics; (xv) antimicrobial treatment may be effective with the use of only a small phage concentration; and (xvi) phage particles readily cross the blood brain barrier and can be used to treat bacterial infections of the central nervous system (Sulakvelidze et al., 2001; Weber-Dabrowska et al., 2003; Matsuzaki et al., 2005; Skurnik and Strauch, 2006; Hermoso et al., 2007; Abhilash et al., 2009; O'Flaherty et al., 2009; Hagens and Loessner, 2010; Kutter et al., 2010; Wittebole et al., 2013).

However, phage therapy may also present several disadvantages, namely: (i) it is necessary to identify, in a first stage, the infectious agent responsible for the infection and then isolate its specific phage from the environment; (ii) when administered systemically, phage particles (which are protein entities) trigger an immune response leading to the production of antibodies, which can drastically reduce the effectiveness of the antimicrobial treatment; (iii) actually, only lytic phages may be used in phage therapy, which reduces the number of available phages eligible to integrate this therapy; (iv) it has to be defined which is the best route of administration, the optimal dose, the frequency of administration and the average duration of treatment with these biological entities; (v) new genes in some bacteriophages are being identified in a regular basis, and researchers are still unaware of what is their function; (vi) plain bacteriophage particles are prone to recognition by the immune system and thus are easily eliminated from the body, resulting in a drastic reduction of therapeutic efficacy; and (vii) bacteria developed many different types of mechanisms that confer resistance to phages (Hermoso et al., 2007; O'Flaherty et al., 2009; Parracho et al., 2012; Chan and Abedon, 2012; Wittebole et al., 2013). Phages are protein-based entities totally devoid of metabolic machinery that can potentially interact with the immune system within the human body, can actively replicate only in the presence of viable host bacterial cells, and can even evolve during manufacture or use, but are far from being unique in these regards (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). For example, many protein-based (bio)pharmaceuticals can stimulate the immune system, chemical antibiotics that lyse bacteria will release in situ bacterial (endo)toxins, and live-attenuated vaccines both actively replicate and evolve within the body tissues. Protein-based drugs, chemical antibiotics, and whole vaccines have previously been approved for use despite these various properties. There are no antimicrobials displaying selective toxicity that will affect all possible microbial targets. Typically the narrowness of phage host ranges - few strains or species of bacteria - will at a minimum place limitations on presumptive treatment, *i.e.*, treatment courses that begin prior to the identification of the pathogen's susceptibility to antibacterials such as to specific phages. However, as phages can often be employed in combination with other antibacterial agents, including other phages (so-called phage cocktails), the lytic spectrum of phage products can be much broader than the spectrum of activity of individual phage types (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). Even phage cocktails with broad spectrum of action are normally more selective in their spectrum of activity than typical "narrow-spectrum" antibiotics, a property that can be viewed as an additional advantage of phage therapy. When using bacteriophage particles as antimicrobial agents, the general aim should be to identify those bacteriophages that display good primary pharmacodynamics (*i.e.*, antibacterial virulence), minimal secondary pharmacodynamics (*i.e.*, low potential to do harm to patients), and good pharmacokinetics (i.e., an ability to reach target bacteria *in situ*). Bacteriophage particles that do not adequately comply with these criteria should in most circumstances not be used as antimicrobial therapeutics (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). Additionally, since phage particles are intrinsically proteins in nature and may eventually interact with the immune system of the body, a solution to surpass this apparent disadvantage may lie in protecting such phage particles via encapsulating such biomolecules within nanocarriers, eventually endowed with characteristics of invisibility towards the digestive and immune systems, or binding them to macroscopic supports thus rendering them insoluble. Combined, these strategies promote their structural and functional stabilization (Balcão and Vila, 2015).

2.4. Bacterial resistance to bacteriophages and bacteriophage kinetics

The mechanisms of bacterial resistance to bacteriophages are generally associated to the disruption of the phage adsorption process, through bacterial mutations that commonly lead to the loss of specific cell surface receivers that allow linking between bacterium and phage. Bacteria can also induce the production of layers rich in mucilage lining the entire bacterial surface, preventing contact of the phage with its respective receptor (Wittebole et al., 2013).

Additionally, bacteria may acquire resistance via lysogenic phages containing in their genetic material sequences that encode bacterial resistance or toxins and, after integration of the phage's genetic material into the genome of the bacterium, begin to acquire such resistance. In addition to these mechanisms, bacteria may hydrolyse the genetic material of the phage by restriction endonucleases present in their cytoplasm, and are also able to methylate their own DNA, working as a defense mechanism against phages. The bacterial resistance can also be caused by mutations in genes that encode proteins either essential for phage replication or necessary in the assembly of new virion particles (Skurnik and Strauch, 2006; Wittebole et al., 2013).

However, bacterial resistances are not always supportive for the bacterium, because what usually happens is that the resistance may reduce the performance of the bacterium or, if the specific phage receptor is a virulence factor, the mutation may cause a drastic reduction in its virulence (Levin and Bull, 2004; Skurnik and Strauch, 2006).

Concerning phage "pharmacokinetics", this allows to establish the amount of phages that are available at the infection target site, in order to perform a therapeutic action, while describing the impact of the body on phages. This is actually a rather complex parameter, both due to the self-replicating nature of phages and because only a few studies have been produced. It is important to note that the process of *in vitro* replication of bacteriophages can be quite different from what actually happens in vivo, as the in vivo "pharmacokinetic" and "pharmacodynamic" processes differ from phage to phage. Thus, pharmacokinetics in phage therapy is very different from that associated with conventional antibiotic chemotherapy, and presents a number of critical parameters that must be considered: (i) the adsorption rate; (ii) the latency period; (iii) the initial phage dosage; (iv) the critical time; (v) the clearance rate; (vi) the ability to replicate phage particles in situ; (vii) the anatomophysiology of the host; (viii) the environmental conditions; and (ix) the phage distribution, which will largely depend on the individual's immune system (Skurnik and Strauch, 2006).

2.5. Applications of phage therapy

Over the last three decades, several studies have been developed involving the use of bacteriophages, which have clearly demonstrated the ability to infect pathogenic bacteria both in animals and humans, for example, the recently discovered φ NK5 lytic phage, which is highly effective against Klebsiella pneumoniae in mice (Hung et al., 2011). Nowadays, there are some experimental models which aim at the administration of bacteriophages by either intravenous or intraperitoneal paths, and which exhibit therapeutic efficacy. However, the intravenous path is not ideal because it is not possible to ensure that bacteriophage solutions are completely pyrogen-free (Maura and Debarbieux, 2011). As the intravenous administration of phage solutions is no more the first option, a group of researchers attempted to orally administer a phage cocktail (containing phages SP15, SP21 and SP22) for the treatment of gastrointestinal infections caused by Escherichia coli O157:H7 in mice, and the number of bacteria detected in the faeces was substantially reduced. However, and despite the fact that strictly lytic bacteriophages are highly specific for their target bacterial hosts, the consequences to the intestinal flora and the resulting immune response are still unknown (Tanji et al., 2005).

Another route of administration has been studied and developed by several researchers, based on a topical model, in which bacterial infections in the skin can be treated with a simple external (topical) application of a cream containing bacteriophage particles. However, as in the case of oral administration, the adverse effects are still largely unknown, therefore making it necessary to deepen the knowledge regarding such model (O'Flaherty et al., 2005). More recently, the intranasal route of administration was selected for the treatment of pulmonary infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* or by *Klebsiella pneumoniae* through the PAK-P1 phage and the SS phage, respectively. However, this approach has revealed a relatively low therapeutic efficacy compared to intraperitoneal administration, which was confirmed by a comparative study performed by Carmody et al. (2009). In this context, another study proved that a single intranasal instillation containing PAK-P1 bacteriophage was sufficiently effective to prevent infection for a period of 24 h. The same result was obtained, but using phage P3-CHA, which is able to eradicate and prevent acute pulmonary infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a cystic fibrosis patient in a hospital in France (Chhibber et al., 2008; Debarbieux et al., 2010; Maura and Debarbieux, 2011; Morello et al., 2011).

In 2009, the FDA authorized a phase I clinical trial involving the use of a phage cocktail applied in venous leg ulcers, aiming at the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The results of this clinical trial have shown that the aforementioned phage cocktail was safe and highly effective, when compared with the control group (Rhoads et al., 2009; Maura and Debarbieux, 2011). Also in 2009, a phase II clinical trial was conducted in England by the startup company Biocontrol Ltd., which demonstrated the efficacy of phage therapy in the treatment of chronic otitis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (Wright et al., 2009; Maura and Debarbieux, 2011).

More recent studies indicate that a number of phage particles between 10^2-10^3 plaque forming units (PFU) is adequate to induce replication and therapeutic action at bacterial infections with 10^6-10^9 colony forming units (CFU) per millilitre (Rhoads et al., 2009; Wright et al., 2009; Parracho et al., 2012).

In the aforementioned clinical trials, liquid preparations containing bacteriophages were used and, for these to be effective and used with clinical purposes, it is necessary to promote standardization of the methodologies used, as well as to control the final quality of these products. Thus, there must be an adequate identification and monitoring of bacteriophage preparations for clinical applications, through the combined use of various analytical techniques such as: (i) DNA sequencing; (ii) scanning/transmission electron microscopy; and (iii) Polymerase Chain Reaction. All bacteriophages used in clinical trials conducted in humans must be strictly lytic and duly identified via the referred analytical techniques. The liquid bacteriophage preparations must exhibit adequate stability, and the storage conditions of the preparations should be optimized - the product must not be exposed to extreme variations in temperature, pH and high relative humidity. All phage preparations used in clinical trials should be duly sterilized through procedures properly validated and stipulated by the European Pharmacopoeia. All these parameters are essential to ensure the safety, efficacy and purity of phage preparations (Yang et al., 2010; Jończyk et al., 2011).

In the long term, it is expected to occur a renovation of the current system that is used by the pharmaceutical industry, since the model applied until now is not either the most suitable or compatible one with phage therapy. In this context, two models were set up that may be used in phage therapy: (I) the "conventional medicinal product development", or (II) the "traditional tailormade approach". Therefore, at present, the scientific community is questioning whether it would be more profitable to produce phage preparations on a large scale and sell them as conventional drugs, involving high production costs and taking several months or even years to be developed, as happens with the aforementioned model (I), or to opt for a rational, personalized and flexible model performed in hospitals, as is the case with model (II), involving reduced costs and requiring only a few days or weeks (Merabishvili et al., 2009; Kutter et al., 2010; Pirnay et al., 2011, 2012).

Phage therapy is not exclusively directed towards health care, but is also targeted for the food industry. Despite being a "brain teaser" in the production of fermentation products such as cheeses and yoghurts, as phages destroy the bacteria necessary for the production of these dairy products, phages are used to destroy foodborne pathogens. There are several phage products available in the market, duly approved by the FDA, for the purpose of controlling bacterial infections/contaminations in food production processes. With the availability of these products, at European level (*e.g.* Listex P100TM), the number of infections by *Listeria monocytogenes* has stabilized (Hagens and Loessner, 2010).

Presently, there are phage preparations against several types of bacteria (such as Escherichia coli and Salmonella sp.) to be applied in animal foods and administered before cattle and chickens are killed in slaughter houses (Johnson et al., 2008). Currently, Intralytix Inc., a biotechnology company focused on the production and marketing of bacteriophage-based products targeted to control bacterial pathogens in environmental, food processing, and medical settings, has developed countless phage preparations used in the control of bacteria responsible for contaminating foodstuffs, namely: (i) ListShieldTM, for the control of listeriosis (approved by the FDA in August 2006); (ii) EcoShieldTM, used to prevent food contamination by Escherichia coli; and (iii) SalmoFreshTM, which reduces contamination caused by Salmonella in food and was very recently considered a generally regarded as safe (GRAS) substance by the FDA (Atterbury, 2009; Balogh et al., 2010; Hagens and Loessner, 2010).

As examples, TechnoPhage (http://www.technophage.pt) and Innophage (http://www.innophage.com) are two Portuguese startup companies that promote research and development of new products based on the unique properties of bacteriophages, directed to the treatment, diagnosis and prevention of bacterial infections within the community, hospital and food industries.

Recent technological advances in this field open the door to the possibility of customizing bacteriophages and improve their characteristics, particularly: (i) expand the ability of bacteriophages to penetrate bacterial biofilms; (ii) enlarge their potency and effectiveness; (iii) adapt the spectrum of activities of bacteriophages to infections caused by numerous bacterial species and strains; and (iv) make them more stable and specific (Lu and Collins, 2009; Pouillot et al., 2010; Soto and Ratna, 2010; Maura and Debarbieux, 2011).

In the United States, there is now the possibility of phage particles being integrated in wastewater and potable water treatment systems. The process that is still being studied involves filtering the phages present in the wastewater through nylon filters, and subsequently apply them in wastewater and drinking water, contributing to the increase of their quality and the promotion of public health in general, preventing the spread of multiresistant bacteria (Tamaki et al., 2012; Potera, 2013).

3. Lysins and lysin therapy

Lysins are enzymes produced by bacteriophages that digest the bacterial cell wall and allow the release of the prophage, thus ensuring that new infection cycles are performed. Lysins have been widely tested and applied in various animal models, for the control and treatment of bacteria resistant to conventional chemical antibiotics (Fischetti, 2008; Schmelcher et al., 2012; Schuch et al., 2013).

Small amounts of purified recombinant lysins, exogenously administered in Gram-positive bacteria, showed a high therapeutic efficacy and promoted a quick lysis of the target bacterium. However, the antibacterial ability is limited, because if the lysins are externally applied only Gram-positive bacteria are affected, since these bacterial cells have no external membrane (Fenton et al., 2010). Lysins showed high reliability, specificity and quick ability to promote cell lysis in target bacteria, at mass concentrations in the order of nanograms, strongly reducing the number of microorganisms present, seconds after the addition of the lytic enzyme (Fischetti, 2008; McGowan et al., 2012).

Unlike chemical antibiotics, and as phages, phage lysins are selective and can be used to combat certain bacterial species or specific genus, not affecting the commensal flora, which is their main advantage (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2011; McGowan et al., 2012; Xu et al., 2012).

Lysins, which demonstrate therapeutic antimicrobial activity, are classified according to their catalytic activity (see Fig. 3), as: (i) *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (NAM-amidase); (ii) *N*-acetylmuramidase (muramidases or lysozymes); (iii) *endo*- β -*N*-acetylglucosaminidase (glucosaminidase); (iv) endopeptidase (including L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase); and (v) lytic transglycosylase. In all these types of lysins, the most common ones synthesized by phages are amidases and muramidases (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2010).

After phage replication occurs inside the bacterial cell host, the cell wall needs to be broken down (lysed) in order to release the newly formed virions and ensure the performance of new infectious cycles. Over the years, phages developed two different strategies that allow the release of the phage progeny from the bacterium. The phages with double-stranded DNA developed lytic enzymes (lysins or endolysins) that accumulate in the cytoplasm of the bacterium during the last stage of the lytic cycle and have the ability to hydrolyse the peptidoglycan and cause cell lysis. Lysins are highly effective and evolved over thousands of years, with the main purpose of promoting bacterial lysis. As these hydrolytic enzymes do not have signal sequences (except in the case of lysin gp61, which has a signal sequence that allows itself to go directly to the periplasmic space and act on the cell wall), they cannot cross the cytoplasmic membrane and attack its substrate present in the peptidoglycan layer, and hence they require the help of other phage products, such as holins. Holins are hydrophobic proteins that promote bacterial membrane disruption, by inducing the formation of pores in the inner membrane and thus allow lysin to be exported through the cytoplasmic membrane to the cell wall, so that they may act (Wang et al., 2003; Borysowski et al., 2006; Hermoso et al., 2007; Stojković and Rothman-Denes, 2007; Fenton et al., 2010; Fischetti, 2010; McGowan et al., 2012; Schuch et al., 2013).

3.1. Lysin structure

Lysins from phages with DNA and that infect Gram-positive bacteria usually have a molecular weight ranging from 25 kDa to 40 kDa, except for PlyC, that is specific for *Stretococcus* sp. and have an approximate molecular weight of 114 kDa. The peptidoglycan layer is composed of several chains of sugars, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid, linked by β -1,4-glycosidic bonds, and tetrapeptide chains bonded to the lactyl group of the muramic acid via amide bonds (Donovan et al., 2006).

Lysins are produced and accumulated in the bacterial cytoplasm at the terminal phase of the phage lytic cycle. Generally speaking, since there are some exceptions as is the case with PlyC, lysins are enzymes composed of two protein domains: the catalytic domain, present in the N-terminal region, characterized by providing catalytic activity to the enzyme; and the binding domain, present in the C-terminal region and that allows a connection between the enzyme and the bacterial cell wall. Both domains are separated by a linker (see Fig. 4). The catalytic domain (present in the N-terminal region) is less variable compared to the binding domain (present in the C-terminal region), which may impart different catalytic activities depending on the type of bonds to be hydrolysed (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010; Schuch et al., 2013).

The N-terminal region may be formed by: (i) *N*-acetylmuramidases (muramidases or lysozymes); (ii) *endo*- β -*N*-acetylglucosaminidases (glucosaminidases); (iii) lytic transglycosylases that cleave glycosidic bonds present in the peptidoglycan layer; (iv) endopeptidases that hydrolyze the peptide bonds of the peptidoglycan layer; or (v) *N*-acetylmuramoyl-



Fig. 3. Schematic representation of the bacterial cell wall (a) and of the several types of lysins, their mechanism of action and target in the host cell peptidoglycan (b). Source: adapted from Hermoso et al. (2007).



Fig. 4. Basic structure of lysins, characterized by having two protein domains, N-terminal and C-terminal domains, separated by a "linker". Source: adapted from Fischetti (2008).

L-alanine amidases (amidases) that hydrolyze amide bonds (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010).

Typically, each lysin has only one type of catalytic activity, however, bifunctional lysins were discovered, which possess two independent catalytic domains, capable of catalyzing the cleavage of more than one peptidoglycan bond, as are the cases with (i) phage B30 lysin, composed by muramidase and endopeptidase; (ii) phage φ 11 lysin, specific for *Staphylococcus aureus*, containing endopeptidase and *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, indispensable for its activity to eliminate *Staphylococcus aureus* NCTC8325 biofilm; and (iii) phage K1-5 lysin, that has at its tail a K5 lyase protein and a *N*-acetylneuraminidase (endosialidase), which confers to this phage lysin the ability to act on K1 and K5 strains of *Escherichia coli* (Scholl et al., 2001; Hermoso et al., 2007; Sass and Bierbaum, 2007).

The C-terminal region of the lysins is characterized as being the binding domain to the cell wall (CBD), promoting the binding of lysins to the bacterial host cell wall, more precisely to the carbohydrates present there. This domain has a variable feature, due to the selection made over the years of evolution, with the purpose of recognizing specific bacterial hosts. In order to promote the cell wall digestion and subsequent release of the newly formed phage progeny, it is necessary that the bacterium cell is sensitive to lysin and possess a specific substrate in its cell wall to the C-terminal region of the lysin. Nevertheless, although this domain is variable in relation to the catalytic domain, it is highly specific for a particular substrate present in certain bacteria and binds to components that are essential for bacterial viability, which substantially reduces the number of bacterial resistance and, at the same time, ensures the release of newly formed phage progeny into the extracellular environment (Fischetti, 2008, 2010; Schuch et al., 2013).

In addition, researchers began to realize that different enzymatic domains could be exchanged in lysins, through genetic engineering, giving them simultaneously different specificities for other bacteria and different catalytic activities, leading to the development of chimeric lysins. Hence, some studies show that the catalytic domain of a lytic lysin specific for *Streptococcus pneumoniae* may swap with other domains and thus a new lytic enzyme is created with the same binding domain to the bacterial cell wall, also specific for the pneumococci domain but, at the same time, capable to cleave other types of bonds present in the peptidoglycan layer (Fischetti, 2008, 2010; Manoharadas et al., 2009).

Other scientific studies revealed that there is a synergism between oxacillin, a β -lactam antibiotic, and lysin ClyS, a chimeric enzyme synthesized from the fusion of the N-terminal domain of phage Twort lysin active against *Staphylococcus aureus*, and the C-terminal domain of the phage phiNM3 lysin, leading to protection of mice from infections caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Fischetti, 2008; Daniel et al., 2010; McGowan et al., 2012).

According to McGowan et al. (2012), the most powerful and complex lysin identified to date is the phage PlyC lysin. This lytic enzyme is produced by phage C1 and consists of two protein domains, PlyCA and PlyCB, which have therapeutic activity exclusively against *Streptococcus* sp. from groups A, C and E, including *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus equi*. Both protein domains are transcribed from two genes located on the same operon. The PlyCB is composed of 8 subunits which allows the bonding to the bacterium cell wall. PlyCA is responsible for the catalytic activity, and has two distinct catalytic domains, namely amidase and glycosidase. Thus, this endolysin can hydrolyze different types of peptidoglycan bonds present in the bacterial cell wall, making it the most potent lysin described so far. However, a small mutation in the catalytic domain can reduce the activity of this lysin by ca. 90% to 99% (Nelson et al., 2001, 2006; McGowan et al., 2012).

Bacteria have also developed a range of lysins named as autolysins, which hydrolyze the β -(1,4) bond between *N*acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine of its own bacterial cell wall, and which are involved in the cell division processes. When produced in high concentrations, autolysins may induce cell death due to the difference of osmotic pressure between the bacterium and the external environment (Hermoso et al., 2007).

3.2. Advantages, disadvantages and limitations of antimicrobial therapy with lysins

There are several advantages associated to the use of lysin therapy, compared to conventional antimicrobial chemotherapy, namely: (i) phage lysins are selective and have a limited spectrum of action, so they may be used to fight only certain bacterial species or genus, not affecting the commensal flora; (ii) dilute concentrations of lysin preparations will be enough to reduce exponentially the number of viable bacteria, seconds after application of the lytic enzyme; (iii) to date, no bacterial resistance to these enzymes has been reported, due to the co-evolution process of billions of years established between phages and bacteria, leading to the development of a C-terminal region highly specific to molecules present in the wall of the host and that are essential to its viability; (iv) several studies have shown that there is a synergism between antibiotics and lysins; (v) bacteriophages are the most abundant entities on the planet, therefore there is a considerable number of lysins available for therapeutic applications; (vi) a number of pre-clinical tests in vivo have shown that antimicrobial therapy with lysins do not produce disturbing side effects; (vii) when applying different lysins possessing the same binding domain and different catalytic activities, there is a synergism between them, hence optimizing the therapeutic activity and, at the same time, reducing the possibility of resistant bacterial strains to emerge; (viii) there are already chimeric lysins active against MRSA strains; (ix) lysins exhibit a high antibacterial activity, even against antibiotic-resistant bacteria; (x) unlike penicillin and cephalosporin, which inhibit the peptidoglycan synthesis and induce lysis of bacterial cells that are in the phase of cell division, lysins destroy the peptidoglycan directly, causing osmotic lysis of all specific bacteria; (xi) lysins are thermostable and can withstand temperatures up to ca. 60 °C; and (xii) lysins have simple synthesis processes and can be synthesized and purified in high quantities at a reduced cost, rendering them an excellent and innovative antimicrobial therapeutic strategy (Jado et al., 2003; Loeffler et al., 2003; Matsuzaki et al., 2005; Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010; Daniel et al., 2010; Fenton et al., 2010; Wu et al., 2012; Rodríguez-Rubio et al., 2013).

Concerning the disadvantages and limitations associated with the application of these purified lytic enzymes in the treatment of (pathogenic) bacterial infections, these are correlated to the production of antibodies by the (human) host. Unlike chemical antibiotics, which are small and non-immunogenic, lysins are peptides that stimulate the immune response, regardless of the way in which they are administered in the body, leading to the formation of antibodies that can reduce the activity of the lysin in vivo. Nevertheless, several studies conducted in hyper-immunized mice against phage lysin Cpl-1 proved that antibodies raised against the enzyme only slow down its lytic activity, without blocking it, without causing side effects. It is thought that this effect is due to a greater specificity of the lysin for the bacterial cell wall than the affinity of the antibody to the lysin, which prevents the antibody from inhibiting the catalytic domain of the lysin molecule (Loeffler et al., 2003; Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010). Another drawback or limitation of the lysin-based antimicrobial therapy is that, as mentioned before, when lysins are administered exogenously, they are only active against Gram-positive bacteria, since Gram-negative bacterial cells possess an outer and impermeable membrane to these enzymes. But there is a lysin produced by a phage active against *Bacillus amyloliquefaciens*, that displays a lipophilic amino acid sequence in the C-terminal region, which allows it to cross the outer membrane and overcome this issue (Orito et al. 2004)

Another possible limitation of lysins is correlated with their narrow spectrum of action. Depending on the clinical situation, it may be necessary to broaden such spectrum by combining different types of lysins in order to prevent the development of bacterial resistance and infections caused by more than one bacterial species (Wu et al., 2012).

Several studies reported in the specialty literature have not found bacterial resistance to this innovative antimicrobial therapeutic strategy, even after 40 cycles of exposure to low concentrations of these lytic enzymes (Schuch et al., 2002; Fischetti, 2008, 2010). This can be explained, as stated above, by the coevolution process of billions of years, established between bacteria and their natural predators (*i.e.*, phages), to ensure that the phage progeny would not be retained within bacterial cytoplasm, and for this purpose a C-terminal region was developed in lysin molecules, displaying a very high specificity towards essential molecules for bacterial viability. This rationale explains the fact that lysins specific to streptococci and pneumococci possess, as receptors on the surface of the bacterial cell, amino alcohol (choline) and rhamnose, respectively, which are essential to the viability of the bacteria and their growth. Finally, it is noted that this co-evolution mechanism converts the bacterial resistance into an extremely rare event, making therapy with lysins extremely advantageous over conventional chemical antibiotics (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010; Rodríguez-Rubio et al., 2013).

In a quite recent study conducted by Rodríguez-Rubio et al. (2013), no bacterial resistance to lysins was detected even after 10 cycles of exposure to three types of lysins specific for *Staphylococ-cus aureus*, either in liquid culture or on agar plates, indicating that

lysin therapy may be an excellent alternative antimicrobial therapy to combat infections caused by this bacterium.

3.3. Applications of lysin therapy

3.3.1. Lysins in medicine and biotechnology

Since lysins exhibit a high antibacterial activity because they hydrolyze covalent bonds present in the bacterial cell wall, promoting a rapid lysis of the bacterial cell, lysins may be a possible and feasible strategy in the near future for the treatment of various bacterial infections caused by (but not limited to) (i) *Enterococcus faecalis*, (ii) *Enterococcus faecium*, (iii) *Clostridium perfringens*, (iv) *Bacillus cereus*, (v) *Staphylococcus aureus*, and (vi) *Bacillus anthracis* (to prevent and control biological weapons such as anthrax caused by this pathogenic bacteria), via intraperitoneal administration of lysin PlyG produced by phage γ (Borysowski et al., 2006; Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010; Proença et al., 2012; Rodríguez-Rubio et al., 2013; Schuch et al., 2013).

Three studies performed in animals have shown that a single dose of lysins, administered topically, drastically reduces (even to levels below the limit of detection) the amount of bacteria present in oral, nasal and vaginal mucosa. Although lysins display a short half-life, between ca. 15–20 min, this timeframe is enough to guarantee the antibacterial action of these lytic enzymes. It is possible, however, to expand this timeframe of action via modification of the Fc region (crystallizable fragment, at the lower region of the antibody responsible for modelling the cellular immune response upon binding of antibody to antigen (*i.e.*, the lysin moiety)) of the antibodies that neutralize these enzymes (Nelson et al., 2001; Loeffler et al., 2003; Cheng et al., 2005; Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008, 2010).

Presently, several intensive studies have been conducted involving intraperitoneal administration of lysins, such as Dp-1 and Cp-1, directed against *Streptococcus pneumoniae*, not only because this bacterium exhibits a high degree of resistance to the chemical antibiotics available in the market, but also because it causes pneumonia, meningitis, septicemia and otitis in children and immunocompromised hosts (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2010).

In one of such studies, a group of mice was infected with *Streptococcus pneumoniae* and, one hour after infection, they were intraperitoneally administered with a *bolus* (administration of a drug in order to quickly raise its concentration in blood plasma) of 2.0 mg lysin Cpl-1. After 48 h of administration, it was found that only 20% of the animals survived and that these were free from the pathogenic bacterium, demonstrating that it would require multiple applications (diluted) of the same *bolus*, or a parenterally administered solution, in order to eliminate all pathogenic bacteria from the body of the animals artificially contaminated (Jado et al., 2003; Rashel et al., 2007; Fischetti, 2008).

Recently, lysins have been applied in the treatment of bacterial infections in poultry caused by *Clostridium perfringens*, responsible for causing food poisoning and necrotic enteritis. Initially, a group of researchers tried to apply a treatment containing phages but, as more than 50 pathogenic strains of these bacteria were discovered, it would be necessary to associate the phage preparations in a complex cocktail containing over 20–30 kinds of phages. These researchers opted, therefore, to administer a combination of a group of lysins in the form of an enzyme cocktail containing peptidases, amidases and lysozymes, producing in this way a more effective antimicrobial therapy (Volozhantsev et al., 2011; Potera, 2013).

3.3.2. Synergism between lysins and antibiotics

Presently, several lysins were isolated from active bacteriophages against *Streptococcus pneumoniae*, in particular Cpl-1 (a muramidase) and Pal (an amidase), which possess the same binding domain (C-terminal) to the peptidoglycan layer of the host, but exhibit different catalytic activities. These enzymes were administered intraperitoneally and concomitantly, in amounts of 2.5 µg, one hour after infection of mice with Streptococcus pneumoniae, and succeeded in hindering the spread of pathogenic bacteria. However, the same did not occur when these lytic enzymes were administered separately, even in amounts of 5.0 µg. This clearly indicates that these enzymes act synergistically when they are administered simultaneously in vivo and, thus, they increase the therapeutic efficacy compared to the use of only one type of lysin. Interestingly, other studies show that the use of two enzymes with different catalytic activities, with the aim of combating the same pathogen, can also slow down the infection and even significantly reduce the emergence of new bacterial strains resistant to lysin (Jado et al., 2003; Fischetti, 2008; Daniel et al., 2010). It is also important to note that the association of lysin Cpl-1, isolated from bacteriophages active against Streptococcus pneumoniae, with gentamicin and penicillin, demonstrated a synergism between the different therapeutic agents applied, causing a drastic reduction in the number of that bacterium (Jado et al., 2003; Fischetti, 2008; Daniel et al., 2010).

3.3.3. Other applications of lysin therapy

Lysins can also benefit the health of the animal, preventing the dissemination of zoonosis and even preventing the transmission of pathogenic bacteria in food. For example, Ply700 (a lysin with lytic activity against *Streptococcus* sp.) and LysH5 (a lysin with lytic activity against *Staphylococcus aureus*) both have the ability to inhibit the proliferation of bovine mastitis thus avoiding contamination of milk and cheese (Celia et al., 2007; Obeso et al., 2008; Fenton et al., 2010).

Another phage enzyme applied in this area is PlyC lysin, which can also act as a particular antiseptic against *Streptococcus equi* (a bacterium responsible for causing infections in horses) preventing the transmission and dissemination of this bacterium. Additionally, PlyC lysin proved to be advantageous relatively to chemical antiseptics since these may be toxic to the animals, harmful to the environment and quickly lose their activity (Hoopes et al., 2009; Fenton et al., 2010).

As already stated above, lysins can also be applied in the food industry, as is actually the case with lysin Ply3626, which exhibits lytic activity against *Clostridium perfrigens*, a pathogenic bacterium responsible for causing food poisoning and high costs in the world of poultry production (Zimmer et al., 2002; Fenton et al., 2010).

Finally, lysins can also be applied successfully as diagnostic tools in the study of certain bacteria, since the current methods used, for example, in the detection of infections caused by *Bacillus anthracis* in humans, are quite time demanding and slow to produce results, which hamper implementation of treatment. One result is the work developed by Schuch et al. (2002), who developed a method using lysin PlyG that, after its addition, degrades the bacterial cell wall releasing ATP from the bacillus, which is then detected by a sensor, providing a diagnosis within a timeframe of 15 min.

More recently, a study conducted by Schuch et al. (2013) revealed that, due to the fact that lysins can recognize specific molecules on the surface of bacterial cells, which are essential to their viability, lysins can be applied in the identification of specific pathogenic bacterial receptors and thus help to develop new molecules capable to inhibit the biosynthesis of these receptors and reduce exponentially the number of resistant bacterial strains and block their proliferation. Hence, these researchers used a PlyG lysin specific to *Bacillus anthracis* to identify a neutral polysaccharide composed of galactose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmannosamine. Subsequently, they discovered the 2-epimerase, an enzyme involved in the biosynthesis of that polysaccharide, and synthesized a specific inhibitor of the 2-epimerase, named EpimeroxTM. This new molecule showed



Cationic region (binds to the negatively charged bacterial membrane)

△ Hydropathic (hydrophobic or hydrophilic) aminoacid moiety

• Any type of aminoacid moiety

O Positively charged aminoacid moiety

Fig. 5. Schematic basic structure of AMPs, showing a hydrophobic region that inserts into the bacterial cell membrane lipid bilayer and a cationic region essential for binding to the negatively charged bacterial cell membrane. Source: adapted from Baltzer and Brown (2011).

promising results, both *in vitro* and *in vivo*, efficiently inhibiting the proliferation of *Bacillus anthracis* in mice.

4. Antimicrobial peptides

Antimicrobial peptides (AMPs) were first discovered back in 1922, when Alexander Fleming (1929) discovered lysozyme, an enzyme with antibacterial activity which was present in the tears and urine of humans. Currently, there are more than 1700 antimicrobial peptides known to man (Jenssen et al., 2006; Bruhn et al., 2011), some of which may be found in Table 2.

The galloping increase of bacterial resistance to chemical antibiotics and the possibility of these pharmaceutical compounds losing their effectiveness in the treatment of bacterial infections in the next five years, exponentially increased the interest of both researchers and pharmaceutical industries in the application of AMPs as therapeutic antimicrobial agents (Seo et al., 2012; Björn et al., 2012; Carlet et al., 2012b).

AMPs are polypeptides consisting of endogenous 12–50 aminoacids, synthesized via the ribosomal way. These peptides are ubiquitous in nature and generally possess a cationic (due to the presence of aminoacids such as cysteine and lysine, which are necessary for binding to the membrane) and amphipathic structure, having a hydrophobic and a hydrophilic domain, which is indispensable to promote the disruption of the bacterial cell membrane (see Fig. 5). AMPs exhibit a broad spectrum of action and constitute a defense strategy of both animals and plants against several types of bacteria, fungi and viruses (Zasloff, 2002; Baltzer and Brown, 2011; Fernebro, 2011; Laverty et al., 2011; Seo et al., 2012).

AMPs have various (perceived) functions, viz. (i) stimulate the accumulation of immune cells (neutrophils, macrophages and lymphocytes) at the site of infection, (ii) neutralize lipopolysaccharide endotoxins produced by Gram-negative bacteria, (iii) accelerate wound repair, (iv) stimulate angiogenesis, (v) control immune system responses against a particular microorganism, behaving as immunomodulators, and (vi) possess anti-inflammatory properties. Additionally, these endogenous polypeptides are active against multidrug-resistant bacteria. The extension of bacterial resistance

Table 2

Examples of several AMPs (antimicrobial peptides), considering their structure, number of disulfide bonds, source and mechanism of action

Example of antimicrobial peptide	Three- dimensional structure	Peptide structure (ribbon model) obtained from the Protein Data Bank	Number of disulfide bonds	Source	Mecanism of action
Magainin	α-helix	The second se		Frog	Permeabilizes bacterial membrane
Cecropin A Mellitin LL-37 Buforin II	α-helix α-helix α-helix α-helix/extended		 	Silk moth Bee Human Toad	Membrane destabilizing Membrane destabilizing Membrane permeabilization Binding of nucleic acid
α and $\beta\text{-Defensins}$	β-sheet	e e e e e e e e e e e e e e e e e e e	3	Mammals, with analogues in insects and fungi	Cell membrane and intracellular targets, inhibits macromolecular synthesis
Protegrin	β-sheet			Human, porcine	Very potent, membrane
Polyphemusin	β-sheet			Horseshoe crab	Very potent, translocates into cells
Indolicidin	Extended	S		Bovine	Inhibits macromolecular synthesis and interacts with Ca ²⁺ calmodulin
PR-39	Extended			Porcine	Inhibits DNA/RNA/protein
Thanatin	Loop structure		1	Insect (spined soldier bug, <i>Podisus</i> maculiventris)	Active against multiple Gram negative and Gram positive bacteria and fungi, but the mechanism underlying its bactericidal effect is still not understood
Defensin RTD-1	Cyclic		3	Monkey (Rhesus macaques)	Cell membrane and intracellular targets, inhibits macromolecular synthesis

Source: adapted from Jenssen et al. (2006) and Bruhn et al. (2011).

to these potentially therapeutic moieties tends to be reduced, due not only to the process of co-evolution between bacteria and these peptides over millions of years, but also to their mechanism of action, making them a possible alternative strategy to antibiotics in promoting the treatment of topical and possibly systemic bacterial infections (Bruhn et al., 2011; Laverty et al., 2011; Seo et al., 2012).

Although most of AMPs exhibit a cationic structure, some of them have an anionic structure rich in aspartic and glutamic acids, such as AMPs maximin-H5 (an anionic antimicrobial peptide from amphibians) and dermcidin (secreted by the human eccrine sweat glands and also acting as natural defense systems of the immune system of eukaryotic cells). These peptides can also adopt α -helical or β -sheet conformations, which provides them with an amphi-

pathic structure, essential for the interaction with the bacterium cell membrane. However, anionic AMPs such as daptomycin, unlike cationic ones, require cations like zinc, which act as cofactors, essential for binding anionic peptides to the bacterium cell membrane (which is also anionic) and subsequent penetration, with consequent inhibition of ribonuclease, inducing cell death (Laverty et al., 2011).

4.1. AMP structures, properties and mechanisms of action

In structural terms, AMPs are (poly)peptides consisting of less than 100 amino acids encoded by single genes. They are synthesized during inflammation or in the presence of molecules produced by pathogenic agents (Bruhn et al., 2011). AMPs are subdivided into four groups based on their secondary structure and amino acid composition: (i) peptides with a α -helical structure; (ii) peptides with a β -stranded structure – stabilized by two or three disulfide bridges, (iii) linear peptides that have a disordered structure in hydrophilic solutions but, under physiological conditions and hydrophobic environments, after contact with the lipid bilayer membrane they acquire an α -helix amphipathic structure, and (iv) peptides with a loop structure. However, there are peptides that do not fall within this classification, such as those with a cyclic structure (see Table 2) (Jenssen et al., 2006; Baltzer and Brown, 2011; Bruhn et al., 2011; Cho et al., 2012; Nakatsuji and Gallo, 2012; Seo et al., 2012).

The type of structure of AMPs is directly correlated to their size, mechanism of action, hydrophobicity, net charge, and polar angle (Cho et al., 2012). The structure of amphipathic AMPs is a key feature essential to their mechanism of action, since the hydrophobic region is responsible for the interaction with specific lipids present in bacterial cell membranes (such as lipoteichoic acids, present in Gram-positive bacteria, and the phosphate groups of lipopolysaccharides (LPS) present in Gram-negative bacteria), whereas the hydrophilic region of the peptide is responsible for the interaction with the phospholipid heads or the lumen of the bacterial cell membranes (Jenssen et al., 2006).

It is essential to note that AMPs do not affect the eukaryotic cells, because their cell membrane is composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, cholesterol and ergosterol, with a neutral net charge, which prevents the AMPs from affecting eukaryotic cells, since they are repelled. Unlike eukaryotic cells, prokaryotic cells (in particular, bacteria) have a cell membrane with a negative net charge due to the presence of phosphatidylglycerol, cardiolipin and phosphatidylserine, which makes AMPs specific for their phospholipid bilayer. This significantly reduces any potential toxic effects on the host cells and, at the same time, contributes to a significant reduction of potential bacterial resistance to this innovative antimicrobial therapeutic strategy (Jenssen et al., 2006; Baltzer and Brown, 2011; Laverty et al., 2011).

Concerning the mechanism of action of AMPs, they promote, in general, the disruption of the cell membrane, via pore formation and subsequent cell lysis (see Fig. 6). Initially, there is an electrostatic interaction between the positively charged peptide and the negatively charged bacterial cell membrane. Subsequently, the peptide structure is inserted into the phospholipid bilayer membrane and then the peptide aggregates, leading to the formation of a complex structure that promotes the formation of pores in the membrane and consequent cell lysis (Cho et al., 2012). There are 4 putative mechanistic models that explain in detail the mechanism of action of different types of AMPs (see Fig. 6).

In the first model, known as the "aggregate" model, AMPs bind to the phospholipid bilayer via electrostatic interactions and, thereafter, becomes inserted into the membrane by promoting the formation of complexes between peptides and lipids thereby leading to the formation of pores without a specific orientation, with different sizes and shapes, which induce the depletion of ions (see Fig. 6A). In the second model, known as the "toroidal pore" model, and following the initial electrostatic interaction, the AMP reorients itself perpendicularly to the plane of the cell membrane. Then, the hydrophilic region of the peptide interacts with the phospholipid structure of the membrane and the peptidic hydrophobic region interacts with the lipid core, leading to the formation of a pore with a specific orientation (see Fig. 6B). In this model, the membrane suffers an invagination with a positive curvature, leading to the formation of a small hole, maintained by electrostatic repulsions of the heads of the phospholipids, in which the peptide is aligned (see Fig. 6B). In the third model, known as "barrel-stave" model, formation of pores in the membrane by the AMPs occurs through a barrel-shaped cluster; in a first phase, peptide binds to the membrane via electrostatic interactions and becomes inserted perpendicularly within the membrane, after which, in a second phase, while the hydrophobic region of the peptide structure binds to the lumen of the bacterial cell membrane forming the outer portion of the pore, the hydrophilic portion of the peptide makes the internal portion of the pore. The pore size depends both on the number of peptides in the aggregate and on the lipid characteristics of the membrane (see Fig. 6C). Finally, in the fourth model, known as the "carpet" model, some AMPs are aligned together in a position parallel to the membrane phospholipid bilayer, covering the location like a carpet. When the number of peptides in place reaches a certain concentration, an emulsion is formed which leads to the destabilization of the membrane, promoting the formation of micelles and pores in the bacterial cell membrane (see Fig. 6D) (Jenssen et al., 2006; Baltzer and Brown, 2011; Cho et al., 2012; Laverty et al., 2011; Seo et al., 2012).

It is important to note that not all AMPs act only by disrupting the cell membrane; some of them promote the death of bacterium cells without reaching the minimum effective concentration, since they are accumulated intracellularly. Such AMPs can inhibit essential processes for cell viability, viz. (i) DNA replication or mRNA synthesis, when AMPs reach their minimum inhibitory concentration, as it happens with buforin II, pleurocidin and dermaseptin; (ii) protein synthesis, by indolicidin and PR-39; (iii) rearrangement of protein, promoted when pyrrhocoricin binds to chaperone hsp70 and prevents proper protein folding, which leads to an accumulation of inactive proteins and subsequent cell death (pyrrhocoricin is a highly active antibacterial peptide isolated from insects, which inhibits chaperone-assisted protein folding via binding to the 70 kDa heat shock protein DnaK via its amino terminal half, whereas its C-terminus functions as an intracellular delivery module); (iv) activity of some anionic cytoplasmic enzymes, by AMPs with an extremely positive charge; and (v) lipid II transglycosylation, an essential process for peptidoglycan synthesis by lantibiotics (nisin and mersacidin) (see Fig. 6E-H) (Bencivengo et al., 2001; Jenssen et al., 2006; Baltzer and Brown, 2011; Cho et al., 2012; Laverty et al., 2011; Seo et al., 2012).

Recently, it was discovered that papiliocin induces the production of oxygen free radicals, which are responsible for damaging the DNA, the cell membrane and mitochondria, inducing apoptosis and consequent cell death. However, in the context of a bacterial infection, it is likely that AMPs exhibit more than one mechanism of action simultaneously (Cho et al., 2012).

4.2. Advantages and disadvantages of AMPs for antibiotherapy

In terms of the advantages of using AMPs as therapeutic agents in antibiotherapy, the following considerations must be taken into account: (i) the mechanism of action of AMPs is performed in essential components that are present in the bacterial cell membrane, compromising cell viability; (ii) several AMPs exhibit simultaneous antibacterial, antifungal and antiviral activity and, in cases of infections by multiple biological entities, only one therapeutic agent is effective; (iii) AMPs demonstrate therapeutic antimicrobial activity in extremely low amounts, in the order of micrograms and nanograms; (iv) AMPs exhibit a wider spectrum of action; (v) they are found in high concentrations in the site of action, *i.e.*, the site of infection; (vi) AMPs also exhibit anti-inflammatory activity; (vii) the probability that bacteria develop resistance to this new therapeutic approach is reduced; (viii) AMPs act very quickly; (ix) AMPs inhibit biofilm formation; (x) AMPs interact with bacterial cells which are, or not, in the process of cell division; and (xi) AMPs demonstrate synergism when administered in conjunction with chemical antibiotics (Gordon et al., 2005; Bruhn et al., 2011; Björn et al., 2012; Devocelle, 2012; Seo et al., 2012).



Fig. 6. The various putative mechanistic models for the action of AMPs.

Source: adapted from Jenssen et al. (2006).

However, when applied as therapeutic agents AMPs also demonstrate some disadvantages, viz. (i) they are susceptible to the action of proteases, easily losing activity, which may constitute a limiting factor when promoting the administration of AMPs to a systemic extent; (ii) AMPs can be cytotoxic for various host cells, namely when administered in high concentrations, and may destabilize cell membranes eventually leading to their disruption; (iii) AMPs are influenced by pH variations and may lose activity when administered in environments with low concentrations of salts or when interacting with plasma proteins; (iv) AMPs have high costs of production and purification; (v) AMPs can produce toxic effects both at a systemic and a topical extent; (vi) they may induce sensitivity and allergies after several applications; (vii) AMPs are not yet well studied from the "pharmacokinetics", "pharmacodynamics" and "toxicological" perspectives; and (viii) AMPs exhibit low stability due to the fact that they are mainly composed of L-aminoacids, thus being more susceptible to proteolysis (Gordon et al., 2005; Bruhn et al., 2011; Devocelle, 2012; Seo et al., 2012; Slaninová et al., 2012).

4.3. Bacterial resistances to AMPs

Back in 2002, Zasloff stated that bacterial resistances to this innovative antimicrobial therapeutic strategy would be



Fig. 7. Putative mechanism of both Gram-positive and Gram-negative bacterial resistance to AMPs mediated by changes in the net surface charge of the bacterial membrane. Source: adapted from Nizet (2006).

improbable, since AMPs have, as receptors, essential structures for bacterial viability.

However, a study conducted by Kristian et al. (2003) revealed that, a series of mutations in the operon dltABCD of Staphylococcus aureus that induced an overexpression of this operon, made this bacterium capable of neutralizing the negative charge of its own membrane via incorporation of high concentrations of D-alanine (Dalanylation process) and L-lysin (when mutation occurs in the mprF gene). These mutations led to a reduction in the negative charge of the bacterial membrane, which is essential for the electrostatic interaction between the AMP and the bacterium, resulting in repulsion of the antibacterial peptide and subsequent resistance of the bacteria to the AMP, as can be seen in Fig. 7 (see Fig. 7I and II). It is important to mention that the same applies to Gram-negative bacteria, by modifying the LPS present in the outer membrane, comprising the incorporation of long chain fatty acid moieties and thus reducing membrane permeability to AMPs and increasing membrane stability.

The resistance to antimicrobial peptides is also directly correlated with (i) the introduction of 4-aminoarabinose (Ara4N) in lipid A phosphate groups (anionic dimmers of glucosamine linked to a fatty acid chain surrounded by phosphate groups) caused by mutations in genes pmrE and pmrHFIJKLM of Gram-negative bacteria (see Fig. 7III); (ii) the acetylation of lipid A caused by a mutation in genes pagP and htrB that causes a decrease in the permeability of the outer membrane of Gram-negative bacteria; (iii) a mutation in the gene kasB that promotes the synthesis of short chain mycolic acids in its outer membrane and drastically reduces its permeability to AMPs; (iv) a mutation in gene *emm*1 which stimulates the production of M1 protein that is found in bacterial cell wall and binds to AMP, blocking its mechanism of action (see Fig. 8I); (v) the production of extracellular proteases that synthesize dermatan sulfate, a glycosaminoglycan that stops the mechanism of action of α -defensing, as is the case with *Pseudomonas aeruginosa* and *Ente*rococcus faecalis (see Fig. 8II); (vi) the synthesis of proteins that neutralize, or bind to, the AMP, preventing it from acting and, at the same time, preventing the minimum concentration to be reached so as to perform a bactericidal action, as is the case with staphylokinase from Staphylococcus aureus, which binds to α -defensins (AMP produced by human neutrophils) of the body and prevents them

from acting (see Fig. 8III); (vii) the presence of efflux pumps that expel AMPs to the periphery of the membrane, preventing them from acting, as what happens with the efflux pump MtrCDE synthesized by *Neisseria gonorrhoeae* (see Fig. 9I); (viii) the synthesis of proteases that cleave the AMPs at the extracellular level, promoting their denaturation, as is the case with aureolysin, a metalloprotease synthesized by *Staphylococcus aureus* that inactivates LL-37 (see Fig. 9II); and (ix) formation of biofilms that reduce contact between bacteria and AMPs, hence preventing them from acting (Nizet, 2006; Baltzer and Brown, 2011; Laverty et al., 2011).

4.4. Potential applications of AMPs

There are numerous factors that make AMPs a potential and innovative alternative strategy to current conventional antibiotics, viz. (i) they may be employed as anti-infective agents; (ii) they may be applied simultaneously with several conventional antibiotics and antiviral drugs, and there may be even synergistic effects between them; (iii) they may be applied as immunomodulators, stimulating the immune system; and (iv) they neutralize bacterial endotoxins and prevent, for example, septic shock (Gordon et al., 2005; Baltzer and Brown, 2011; Kosciuczuk et al., 2012).

Despite the numerous advantages to establish themselves as a new and alternative therapeutic strategy to current antibiotics, few AMPs have been accepted by the FDA and the EMEA up to now. The application of AMPs, at the moment, is limited to topical formulations. To obtain the therapeutic antimicrobial effect in *in vivo* clinical trials, high concentrations of AMPs are required at the site of infection, but such high concentrations are very close to the toxic doses; additionally, AMPs have a small size and are filtered in the kidneys, which drastically reduces their half-life (Giuliani et al., 2007; Park et al., 2011; Yeung et al., 2011).

The first AMP developed was pexiganan, a synthetic analogue of magainin 2 (obtained from the African clawed frog, *Xenopus laevis*) consisting of 22 aminoacids, which was administered as a cream for topical applications, called LocilexTM, in the treatment of feet ulcers in diabetic patients; however, it was not approved by FDA due to the lack of efficacy in phase II clinical trials (Giuliani et al., 2007; Park et al., 2011).





Fig. 8. Mechanism of bacterial resistance to AMPs via binding to surface proteins on the bacterial cell.

Source: adapted from Nizet (2006).



Fig. 9. Mechanism of bacterial resistance to AMPs via efflux pumps and aureolysinmediated degradation. Source: adapted from Nizet (2006).

Presently, there are several AMPs in both preclinical testing and clinical trials, which demonstrate various therapeutic activities, such as: (i) MBI-226 (omiganan) cationic peptide, a synthetic analogue of indolicidin with an extended spectrum of action, used in the treatment of blood infections caused by catheters; (ii) XOMA 629 and Migenix MX-226, active against Propionibacterium acnes, used in the treatment of acne; (iii) Migenix MX-226, which has antiinflammatory activity since it suppresses the release of cytokines by the body, stimulated by the presence of Propionibacterium acnes in the skin; (iv) iseganan (IB-367), a synthetic cationic AMP with a broad spectrum of activity against bacteria and fungi, used in the treatment of respiratory infections, cystic fibrosis and mouth ulcers; (v) P113, a cationic peptide consisting of 12 aminoacids present in saliva, exhibiting a high therapeutic activity in vitro against Candida albicans, with potential to be used in the treatment of oral candidiasis in people infected with HIV; (vi) DPK-600 peptide, which is in phase IIa clinical trials for the treatment of atopic dermatitis; (vii) plectasin, the first AMP obtained from a fungus, Pseudoplectania nigrella, active against Streptococcus pneumoniae (McInturff et al., 2005; Mygind et al., 2005; Fernebro, 2011; Brandenburg et al., 2012).

At the moment, the AMPs accepted/approved by FDA and already on the market are polymyxins B and E (colistin) and daptomycin. Daptomycin is an anionic lipopeptide (a peptide associated with a lipid structure, which confers it therapeutic activity against bacteria and fungi) naturally produced by Streptomyces roseosporus. It is used to treat skin and mucosa infections caused exclusively by Gram-positive bacteria. It has been demonstrated that daptomycin may be applied in the treatment of infections caused by Staphylococcus sp. and endocarditis caused by Enterecoccus sp. and, in the United Kingdom, it has been already commercialized in the form of an injectable formulation called Cubicin[®] (Livermore, 2008; Yeung et al., 2011; Laverty et al., 2011; Brandenburg et al., 2012).

Polymyxins B and E are cationic lipopeptides discovered between 1940 and 1950, which were isolated from Bacillus polymyxia and have a cyclic structure associated with a lipid component in the N-terminal, responsible for their therapeutic antimicrobial activity. These cationic AMPs lie within phagocytes and at the surface of different epithelia in the body, acting as a natural defense mechanism. There are already available on the market several pharmaceutical formulations containing these lipopeptides, indicated in the treatment of skin and eye infections caused by Gram-negative bacteria. Polymyxin E, known as colistin, may also be administered parenterally in the form of colistin methanesulfonate, a prodrug indicated in the treatment of septicemia in cystic fibrosis, skin, urinary, and respiratory infections caused by Pseudomonas aeruginosa (Li et al., 2005; Cirioni et al., 2007; Yeung et al., 2011; Laverty et al., 2011; Brandenburg et al., 2012).

Relatively recently, Yan et al. (2011) discovered in the scorpion poison, the Hp1090, an AMP with a α -helical and amphiphilic structure, active against the hepatitis C virus (HCV). This virus is mainly responsible for causing chronic hepatitis, associated with cirrhosis and hepatocellular carcinoma and, until nowadays, there is no cure or vaccine against HCV. Thus, the Hp1090 appears as a potential therapeutic strategy because it inhibits replication of HCV RNA and prevents viral infection by directly damaging its membrane, at a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 7.62 μ g/mL (500 μ M).

BmKn2, a peptide that has antibacterial activity, was recently isolated from the scorpion (*Mesobuthus martensii*) poison. Subsequently, BmKn2 originated a mutant peptide named Kn2-7, which a exhibits greater therapeutic antimicrobial activity and reduced hemolytic effects, compared to the original BmKn2 peptide, since due to the substitution of aminoacids at its hydrophilic portion, it has a higher positive charge, which facilitates electrostatic interactions between the peptide and the bacterium cell wall (Cao et al., 2012). Application of the topical formulation containing AMP Kn2-7 in mice infected with *Staphylococcus aureus* promoted healing of the skin infection within a timeframe of 4 days, indicating that this is a potential therapeutic antimicrobial agent for external

against *Staphylococcus aureus*, AMP Kn2-7 is also active against several other Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* and *Micrococcus luteus*, Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and even against antibiotic multiresistant bacteria (Cao et al., 2012). According to these authors, Kn2-7 displays a greater activity than BmKn2, and the MIC for Kn2-7 to be used in the treatment of bacterial infections caused by Gram-negative bacteria. Additionally, according to Chen et al. (2012), peptide Kn2-7 also demonstrated to be the most active against HIV-1, with a half maximum effective concentration (EC₅₀) of 2.76 µg/mL, exhibiting a high tropism to HIV virus and effectively inhibiting its replication; however, and despite the fact that this study clearly shows that AMPs also possess anti-viral activity, the mechanism of action of

applications. Additionally, it was found that, besides being active

Kn2-7 is not yet cleared. Cationic AMPs may also be applied in the treatment of tumoral cells, since such cells possess in the external membrane high concentrations of phosphatidylserine and *O*-glycosylated mucins (3–7 times higher than those values for normal cells), giving them a negative surface charge and making them a potential target for cationic AMPs.

AMPs bind to the tumor cells via electrostatic interactions and induce pore formation in the cell membrane, promoting the release of cytoplasmatic electrolytes and subsequent cell death. Some cationic AMPs can induce apoptosis by stimulating the synthesis of oxygen reactive species, such as hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and superoxide anions, which accumulate intracellularly. Subsequently, these peptide entities promote changes in the mitochondrial membrane, depolarization and release of cytochrome c, which induces the activation of caspase that, in turn, induces DNA and nucleus changes with concomitant changes in cell morphology and ultimately leading to cell death. There are a few examples, viz. (i) cecropin B, isolated from Hyalophora cecropia, which exhibits antitumor and antiproliferative activity in bladder tumor cells without affecting fibroblasts (control cells) following administration of $65 \mu M$ peptide; (ii) LL-37, which is present in the granules of neutrophils, involved in the mechanisms of innate immunity and immunomodulatory and anti-infectious activities; (iii) bovine lactoferrin, an iron carrier glycoprotein that inhibits proliferation of MDA-MB-435 breast tumor cells and THP-1 tumor cells involved in monocytic leukemia (Suttmann et al., 2008; Cho et al., 2012; Pushpanathan et al., 2013).

It is essential to note that AMPs can also be applied in the prevention of bacterial biofilm formation. The cationic peptide LL-37, apart from being applied in the treatment of tumoral cells, is also able to inhibit the formation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 0.5 μ g/mL (Overhage et al., 2008; Amer et al., 2010).

4.4.1. Synergism between AMPs and antibiotics

AMPs may be associated with antibiotics, acting as a combination antibiotherapy. This synergism is due to the fact that this innovative therapeutic group causes a disruption in the bacterial cell membrane, thus increasing its permeability to antibiotics and facilitating their penetration and accumulation in the bacterial cytoplasm. As an example, one might refer the synergism established between magainin II and cecropin A when administered in association with rifampicin, substantially reducing the number of different strains of *Pseudomonas aeruginosa* not only in *in vitro* but also in *in vivo* clinical trials (Baltzer and Brown, 2011; Park et al., 2011).

Other studies revealed that the cationic peptide P5, administered concomitantly with isepamicin, promoted the disruption of bacterium cell membrane, which facilitated the penetration of the antibiotic into the intracellular environment and consequent inhibition of protein synthesis, making certain strains of *Pseudomonas aeruginosa* (which were once resistant to isepamicin) sensitive again to this aminoglycoside antibiotic (Cirioni et al., 2007; Jeong et al., 2010; Peters et al., 2010; Baltzer and Brown, 2011; Park et al., 2011).

To overcome the problems and disadvantages associated with AMPs, several methods have been proposed nowadays, including: (i) introduction of new aminoacid chains, amino or acetyl groups, in the terminal region of the AMPs in order to increase the peptide stability against the action of proteases; (ii) encapsulation of AMPs in liposomes, which are surface-decorated with antibodies, ensuring that they only accumulate exclusively in the desired site of action, hence reducing the side effects and toxicity at a systemic extent; (iii) synthesis, via genetic engineering, of AMPs with a high antimicrobial activity, at a reduced cost and simple synthesis processes, as is the case with AMP P-113, active against Candida albicans, Candida glabrate, Candida parapsilosis and Candida tropocalis, and hLF1-11 (human lactoferrin 1-11), active against MRSA, multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Candida albicans (Gordon et al., 2005; McPhee et al., 2005; Samad et al., 2007; Laverty et al., 2011; Seo et al., 2012; Yount and Yeaman, 2012).

5. Antibiotherapy with bacteriocins

In 1925, the first bacteriocin was discovered by André Gratia and became known as colicin V (Gratia, 1925; Gratia, 2000). This investigator noticed that the antimicrobial compound produced by a strain of *Escherichia coli* V ("verotoxin-producing strain", that is, virulent) prevented the growth of other strains of *Escherichia coli* (Gillor et al., 2005; Nishie et al., 2012).

Bacteriocins are recognized as a subgroup of AMPs, encoded in the ribosomal DNA or plasmids, and are synthesized by bacterial ribosomes, inhibiting the growth of bacteria of the same species or the same genus (Nissen-Meyer et al., 2009; Nishie et al., 2012; Kawada-Matsuo et al., 2013). Bacteriocins can be used by bacteria as a defense strategy against other highly specific and common bacteria, eliminating potential opponents and increasing the number of nutrients available in the environment for its own growth. There are many types of bacteriocins, with different structures and, consequently, different mechanisms of action (Lee and Kim, 2011).

This subgroup of AMPs can also be synthesized by Gramnegative bacteria. The most known and studied bacteriocins are colicins and microcins, which are synthetized by *Escherichia coli* and inhibit the growth of Gram-negative bacteria such as *Aeromonas* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. and *Pseudomonas* sp. On the other hand, Gram-positive bacteria can synthetize, for example, subtilin and nisin A (Izadpanah and Gallo, 2005). These bacteriocins are not active against Gram-negative bacteria, due to the presence of the outer membrane in these bacterial cells. Table 3 displays several examples of bacteriocins produced by both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and their applications (Duquesne et al., 2007; Papagianni and Anastasiadou, 2009; Lee and Kim, 2011).

Table 3

Examples of bacteriocins produced by Gram-positive and Gram-negative bacteria, and their potential uses.

Bacteriocin	Producing bacteria	Potential uses	Type of bacteriocin
Lanthiopeptin	Streptoverticillium cinnamoneum	Treatment of Herpes simplex virus	Lantibiotic
Epidermin	Staphylococcus epidermidis	Treatment of skin infections	Lantibiotic
Lacticin 3147	Lactococcus lactis	Treatment of mastitis infections	Lantibiotic
Mersacidin	Bacillus subtilis	Treatment of infections by vancomycin resistant strains	Lantibiotic
Mutacin	Streptococcus mutans	Treatment of dental cavities	Lantibiotic
Nisin	Lactococcus lactis	Treatment of peptic ulcers; inhibition of multidrug resistant pathogens; antimicrobial barrier in implanted medical devices	Lantibiotic
E1, E4, E7	Escherichia coli	Treatment of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome	Colicin
24, J25, L	Escherichia coli	Treatment of salmonelosis	Microcin
B17	Escherichia coli	Antibacterial agent in cattle	Microcin
S-35	Pseudomonas aeruginosa	Treatment of pulmonary infections	Pyocin

Source: adapted from Gillor et al. (2005).

Nowadays, a freely accessible database is available, known as Bactibase, which contains information on more than 200 bacteriocins produced by many bacteria. This database can be used to optimize the application of bacteriocins not only in the food industry, as biopreservatives, increasing food safety, but also in the pharmaceutical industry, supporting researchers in the development of new bacteriocins or new pharmaceutical products with applications in medicine (Hammami et al., 2010).

Classification of bacteriocins is currently under review, however, these AMPs are broadly classified into four classes (see Table 4), according to: (i) chemical structure; (ii) molecular weight; (iii) mechanism of action; (iv) tropism to a specific receptor; and (v) percentage of modified aminoacids (Cotter et al., 2005; Oppegard et al., 2007; Nissen-Meyer et al., 2009; Nishant et al., 2011; Bodaszewska-Lubas et al., 2012; Nishie et al., 2012).

Lantibiotics are bacteriocins synthesized by lactic acid bacteria (LAB). These bacteriocins exhibit a cationic and amphiphilic structure with a low molecular weight, from ca. 3 kDa to 10 kDa, and are subdivided in classes I and II. Class I lantibiotics are formed by small peptides containing 19–38 aminoacid moieties and contain unusual modified aminoacids, such as lanthionine and 3-methyllanthionine and some dehydrated aminoacids. These aminoacids are introduced via enzymatic modification following the translation process, conferring to lantibiotics stability against heat, to a wide range of pH, against proteolysis and resistance to oxidation (Rajaram et al., 2010; Lee and Kim, 2011; Nishant et al., 2011; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Lantibiotics can also be classified according to their peptide maturation pathway, being classified as type A lantibiotics (I) (which can be modified by enzymes LanB and LanC) and class II, which are formed by types A (II) and B, modified by enzyme LanM (Rajaram et al., 2010; Lee and Kim, 2011; Nishie et al., 2012).

Class II bacteriocins (see Fig. 10), unlike lantibiotics, are not modified enzymatically after their translation processes, so they do not possess unusual modified aminoacid sequences and, due to their heterogeneous nature, classification of these bacteriocins becomes even more complex, leading to several grouping approaches (Jeevaratnam et al., 2005; Rajaram et al., 2010; Nishant et al., 2011; Cui et al., 2012; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012; Kawada-Matsuo et al., 2013). Bacteriocins from Class II are divided into four groups: (i) class IIa, including pediocins (bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and having the N-terminal region YGNGVXC (a characteristic of this class), synthetized by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus sp*); (ii) class IIb, including two-peptide bacteriocins (these two peptides are not modified by enzymatic activity and are responsible for the bacteriocin activity), examples of which are ABP-118, G and Q lactococcins; (iii) class IIc, made up of bacteriocins formed by cyclic peptides containing an N and C-terminal covalently linked by a peptide bond, with reduced content in cysteine residues, essential to ensure the antibacterial activity (examples in this class include gassericin A, uberolysin and lactocyclicin Q); (iv) class IId, broadly diversified because it comprises the remaining bacteriocins that do not fit on the other classes (examples in this class include divergicin A and the "leaderless bacteriocins" as aureocin A70 and enterocin L50 that are synthetized without an N-terminal sequence) (Cotter et al., 2005; Jeevaratnam et al., 2005; Zendo et al., 2006; Nissen-Meyer et al., 2009; Papagianni and Anastasiadou, 2009; Rajaram et al., 2010; Lee and Kim, 2011; Nishant et al., 2011; Cui et al., 2012; Nishie et al., 2012).

Class III bacteriocins includes those composed by thermosensitive proteins of high molecular weight (higher than 30 kDa), which have a different mechanism of action than the other bacteriocins. Due to their lytic character, this type of bacteriocins is now called bacteriolysins. Finally, class IV bacteriocins comprises a complex group of proteins associated with lipids and carbohydrates, which are essential to their activity (Cotter et al., 2005; Jeevaratnam et al., 2005; Papagianni and Anastasiadou, 2009; Rajaram et al., 2010; Lee and Kim, 2011; Nishant et al., 2011; Lohans and Vederas, 2012).

5.1. Structure and mechanism of action of bacteriocins

Bacteriocins are generally constituted by a C-terminal domain, responsible for pore formation in the bacterial cell membrane, that is connected to a N-terminal domain, responsible for binding the bacteriocin to a receptor present in the bacterial cell surface. Initially, the N-terminal domain has a leading peptide that renders the bacteriocin inactive and prevents it from acting against its own producing bacteria. This leading peptide is subsequently cleaved by enzymes, such as protease LanP in lantibiotics, or LanT in class II bacteriocins, activating the bacteriocin is transported to the extracellular environment by specific transporter proteins (Cotter et al., 2005; Oppegard et al., 2007; Nishie et al., 2012).

Due to their structural diversity, bacteriocins exhibit different mechanisms of action and, in many cases, only one type of bacteriocin exhibits more than one type of mechanism of action to attack the target bacteria. Additionally, bacteriocins can act in dif-

Table 4

Classification, characteristics and examples of bacteriocins.

Bacteriocin classification		Characteristics	Examples
Class I (Lantibiotics)	Lantibiotics I	Unusual aminoacids introduced by LanB and LanC	Nisin A, Subtilin, Epidermin, Pep5
	Lantibiotics II	Unusual aminoacids introduced by LanM	Lacticin 481, Nukacin ISK-1, Mersacidin,
Class II	Class IIa	Pediocin-like bacteriocins,	Lacticin 3147 Pediocin
		specific against Listeria monocytogenes	PA-1&/AcH, Leucocin A
	Class IIb	Two-peptide bacteriocins	Lactococcin G, Lactococcin Q
	Class IIc	Cyclic bacteriocins	Enterocin AS-48, Gassericin A, Lactocyclicin Q
	Class IId	Linear, non-pediocin-like, one-peptide bacteriocins	Lactococcin A, Lacticin Q
Class III	-	Heat labile proteins of large molecular weights	-
Class IV	-	Glycoproteins or lipoproteins that require non-protein moieties for their activity	-

Source: adapted from Jeevaratnam et al. (2005), Nishant et al. (2011), Bodaszewska-Lubas et al. (2012) and Nishie et al. (2012).

Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria



Fig. 10. Primary structure of several Class I and II bacteriocins.

Source: adapted from Nishie et al. (2012).

ferent cell functions, such as transcription, translation, replication and cell membrane processes (Jeevaratnam et al., 2005; Lee and Kim, 2011). Most bacteriocins act via pore formation in bacterial cell membranes, affecting their integrity and leading to the collapse of the phospholipid bilayer, consequently causing cell death (Jeevaratnam et al., 2005; Nishie et al., 2012). In the case of class I lantibiotics, such as nisin A, because these are cationic, they electrostatically bind to the bacterial phospholipid membranes, due to their anionic character, which favors the interaction between the cellular membrane and the N-terminal domain of the bacteriocin. This domain establishes a link with pyrophosphate II in the lipid cell membrane, inhibiting the pep-


Fig. 11. Mechanisms of action of classes I and II bacteriocins; nisin A (A), lacticin 3147 (B) and lactococcin A (C). Source: adapted from Nishie et al. (2012).

tidoglycan synthesis, increasing cell permeability and thus leading to the formation of pores in the membrane, triggering an efflux of calcium and magnesium ions. These cations neutralize the anionic charge of phospholipids and some low molecular weight intracellular molecules, triggering a collapse of the phospholipid bilayer followed by cell death.

Due to the high specificity of nisin A to lipid II, it can promote therapeutic action at minimal amounts (in the order of nanograms). Is important to mention that mutations in the N-terminal domain may inactivate all this process, because this is a vital region for the AMP (see Fig. 11A) (Fernández et al., 2008; Lee and Kim, 2011; Nishie et al., 2012; Kawada-Matsuo et al., 2013).

In the case of the bacteriocin lacticin 3147, which has a dipeptide structure and a mechanism of action different from the ones mentioned above, it is constituted by the peptides LtnA1 and LtnA2 that act synergistically. LtnA1 is responsible for recognizing and interacting with lipid II present in the bacterial cell membrane, forming a dimeric complex which binds to LtnA2 yielding a trimeric complex, capable of inhibiting the peptidoglycan synthesis and promoting the formation of pores in the bacterial cell membrane. Subsequently, the pores formed lead to extensive ion and ATP losses, killing the bacteria (see Fig. 11B) (Nishie et al., 2012).

Class IIa bacteriocins, such as pediocin PA-1/ACH, promote cell death also via pore formation in the bacterial cell membrane, but by a different mechanism from those that have been mentioned before. Since these bacteriocins are cationic, they initially promote the electrostatic attraction to the cell membrane (negative in character) which allows them to recognize the mannose phosphotransferase system or Man-PTS (a protein complex involved in the transport of carbohydrates, present on the surface of the cell membrane of bacteria susceptible to this bacteriocin) as receptor. Then, its amphiphilic C-terminal domain in the shape of a α -helix is inserted into the cell membrane, inducing the forma-

tion of hydrophilic pores, affecting the membrane proton-motive force, causing a depletion of ATP with consequent cell death (Nissen-Meyer et al., 2009; Kjos et al., 2010; Cui et al., 2012; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Class IIb bacteriocins includes, for example, lactococcin G (G α peptide and G β peptide) and lactococcin Q (Q α peptide and Q β peptide) synthetized by *Lactococcus lactis*. Both bacteriocins are composed of two different peptides that act synergistically in an equimolar proportion, to ensure antibacterial activity. This class of bacteriocins increases the permeability of the cell membrane, promoting a depletion of cations essential for cell viability, such as calcium and magnesium and phosphates, and a reduction in the levels of ATP, causing cell death (Zendo et al., 2006; Nishie et al., 2012).

Class IIc bacteriocins exhibit a cyclic structure, and their N- and C-terminal domains are covalently bound. However, despite several structural differences in relation to class IIb bacteriocins, both display the same mechanism of action. Some class IIc bacteriocins, such as enterocin AS-48, gassericin A, subtilosin A and carnocyclin A, may exert their antimicrobial mechanism of action without the presence of receptors on the bacterial cell membrane (Nissen-Meyer et al., 2009; Nishie et al., 2012).

Class IId bacteriocins exhibit several different structures and, consequently, different mechanisms of action. However, lactococcins A and B display the same mechanism of action as class IIa bacteriocin pediocin PA-1, but pediocin only requires the IIC portion of Man-PTS to have activity, and lactococcins A and B require the portion IIC and IID to recognize as receptor and start their activity (see Fig. 11C) (Nissen-Meyer et al., 2009; Nishie et al., 2012).

5.2. Bacterial resistance to bacteriocins and bacteriocin toxicity

There are already numerous reports in the literature regarding bacterial resistance to bacteriocins, and some studies show that the mechanism of bacterial resistance to nisin A and other class IIa bacteriocins is connected either to an increase of membrane fluidity, which reduces the efficacy of bacteriocin insertion on the cellular membrane, or to a neutralization of cell-surface charge, which increases the ability of the bacteria to repel the cationic AMPs. These mechanisms of bacterial resistance may be associated with mutations in bacterial DNA (Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

As an example, a mutation in the sigma factor B, or SigB, a mediator involved in the response of bacteria to adverse environmental conditions, is responsible for making *Listeria monocytogenes* (an etiological agent responsible for triggering listeriosis, an opportunistic infection that mainly affects immunocompromised individuals and pregnant women) tolerant to nisin A and lacticin 3147 (Begley et al., 2006; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

The VirRS system regulates the expression of operons dltA (the products of this operon neutralize, by esterification with p-alanine, the polyanionic polymers of teichoic acid of Gram-positive bacteria, which increases the ability of these bacteria to repel cationic AMPs) and mprF(a large membrane protein present in Gram-negative and Gram-positive bacteria, that protects some of these bacteria against AMPs by reducing the negative charge of the cell membrane via addition of the amino acid L-lysin to phosphotidylglycerol, causing resistance to cationic AMPs) in Listeria monocytogenes, and is responsible for reducing the susceptibility of this bacteria to cationic AMPs. Nevertheless, this bacterial defense system can be inhibited by D-alanylacyl-sulfamoyl-adenosine, which blocks the D-alanyl ligase, preventing the neutralization of the bacterial cell membrane and consequently increasing the susceptibility of Gram-positive bacteria, such as Listeria monocytogenes and Bacillus subtilis, to cationic AMPs including nisin A (May et al., 2005; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

However, the mechanisms of bacterial resistance to class IIa bacteriocins are correlated with two resistance mechanisms at the same time, involving the Man-PTS of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis*. In the first resistance mechanism, due to a mutation, a down regulation of Man-PTS gene expression occurs leading to a decrease in the number of receptors on the bacterial cell membrane, causing resistance to this class of bacteriocins. The second resistance mechanism involves a normal expression of the Man-PTS gene, both on resistant and susceptible bacteria, suggesting that the resistance to this class of bacteriocins is correlated with variations on the composition of the cell membrane surface (Gravesen et al., 2002; Vadyvaloo et al., 2002, 2004; Tessema et al., 2009; Kjos et al., 2011; Lohans and Vederas, 2012).

The bacterial resistance to class I bacteriocins is strongly associated with the system *graRS*, *braRS* and *vraSR*, which allows *Staphylococcus aureus* to easily adapt to the new environmental conditions and become resistant to bacteriocins such as nisin A and nukacin ISK-1 (Kawada-Matsuo et al., 2013).

5.3. Application of bacteriocins

5.3.1. Application of bacteriocins as biopreservatives

Bacteriocins such as nisin and pediocin PA-1 are widely used in the food industry because they inhibit the growth of foodborne pathogenic and spoilage-causing bacteria, such as *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, among others (Settanni and Corsetti, 2008; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012; Huang et al., 2013).

The most applied bacteriocins in the food industry as biopreservatives are the LAB-derived bacteriocins, synthetized by lactic acid bacteria (LAB). These bacteria can be found in products such as cheese, yoghurt and other fermented dairy products. Currently, lantibiotics were granted the GRAS (Generally Regarded As Safe) status by FDA, because they are peptides and exist in the gastrointestinal tract (GIT), and so they are easily metabolized to aminoacids by digestive proteases.

It is noteworthy that bacteriocins produced by LAB have no taste or odor, show a high stability and exhibit reduced and highly specific spectrum of action for a particular bacterium, which is highly interesting for their applications in the food industry (Jeevaratnam et al., 2005; De Vuyst and Leroy, 2007; Nissen-Meyer et al., 2009; Papagianni and Anastasiadou, 2009; Rajaram et al., 2010; Lee and Kim, 2011; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Certain particular species of LAB have properties that allows them to be used in the treatment of GIT infections caused by *Helicobacter pylori, Escherichia coli* and *Salmonella* (Jeevaratnam et al., 2005; De Vuyst and Leroy, 2007; Duquesne et al., 2007; Nishie et al., 2012).

Another bacteriocin, enterocin RM6, was isolated from *Enterococcus faecalis* present in raw milk. This bacteriocin was purified via reverse-phase HPLC and proved to be active against Gram-positive bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and MRSA strains, preventing the proliferation of these pathogenic bacteria in food, suggesting that this bacteriocin can be widely applied in the food industry as biopreservative (Huang et al., 2013).

5.3.2. Application of bacteriocins as therapeutic agents

In addition to being extensively applied in the food industry as biopreservatives, some lantibiotics such as nisins A and F, mersacidin, mutacin 1140, lactacin 3147, and pediocin AcH/PA-1, have proved to be active against MRSA and vancomycin resistant enterococci (VRE) strains, establishing themselves as a potential therapeutic strategy to fight multidrug-resistant bacteria and bacterial infections (Sang and Blecha, 2008; Papagianni and Anastasiadou, 2009; Collins et al., 2010; Bodaszewska-Lubas et al., 2012; Lohans and Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Recently, a scientific study has revealed that, when injected into infected mice with Staphylococcus aureus, nisin F inhibited the growth of this bacteria during a timeframe of at least 15 min (Brand et al., 2010). Nisin A was also demonstrated to be an efficient alternative to antibiotics in the treatment of mastitis caused by Staphylococcus aureus (Fernández et al., 2008). In the study by Fernández et al. (2008), eight women with mastitis caused by Staphylococcus aureus were randomly divided into two groups, the first group of which was administrated with a solution containing $6 \mu g/mL$ of nisin A, on the nipple and areola, for a period of two weeks. In the second group, the control one, an identical solution to the previous one was also administered, but lacking nisin A. According to this study, on day 0, the number of bacteria (CFU/mL) present in the breast milk of the women in both groups were similar. However, after 14 days of treatment, the group that received the solution containing nisin A showed a significant reduction in the number of bacteria in their breast milk and these women became free from signs of infection (Jeevaratnam et al., 2005; Fernández et al., 2008; Nishie et al., 2012). Furthermore, according to Kruszewska et al. (2004), mersacidin synthesized by Bacillus sp. is active against several strains of MRSA, eliminating these bacteria that colonized the nasal mucosa of mice. Another study performed in vivo with pediocin PA-1, administered orally, revealed that this bacteriocin did not disturb the GIT microflora of the mice under study, but the same did not happen when using conventional chemical antibiotics, such as penicillin and tetracycline (Le Blay et al., 2007).

Bacteriocins are peptidic structures and their route of administration may be conditioned since they are immunogenic agents and can trigger an immune response. Nevertheless, a study undertaken in rats where pediocin AcH was administered intraperitoneally led to the observation that no antibodies were produced against this bacteriocin, strongly suggesting that, apparently, this bacteriocin is non-immunogenic and free from side effects (Lohans and Vederas, 2012).

According to two other studies, also developed in mice, an intravenous administration of piscicolin 126 and diversin RV41 (both class IIa bacteriocins) proved to be effective 30 min after infection of mice with *Listeria monocytogenes*, allowing to conclude that this class of bacteriocins also demonstrates therapeutic activity (Ramaswamy et al., 2007; Bernbom et al., 2009; Lohans and Vederas, 2012).

A bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp., IM-9, called laterosporulin, purified by reverse-phase HPLC, produced a molecular weight of 5.6 kDa, and displays a N-terminal sequence stable to high temperatures (up to 120 °C), tolerant to pH variations (between 2 and 10) and a high stability against proteases, without affecting its antibacterial activity. Additionally, laterosporulin exhibits a broad spectrum of action, being active against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, such as *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. This bacteriocin has a MIC of 500 μ g/mL and leads to changes in the shape and morphology of *Escherichia coli* after 4 h of exposure, accumulation of cellular debris and lysed cells in the preparation. Therefore, laterosporulin is an innovative broad-spectrum bacteriocin, with potential applications in the treatment of several bacterial infections (Singh et al., 2012).

In spite of the fact that bacteriocins appear to be an outstanding therapeutic alternative to chemical antibiotics, the pharmaceutical industry remains reluctant to fund both research in this area and production of preparations containing bacteriocins, mainly due to (i) the low yield obtained from fermentative processes; (ii) production of unstable products; (iii) the excessively expensive and time consuming (downstream) purification processes; and (iv) legislation problems associated with these products.

Nowadays, bacteriocins can be genetically engineered in order to increase their potency, stability, and spectrum of action, adjust-

Table 5

Examples of bacteriocins produced by bacteria isolated from the marine environment.

Producing bacteria	Origin of isolate	Bacteriocin	Bacteria inhibited
Listonella anguillarum AVP10	Healthy and infected catfishes (<i>Arius</i> thalassimus)	Vibriocin AVP10	Escherichia coli and Listonella anguillarum AVS9
Vibrio vulnificus	Water samples from Wilmington (NC, USA)	1W1, BC1, BC2	Vibrio vulnificus, Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus, Plesiomonas shigelloides and Escherichia coli
Aeromonas hydrophila	Water tank containing alligators	BLIS	Staphylococcus aureus
Pseudoalteromonas	Substrates on the	Antibiotic protein	Ichthyopathogenic Vibrio,
Species Strain X153	littoral of Brittany	P-153	Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes and Propionibacterium granulosum
Vibrio sp. Strain NM 10	Spotnape ponyfish (Leiognathus nuchalis) intestine	BLIS	Pasteurella piscicida K-III, Escherichia coli, Enterococcus seriolicida and Vibrio vulnificus

Source: adapted from Desriac et al. (2010).

ing their application to many different pathological situations and improving their applications in vivo. For example, using genetic engineering approaches, it has been introduced an additional lysin moiety at the N-terminal domain of sakacin 44K and, in sakacin T20 K, a neutral moiety has been replaced by a cationic one, leading to an increase in the net positive charge of both bacteriocins, promoting a consistent electrostatic interaction between the net positive charge of the mutant bacteriocins and the negative charge of the bacterial cell membrane, and thereby leading to an increase in the potency and therapeutic activity of these GEB's (genetically engineered bacteriocins) (Kazazic et al., 2002). Additionally, the replacement of a methionine moiety by a hydrophobic one, was shown to reduce the susceptibility of pediocins and two-peptide bacteriocins to oxidation phenomena, responsible for a dramatic reduction in their antibacterial activity (Nissen-Meyer et al., 2009; Lohans and Vederas. 2012: Nishie et al., 2012).

Presently, researchers are trying to develop chimeric bacteriocins by swapping the N-terminal domain of a certain class of bacteriocins with a C-terminal domain of another class, which may lead to the formation of more powerful and active bacteriocins, as it happened with pediocin PA-1, which led to the development of several chimeric pediocins that exhibited an activity equal or higher than that of the original one (Tominaga and Hatakeyama, 2007; Lohans and Vederas, 2012).

Interestingly, over the past few years, several bacteriocins were isolated from marine environment, from a countless number of bacteria-producing bacteriocins, such as *e.g. Vibrio, Pseudoal-teromonas, Aeromonas, Alteromonas*, among others (see Table 5). Thus, due both to the high biodiversity of this ecosystem and to the fact that it still is underexplored, it is likely that in the near future countless bacteriocins may be discovered, with a higher antibacterial activity and a wider spectrum of action, providing a new arsenal against multidrug-resistant bacteria to the community, definitely establishing bacteriocins as an attractive strategy and feasible alternative to antibiotics (Desriac et al., 2010).

5.3.3. Application of bacteriocins produced by probiotic bacteria

Probiotics are live microorganisms which, when consumed in appropriate concentrations, exert a beneficial effect on the host's health, at a prophylactic level, helping to restore or maintain the normal gut microflora (Gillor et al., 2008; Bodaszewska-Lubas et al., 2012; Lohans and Vederas, 2012). However, according to Dabour et al. (2009), purified bacteriocins exhibit a higher therapeutic activity when there is an established infection, which was demonstrated by the administration of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 (a bacterium that synthetizes pediocin PA-1) in mice infected with *Listeria monocytogenes*.

Over the years, probiotic bacteria has revealed an effective antimicrobial activity by preventing the growth of pathogenic bacteria in the gut, and they can be used in the treatment of bacterial infections of the GIT and vaginal mucosa. Probiotic bacteria may be applied in the GIT, producing in situ a variety of bacteriocins, which contribute to the maintenance of a proper balance between the host and the intestinal microflora, preventing the proliferation of pathogenic microorganisms and helping in digestion. There are many bacteria that are applied as probiotics in the GIT due to bacteriocin production, such as Lactobacillus salivarius UCC118 (responsible for the production of bacteriocin Abp118, that inhibits the growth of Listeria monocytogenes), Lactobacillus casei L26 (which inhibits the growth of *Escherichia coli* 0111 (enterohemorrhagic) and Listeria monocytogenes), Lactobacillus johnsonii LA1 and Lactobacillus acidophilus LB (which inhibits the growth of Helicobacter pilori), and Enterococcus mundtii ST4SA (producer of ST4SA bacteriocin, which is active against both Gram-positive (Enterococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus) and Gram-negative bacteria (Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae)) (Corr et al., 2007; De Vuyst and Leroy, 2007; Gillor et al., 2008; Gotteland et al., 2008; Granger et al., 2008; Nishant et al., 2011).

In addition, bacteriocins produced by probiotic bacteria can be applied in the oral cavity, reducing the number of etiologic agents responsible for the proliferation of dental caries, such as Streptococcus salivarius and Streptococcus mutans, by using a strain of Streptococcus mutans A2JM (genetically engineered) which produces mutacin 1140 involved in the prevention of dental caries (Hillman et al., 2007). It is important to mention that Streptococcus salivarius K12 synthetizes two lantibiotics, termed salivaricin A and B, that inhibit the proliferation of Streptococcus pyogenes, a saprophytic bacterium responsible for respiratory tract infections such as pharyngitis in immunocompromised patients. In the case of salivaricin B, it allows to combat halitosis caused by Prevotella spp., Eubacterium saburreum and Micromonas micros (Burton et al., 2006a,b; Gillor et al., 2008). There is already available on the market BLIS K12[®] and BLIS M18TM in the form of lozenges, containing Streptococcus salivarius K12 and Streptococcus salivarius M18 that produce bacteriocins, which restore the normal microflora of the oral cavity, contributing to the reduction of halitosis and preventing dental caries (Burton et al., 2013). Bacteriocins produced



Fig. 12. Bacterial organelle, with a structure resembling a needle that secrets toxins directly to the intracellular environment of the host. Source: adapted from Marlovits and Stebbins (2010).

by probiotic bacteria can also be applied in the vaginal mucosa, promoting the replacement and maintenance of the natural flora while preventing the spread of pathogenic bacteria that trigger bacterial vaginosis. Examples of this include vaginal applications of Lactobacillus jensenii 5L08 (produces a bacteriocin active against Gardnerella vaginalis, Candida albicans and Escherichia coli), Lactobacillus salivarius CRL 1328 (binds to the epithelial cells of the vaginal mucosa and prevents the attachment of pathogenic bacteria while inhibiting the growth of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Neisseria gonorrhoeae and Staphylococcus aureus), and Lactobacillus fermentum HV6b MTCC10770 (present in the vaginal flora, produces fermenticin HV6b and inhibits the growth of Bacteroides sp., Gardnerella vaginalis, Mobiluncus sp., Staphylococcus sp. and Streptococcus sp., acts as an antineoplastic agent, and can also be applied in contraceptive products) (Kaewsrichan et al., 2006; Gillor et al., 2008; Kaur et al., 2013).

6. Other potential alternatives

6.1. Antivirulence strategies

Most chemical antibiotics interfere with the cellular processes. However, there are innovative alternatives under development that interact with virulence factors, which are primarily responsible for triggering infections, making it easier for the immune

Table 6

Examples of antibacterial antibodies currently under clinical trials.

system to fight them, e.g. (i) inhibition of toxin secretion - most Gram-negative bacteria release toxins via their type III secretion system (T3SS), which involves the formation of a bacterial organelle with a structure like a needle that secrets toxins directly into the intracellular environment of the host (see Fig. 12), as is the case with INP0403 (a salicylidene acylhydrazide-mediated inhibition of type III secretion system used in the treatment of infections caused by Mycobacterium tuberculosis and in the treatment of tuberculosis, reducing the transcription of genes involved in this mechanism); (ii) use of specific antibodies that inhibit the toxins produced by e.g. Clostridium botulinum, via antibodies H3H, F3A and F4H, that suppress the catalytic domain of neurotoxin serotype A; (iii) interference with the quorum-sensing of bacteria via 5'-methylthio-DADMe-ImmucillinAs, 5'-ethylthio-DADMe-ImmucillinAs and 5'-butylthio-DADMe-ImmucillinAs, which inhibit the 5'-Methylthioadenosine nucleosidase (MTAN), an enzyme involved in guorum-sensing of Escherichia coli and Vibrio cholerae, reducing the biosynthesis of autoinducers AI-1 and AI-2 (signaling molecules), the ability to form biofilms, reducing the infection capacity and the resistance to antibiotics; and (iv) use of inhibitors of the pili biosynthesis, or pilicides, to reduce the adhesion of bacteria to the epithelium and consequently reduce biofilm formation (Galan and Wolf-Watz, 2006; Hudson et al., 2007; Kaufmann et al., 2008; Gutierrez et al., 2009; Layton et al., 2010; Marlovits and Stebbins, 2010; Pang et al., 2010; Fernebro, 2011).

These antivirulence strategies have as main advantage the fact of being specific to virulence factors that only exists in pathogenic bacteria, so they do not affect the commensal flora in the host. In addition, these antibacterial approaches can be administered either topically or systemically, and can be used as prophylaxis in cases of bioterrorism and epidemics (Moayeri et al., 2006; Fernebro, 2011).

6.2. Anti-bacterial antibodies

Treatment with antibacterial antibodies is not yet a reality, since most antibodies already discovered are still in clinical trials, as illustrated by the data in Table 6. However, this type of therapy is widely applied in the treatment of cancer (Saylor et al., 2009; Oleksiewicz et al., 2012).

Regarding the advantages of antibodies, this alternative therapy may be used in the near future in the prevention and treatment of bacterial infections in animals, without affecting their commensal flora. As antibodies are extremely selective, they are extremely safe and effective. However, this therapy shows some disadvantages as well, such as: (i) the synthesis and purification processes are expensive and, as they have a very small market, the final product is very expensive; (ii) they can only be administered systemically; and (iii) they may lose their effectiveness over time, due to the antigenic variation of the bacteria (Bebbington and Yarranton, 2008; Fernebro, 2011).

r · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
Target bacteria	Producing Company		
Bacillus anthracis	Elusys Therapeutics		
Bacillus anthracis	Human Genome Sciences		
Bacillus anthracis	PharmAthene/Medarex		
Clostridium difficile	Medarex/MassBiologics/Merck		
Shiga toxin-producing Escherichia coli	Thallion Pharmaceuticals		
Shiga toxin-producing Escherichia coli	Teijin		
Pseudomonas aeruginosa	Immunsystem		
Pseudomonas aeruginosa	KaloBios Pharmaceuticals/Sanofi Pasteur		
Pseudomonas aeruginosa	Kenta Biotech		
Staphylococcus aureus	Biosynexus		
	Target bacteria Bacillus anthracis Bacillus anthracis Bacillus anthracis Clostridium difficile Shiga toxin-producing Escherichia coli Shiga toxin-producing Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus		

Source: adapted from Fernebro (2011).

Recently, a phase I clinical trial was conducted in infants, using pagibaximab (BSYX-A110), an anti-LTA human chimeric IgG1 antibody, developed via recombinant DNA technology. In this clinical trial, BSYX-A110 was administered systemically with three infusions, containing from 60 to 90 mg/kg Pagibaximab. This antibody is specific to the lipoteichoic acids of *Staphylococcus aureus*, which are essential to its viability. When it binds to the lipoteichoic acids, this antibody stimulates phagocytosis and inhibits the release of cytokines, responsible by the induction of organ failure. In this clinical trial, Pagibaximab was considered well tolerated, safe and effective in the treatment and prevention of infections caused by *Staphylococcus aureus* (Bebbington and Yarranton, 2008; Weisman et al., 2011).

Presently, 2E9IgA1, an antibody specific for Mycobacterium tuberculosis, was administered intranasally associated with IFN- γ , reducing significantly the respiratory infection in transgenic mice with human CD89 receptor. This clearly indicates that 2E9IgA1 has a high affinity for the α -crystalline receptor (antigen) of *Mycobac*terium tuberculosis and for the CD89 receptor (FcaRI) present in macrophages and neutrophils. According to this study, developed by Balu and colleagues (2011), it is believed that 2E9IgA1 can act in two ways, either by binding to the CD89 receptor of alveolar macrophages, which stimulates the phagocytosis of the bacteria, or by binding to CD89 receptor of neutrophils that subsequently exert a bactericidal effect. This antibody may contribute, in the near future, for reducing the time of chemotherapy in patients with tuberculosis, for reducing tuberculosis transmission and for reducing the development of new multi-drug resistant strains (Balu et al., 2011).

6.2.1. Radioimmunotherapy

Radioimmunotherapy (RIT) is a technique that has been used in the treatment of bacterial infections caused by *Streptococcus pneumonia*, using the monoclonal antibody D11, which specifically binds to PPS8, a polysaccharide present on the bacteria capsule. D11 was associated with the radioactive isotope 213 Bi, administered at a concentration of 2.96 GBq (equivalent to 80 µCi) and allowed survival of 87% to 100% of the test population. In addition, this study demonstrated that after 3–14 days of initiating the treatment, the animals did not show any signs of the pathology (Dadachova et al., 2004).

In another study using RIT, it was demonstrated that RIT can also be used to treat infections caused by toxin-producing bacteria, such as *Bacillus anthracis*, by using the radioactive complexes $[^{213}Bi]10F4\gamma1$ and $[^{213}Bi]14FA\gamma2b$, which exhibited bactericidal action since toxins accumulate in the periphery of this bacterium, thus becoming an easy target (Rivera et al., 2009; Saylor et al., 2009; Nosanchuk and Dadachova, 2012).

6.3. Vaccines

Currently, there are new novel methods to identify antigens. Genetic engineering and bioinformatics allows the identification and synthesis of epitopes responsible for triggering the immune response, leading to the development of recombinant vaccines. Such vaccines are composed of (at least) one modified antigen which, when administered with adjuvants or plasmids, induce an immune response against the pathogen. In addition, antimicrobial vaccines may contain live recombinant microorganisms such as *Mycobacterium bovis, Listeria monocytogenes, Salmonellae* spp. and *Shigellae* spp., the genome of which was inserted with a gene that encodes for a desired antigen, thus functioning as a vector.

Some DNA vaccines already exist in the market. In producing such vaccines, genes coding for numerous antigens were inserted into a plasmid and, when they are administered intramuscularly, can induce the production of specific antibodies against several

pathogens (Fernebro, 2011; Nascimento and Leite, 2012; Nabel, 2013).

Vaccines currently under clinical trials include (i) vaccine IC43, applied prophylactically against *Pseudomonas aeruginosa* (this vaccine is composed of two recombinant antigens that are present on the bacterium surface); (ii) vaccines GSK2392105A and SA3Ag that contain 3–4 antigens, respectively, inducing immunization against *Staphylococcus aureus*; (iii) vaccines containing vesicles from the outer membrane of bacteria, protecting against *Neisseria meningitidis, Burkholderia pseudomallei* and *Escherichia coli*; (iv) a vaccine containing a genetically inactivated α -toxin (HlaH35L), which contributed to immunization of mice when infected by *Staphylococcus aureus* (Doring and Pier, 2008; Nieves et al., 2011; Brady et al., 2013; Kim et al., 2013).

Countries that adopted anti-pneumococcal vaccination, as the United Kingdom, have seen a reduction in the incidence of pneumococcal infections by ca. 41%. The reduction in the appearance of infections by *S. penumoniae* such as otitis, pharyngitis and sinusitis, leads to a reduction in the number of doctor visits, antibiotic prescription and, consequently, to a decrease in the appearance of antimicrobial resistance (Gladstone et al., 2011).

7. New sources for new potentially antimicrobial molecules

During the years of 1960 and 1970, search and discovery for new antimicrobial agents derived from soil microorganisms was quite intensive, however it came to an end quite quickly due to the difficulties in growing in the lab the vast majority of microbial species found in the nature (Lewis, 2012). Quite recently, Nichols et al. (2010) developed a system called iChip, which allows to grow soil microorganisms that were ungrowable in the laboratory until then. Such system is composed of hundreds of diffusion chambers at a nanoscale, each one of them inoculated with a single microbial cell, resulting in "in situ" monospecific cultures. Such system allows to grow, identify and, subsequently, evaluate the antimicrobial activities of microorganisms ungrowable in the laboratory. Such a strategy appears highly promising since ca. 99% of all microbial species in the nature could not, until then, be grown in the laboratory (Lewis, 2013). The first results of this new approach already started to appear. Very recently, Ling et al. (2015), using such system, isolated a new substance, teixobactin, from growing a new species of β -proteobacteria, Gram-negative, temporarily and provisionally named *Eleftheria terrae*. The new molecule (teixobactin) exhibited a high activity against Grampositive microorganisms and also activity against Mycobacterium tuberculosis, Clostridium difficile and Bacillus anthracis. Teixobactin appears to have as mechanism of action, inhibition of the synthesis of bacterial cell wall in previous steps, such as vancomycin and teicoplanin. Its antibacterial activity was effective at very low concentrations: Staphylococcus aureus strains, both MRSA and MSSA, were sensible at concentrations of 0.25 µg/mL. Regarding Enterococcus faecium (VRE) and Enterococcus faecalis (VRE), its action occurred at concentrations of 0.5 µg/mL. For Streptococcus pneumoniae, a major cause of upper respiratory tract infections, teixobactin acted at concentrations lower than 0.03 µg/mL. This new molecule, besides being a great help for the current therapeutic arsenal, clearly shows that the new methodology opens up a wide front for the discovery of new antibiotic molecules of natural origin.

8. Conclusions

It is a whole new world where the humanity thrives today. With the astonishing increase of bacterial resistance to conventional chemical antibiotics, added to the possibility of these losing their effectiveness during the next 5 years, it is absolutely essential to develop alternative antimicrobial strategies, in order to fight this serious problem faced by society today.

Very recently, in February 2016, Liu et al. (2016) published an article showing a mechanism of resistance to colistin mediated by plasmids (mcr-1), allowing the horizontal transference of resistance genes, and greatly facilitating its dissemination. This discovery was made in China, in a sample of Escherichia coli collected from pork for human consumption. The discovery arouses great concern since, beyond degrading the last antibiotic still with action in Gram-negative bacteria, its dissemination should be very fast because of its plasmid origin, allowing for the horizontal transference of these genes. It should be remembered at this point that China is the largest producer of pigs for human consumption, with a production of 57 million tons in 2014, and also is one of the largest users of colistin for agricultural purposes (Liu et al., 2016). All this only reinforces the need to control more and more the use of antibiotics and to perform research for new alternatives for the treatment of infectious diseases.

Currently, there are already several alternative strategies, such as antibiotherapy with phages and lysins, and both show a high bacterial specificity, a suitable spectrum of action and, most importantly, do not affect the commensal flora of the host. Additionally, there are countless antimicrobial compounds being tested in clinical trials, while other compounds are still under development. However, and although such antimicrobial alternatives exhibit several advantages over conventional chemical antibiotics, it is imperative to know more about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these therapeutic strategies *in vivo*.

Until now, only a few AMPs have received approval by both FDA and EMEA, and their uses are restricted to topical applications due to both their short half-life and the high concentrations in which they are administered.

In spite of bacteriocins being an excellent therapeutic alternative to chemical antibiotics, the pharmaceutical industry remains reluctant to finance research and production of bacteriocin preparations, mainly due to the high production costs involved and the instability of the final (formulated) products. Bacteriocins produced by probiotic bacteria are already available on the market, but they are considered more a therapeutic complement than a therapeutic alternative.

Vaccination is one of the most promising strategies both at a preventive level, as well as in terms of cost-effectiveness, but do not allow to fight established bacterial infections and it is still limited to certain strains of pathogenic bacteria. Furthermore, in a near future, with genomics and bioinformatics providing innovative methods to the development of new antimicrobial vaccines specific to certain pathogenic bacteria, these alternatives can reduce both the rate of bacterial infections at the community and the need for chemical antibiotics.

Nowadays, through genetic engineering and recombinant DNA technology, it is possible to develop transgenic phages, lysins and bacteriocins, in order to increase their ability to infect biofilms, make them more specific and stable, with a wider spectrum of action and increasing both their potency and efficacy. To conclude, deepening the current knowledge about these innovative therapeutic strategies is of utmost importance. While such innovative therapeutic strategies are not defined, structured and available in the market, it is imperative to develop standards in order to control the use of current chemical antibiotics. In addition, it is indispensable that health professionals use, as a last resort, new chemical antibiotics that may arise in the market in the near future, preventing in this way the spread of bacterial resistance to them.

Transparency declarations

None to declare.

Acknowledgements

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (**FAPESP Ref.No. 2013/03181-6, Project PneumoPhageKill**), is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (**Ref.No. 306113/2014-7**) and Marco V. Chaud (**Ref. No. 309598/2014-1**). The authors are also grateful to Cláudio M. Barroso (BSc.), Graphic Designer at University of Sorocaba (UNISO), and to Iveraldo Rodrigues (BSc.), Graphic Designer at University of Campinas (UNICAMP) for computer-designing the schemes/drawings integrating this review paper. The authors have no conflicts of interest whatsoever to declare.

References

- Łęski, T.A., Tomasz, A., 2005. Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. J. Bacteriol. 187 (5), 1815–1824.
- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 37 (2), 127–137.
- Aarestrup, F.M., 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 370 (1670), 20140085.
- Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., Kutter, E.M., 2011. Phage treatment of human infections. Bacteriophage 1 (2), 66–85.
- Abhilash, M., Vidya, A.G., Jagadevi, T., 2009. Bacteriophage therapy: a war against antibiotic resistant bacteria. Internet J. Altern. Med. 7 (1), e17744.
- Abraham, E.P., Chain, E., 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Rev. Infect. Dis. 10 (4), 677–678, 1940.
- Ackermann, H.W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch. Virol 152 (2), 227–243.
- Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N.C.M., Alves, E., Costa, L., Faustino, M.A.F., 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. Mar. Drugs 7 (3), 268–313.
- Amer, L.S., Bishop, B.M., van Hoek, M.L., 2010. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 396 (2), 246–251.
- Aminov, R.I., 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front. Microbiol. 1 (134), 1–7.
- Atterbury, R.J., 2009. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. Microb. Biotechnol. 2 (6), 601–612.
- Balcão, V.M., Vila, M.M.D.C., 2015. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. Adv. Drug Deliv. Rev. 93, 25–41.
- Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B., Momol, M.T., 2010. Phage therapy for plant disease control. Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (1), 48–57.
- Baltzer, S.A., Brown, M.H., 2011. Antimicrobial peptides–promising alternatives to conventional antibiotics. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 20 (4), 228–235.
- Balu, S., Reljic, R., Lewis, M.J., Pleass, R.J., McIntosh, R., van Kooten, C., van Egmond, M., Challacombe, S., Woof, J.M., Ivanyi, J., 2011. A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. J. Immunol. 186 (5), 3113–3119.
- Bebbington, C., Yarranton, G., 2008. Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. Curr. Opin. Biotechnol. 19 (6), 613–619.
- Begley, M., Hill, C., Ross, R.P., 2006. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. Appl. Environ. Microbiol. 72 (3), 2231–2234.
- Bencivengo, A.-M., Cudic, M., Hoffmann, R., Otvos Jr., L., 2001. The efficacy of the antibacterial peptide, pyrrhocoricin, is finely regulated by its amino acid residues and active domains. Lett. Pept. Sci. 8 (3–5), 201–209.
- Bernbom, N., Jelle, B., Brogren, C.H., Vogensen, F.K., Nørrung, B., Licht, T.R., 2009. Pediocin PA-1 and a pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain do not change the HMA rat microbiota. Int. J. Food Microbiol. 130 (3), 251–257.
- Björn, C., Håkansson, J., Myhrman, E., Sjöstrand, V., Haug, T., Lindgren, K., Blencke, H.M., Stensvåg, K., Mahlapuu, M., 2012. Anti-infectious and anti-inflammatory effects of peptide fragments sequentially derived from the antimicrobial peptide centrocin 1 isolated from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. AMB Express 2 (1), 67–78.

Bodaszewska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T., Heczko, P.B., 2012. Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins-pilot study. Postepy Hig. Med. Dosw. 66, 787–794.

Boerlin, P., Reid-Smith, R.J., 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. Anim. Health Res. Rev. 9 (2), 115–126. Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Górski, A., 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Exp. Biol. Med. 231 (4), 366-37

Brady, R.A., Mocca, C.P., Prabhakara, R., Plaut, R.D., Shirtliff, M.E., Merkel, T.J., Burns, D.L., 2013. Evaluation of genetically inactivated alpha toxin for protection in multiple mouse models of Staphylococcus aureus infection. PLoS One 8 (4), e63040

Brand, A.M., Kwaadsteniet, M., Dicks, L.M., 2010. The ability of nisin F to control Staphylococcus aureus infection in the peritoneal cavity, as studied in mice. Lett. Appl. Microbiol. 51 (6), 645-649.

Brandenburg, L.O., Merres, J., Albrecht, L.J., Varoga, D., Pufe, T., 2012. Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. Polymers 4 (1), 539-560.

Bruhn, O., Grötzinger, J., Cascorbi, I., Jung, S., 2011. Antimicrobial peptides and proteins of the horse - insights into a well-armed organism. Vet. Res. 42 (1), 98 - 119

Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Höhle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Luber, P., Rosner, B., Stark, K., Kühne, M., 2011. German outbreak of Escherichia coli 0104:H4 associated with sprouts. N. Engl. J Med. 365 (19), 1763-1770.

Burton, J.P., Chilcott, C.N., Moore, C.J., Speiser, G., Tagg, J.R., 2006a. A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodour parameters. J. Appl. Microbiol. 100 (4), 754-764.

Burton, J.P., Wescombe, P.A., Moore, C., Chilcott, C.N., Tagg, J.R., 2006b. Safety assessment of the oral cavity probiotic Streptococcus salivarius K12. Appl. Environ. Microbiol. 72 (4), 3050-3053.

Burton, J.P., Wescombe, P.A., Macklaim, J.M., Chai, M.H., Macdonald, K., Hale, J.D., Tagg, J., Reid, G., Gloor, G.B., Cadieux, P.A., 2013. Persistence of the oral probiotic Streptococcus salivarius M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. PLoS One 8 (6), e65991.

Campos, J., Ferech, M., Lázaro, E., de Abajo, F., Oteo, J., Stephens, P., Goossens, H., 2007. Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. J. Antimicrob. Chemother. 60 (3), 698–701.

Cao, L., Dai, C., Li, J., Fan, Z., Song, Y., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2012. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo. PLoS One 7 (7), e40135.

Carlet, J., Mainardi, J.L., 2012. Antibacterial agents: back to the future. Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin? Clin. Microbiol. Infect. 18 (1), 1-3

Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I.C., Harbarth, S., Jarlier, V., Levy, S.B., N'Doye, B., Pittet, D., Richtmann, R., Seto, W.H., van der Meer, J.W., Voss, A., 2011. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. Lancet 378 (9788), 369-371.

Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., Pittet, D., 2012a. Ready for a world without antibiotics? The Pensières antibiotic resistance call to action. Antimicrob. Resist. Infect. Control 1 (1), 11–23.

Carlet, I., Rambaud, C., Pulcini, C., 2012b, WAAR (World Alliance against Antibiotic Resistance): safeguarding antibiotics. Antimicrob. Resist. Infect. Control 1 (1), 25 - 30

Carmody, L.A., Gill, J.J., Summer, E.J., Sajjan, U.S., Gonzalez, C.F., Young, R.F., LiPuma, J.J., 2009. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. J. Infect. Dis. 201 (2), 264–271. Celia, L.K., Nelson, D., Kerr, D.E., 2007. Characterisation of a bacteriophage lysin

(Ply700) from Streptococcus uberis. Vet. Microbiol. 130 (1-2), 107-117.

Chan, B.K., Abedon, S.T., 2012. Phage therapy pharmacology phage cocktails. In: In, B.K., Abeuon, S.L. 2012. Fridge therapy pharmacology phage control of the second s

Charan, J., Mulla, S., Ryavanki, S., Kantharia, N., 2012. New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. Pan Afr. Med. J. 11, 22–28.
Chen, Y., Cao, L., Zhong, M., Zhang, Y., Han, C., Li, Q., Yang, J., Zhou, D., Shi, W., He, B.,

Liu, F., Yu, J., Sun, Y., Cao, Y., Li, Y., Li, W., Guo, D., Cao, Z., Yan, H., 2012. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. PLoS One 7 (4), e34947

Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., Fischetti, V.A., 2005. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (1), 111-117.

Chhibber, S., Kaur, S., Kumari, S., 2008. Therapeutic potential of bacteriophage in treating Klebsiella pneumoniae B5055-mediated lobar pneumonia in mice. J. Med. Microbiol. 57 (12), 1508-1513.

Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Brüssow, H., 2004. Phage-Host interaction: an ecological perspective. J. Bacteriol. 186 (12), 3677–3686.

Cho, J., Hwang, I.S., Choi, H., Hwang, J.H., Hwang, J.S., Lee, D.G., 2012. The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. J. Microbiol. Biotechnol. 22 (11), 1457-1466.

Cirioni, O., Ghiselli, R., Silvestri, C., Kamysz, W., Orlando, F., Mocchegiani, F., Di Matteo, F., Riva, A., Lukasiak, J., Scalise, G., Saba, V., Giacometti, A., 2007. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant Pseudomonas aeruginosa strain. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (6), 2005-2010.

Collins, B., Curtis, N., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2010. The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistence of Listeria monocytogenes to nisin, bacitracin and various beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 54 (10), 4416-4423.

- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (18), 7617-7621.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3 (10), 777-788.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., Cui, H., 2012. Class IIa Bacteriocins: diversity and new developments. Int. J. Mol. Sci. 13 (12), 16668-16707

Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I., 2009. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and Pediococcus acidilactici UL5 at inhibiting Listeria monocytogenes. Int. J. Food Microbiol. 133 (3), 225-233.

Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A., 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. J. Appl. Microbiol. 98 (1), 7-13.

Dadachova, E., Burns, T., Bryan, R.A., Apostolidis, C., Brechbiel, M.W., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Pirofski, L., 2004. Feasibility of radioimmunotherapy of experimental pneumococcal infection. Antimicrob. Agents Chemother. 48 (5), 1624-1629.

Daniel, A., Euler, C., Collin, M., Chahales, P., Gorelick, K.J., Fischetti, V.A., 2010. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 54 (4), 1603–1612.

De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13 (4), 194-199

Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., Touqui, L., 2010. Bacteriophages can treat and prevent Pseudomonas aeruginosa lung infections. J. Infect. Dis. 201 (7), 1096-1104.

Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. Mar. Drugs 8 (4), 1153-1177

Devocelle, M., 2012. Targeted antimicrobial peptides. Front. Immunol. 3 (309), 1-4.

Donabedian, S.M., Thal, L.A., Hershberger, E., Perri, M.B., Chow, J.W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Makinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F., Zervos, M.J., 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. J. Clini. Microbiol. 41 (3), 1109–1113.

Donovan, D.M., Dong, S., Garrett, W., Rousseau, G.M., Moineau, S., Pritchard, D.G., 2006. Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. Appl. Environ. Microbiol. 72 (4), 2988–2996.

Doring, G., Pier, G.B., 2008. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas* aeruginosa. Vaccine 26 (8), 1011-1024.

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides form enterobacteria. National Products Reports 24 (4), 708–734.

Edgar, R., Friedman, N., Molshanski-Mor, S., Qimron, U., 2012. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. Appl. Environ. Microbiol. 78 (3), 744–751.

Escobar-Paramo, P., Gougat-Barbera, C., Hochberg, M.E., 2012. Evolutionary dynamics of separate and combined exposure of Pseudomonas fluorescens SBW25 to antibiotics and bacteriophage. Evol. Appl. 5 (6), 583–592.

Fair, R.J., Yitzhak, T., 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect. Med. Chem. 6, 25-64.

Falagas, M.E., Karageorgopoulos, D.E., Nordmann, P., 2011. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzvmes. Future Microbiol. 6 (6), 653-666.

Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony, J., Coffey, A., 2010. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. Bioeng, Bugs 1 (1), 9–16. Fernández, L, Delgado, S., Herrero, H., Maldonado, A., Rodríguez, J.M., 2008. The

bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. J. Hum. Lact. 24 (3), 311-316.

Fernebro, J., 2011. Fighting bacterial infections – future treatment options. Drug Resist. Updat. 14 (2), 125–139.

Fischetti, V.A., 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Curr. Opin. Microbiol. 11 (5), 393-400.

Fischetti, V.A., 2010. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. Int. J. Med. Microbiol. 300 (6), 357-362

Fischetti, V.A., 2011. Exploiting what phage have evolved to control Gram-positive pathogens. Bacteriophage 1 (4), 188-194.

Fleming, A., 1929. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza. Br. J. Exp. Pathol. 10, 226-236.

Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I.C., So, A.D., Monnet, D.L., Cars, O., 2011. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - time to react is now. Drug Resist. Updat. 14 (2), 118-124.

Galan, J.E., Wolf-Watz, H., 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature 444 (7119), 567-573.

Gillor, O., Nigro, L.M., Riley, M.A., 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. Curr. Pharm. Des. 11 (8), 1067-1075

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81 (4), 591-606.

Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F., 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Central Eur. J. Biol. $\hat{2}(\hat{1})$, 1–33.

Gladstone, R.A., Jefferies, J.M., Faust, S.N., Clarke, S.C., 2011. Continued control of pneumococcal disease in the UK – the impact of vaccination. J. Med. Microbiol. 60, 1–8, http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.020016-0.

Goossens, H., Ferech, R., Vander Stichele, R., Elseviers, M., 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross national database study. Lancet 365 (9459), 579–587.

Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., McDermott, A.M., 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. Curr. Eye Res. 30 (7), 505–515.

Gotteland, M., Andrews, M., Toledo, M., Muñoz, L., Caceres, P., Anziani, A., Wittig, E., Speisky, H., Salazar, G., 2008. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. Nutrition 24 (5), 421–426.

Granger, M., van Reenen, C.A., Dicks, L.M., 2008. Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR. Int. J. Food Microbiol. 123 (3), 277–280.

Gratia, A., 1925. Sur un remarquable example d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Compt. Rend. Soc. Biol. 93, 1040–1042.

Gratia, J.P., 2000. André Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics. Genetics 156 (2), 471–476.

Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., Knøchel, S., 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. Microbiology 148 (8), 2361–2369.

Gutierrez, J.A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M.C., Almo, S.C., Schramm, V.L., 2009. Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. Nat. Chem. Biol. 5 (4), 251–257.

Hagens, S., Loessner, M.J., 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (1), 58–68.

Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., Fliss, I., 2010. Bactibase second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. BioMed Central Microbiol. 10, 22–26.

Hanlon, G.B., 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. Int. J. Antimicrob. Agents 30 (2), 118–128.

Hermoso, J.A., García, J.L., García, P., 2007. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. Curr. Opin. Microbiol. 10 (5), 461–472.

Hillman, J.D., Mo, J., McDonell, E., Cvitkovitch, D., Hillman, C.H., 2007. Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. J. Appl. Microbiol. 102 (5), 1209–1219.

Hoopes, J.T., Stark, C.J., Kim, H.A., Sussman, D.J., Donovan, D.M., Nelson, D.C., 2009. Use of a bacteriophage lysin, PlyC as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. Appl. Environ. Microbiol. 75 (5), 1388–1394.

Housby, J.N., Mann, N.H., 2009. Phage therapy. Drug Discov. Today 14 (11–12), 536–540

Huang, E., Zhang, L., Chung, Y., Zheng, Z., Yousef, A.E., 2013. Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. BioMed Res. Int. 2013, 206917.

Hudson, D.L., Layton, A.N., Field, T.R., : Bowen, A.J., Wolf-Watz, H., Elofsson, M., Stevens, M.P., Galyov, E.E., 2007. Inhibition of type III secretion in Salmonella enterica serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (7), 2631–2635.

Hung, C.H., Kuo, C.F., Wang, C.H., Wu, C.M., Tsao, N., 2011. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae* – mediated liver abscesses and bacterimia in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 55 (4) 1358–1365.

bacterinia in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 55 (4), 1358–1365.
 Hyman, P., Abedon, S.T., 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance.
 In: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), Advances in Applied
 Microbiology, vol. 70. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, pp. 217–248.

Izadpanah, A., Gallo, R.L., 2005. AMPs demonstrate being effective against a broad range of microorganisms, including Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, and viruses. J. Am. Acad. Dermatol. 52, 381–390.

Jacoby, G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin. Infect. Dis. 41 (2), 120–126.

Jado, I., Lopez, R., Garcia, E., Fenoll, A., Casal, J., García, P., 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. J. Antimicrob. Chemother. 52 (6), 967–973.

Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2005. Biological preservation of foods – Bacteriocins of lactic acid bacteria. Indian J. Biotechnol. 4, 446–454. Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E., 2006. Peptide antimicrobial agents. Clin.

Microbiol. Rev. 19 (3), 491–511. Jeong, N., Kim, J.Y., Park, S.C., Lee, J.K., Gopal, R., Yoo, S., Son, B.K., Hahm, J.S., Park, Y., Hahm, K.S., 2010. Antibiotic and synergistic effect of Leu-Lys rich peptide against antibiotic resistant microorganisms isolated from patients with cholelithiasis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 399 (4), 581–586.

Jończyk, E., Klak, M., Miedzybrodzki, R., Górski, A., 2011. The influence of external factors on bacteriophages. Folia Microbiol. (Praha) 56 (3), 191–200.

Johnsen, P.J., Osterhus, J.I., Sletvold, H., Sørum, M., Kruse, H., Nielsen, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., 2005. Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal Enterococcus faecium population. Appl. Environ. Microbiol. 71 (1), 159–168.

Johnson, R.P., Gyles, C.L., Huff, W.E., Ojha, S., Huff, G.R., Rath, N.C., Donoghue, A.M., 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Anim. Health Res. Rev. 9 (2), 201–215. Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K., Kongprasertkit, J., 2006. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Immunol. Med. Microbiol. 48 (1), 75–83.

Katsunuma, Y., Hanazumi, M., Fujisaki, H., Minato, H., Kataoka, Y., Sawada, T., Hashimoto, Y., Yonemochi, C., 2008. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the faeces of livestock and livestock farmers in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 54 (1), 39–50.

Kaufmann, G.F., Park, J., Janda, K.D., 2008. Bacterial quorum sensing: a new target for anti-infective immunotherapy. Expert Opin. Biol. Ther. 8 (6), 719–724.

Kaur, B., Balgir, P.P., Mittu, B., Kumar, B., Garg, N., 2013. Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. BioMed Res. Int. 2013, 168438.

Kawada-Matsuo, M., Yoshida, Y., Zendo, T., Nagao, J., Oogai, Y., Nakamura, Y., Sonomoto, K., Nakamura, N., Komatsuzawa, H., 2013. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, nukacin ISK-1 and nisin A in *Staphylococcus aureus*. PLoS One 8 (7), e69455.

Kazazic, M., Nissen-Meyer, J., Fimland, G., 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. Microbiology 148 (7), 2019–2027.

Kim, O.Y., Hong, B.S., Park, K.S., Yoon, Y.J., Choi, S.J., Lee, W.H., Roh, T.Y., Lötvall, J., Kim, Y.K., Gho, Y.S., 2013. Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. J. Immunol. 190 (8), 4092–4102.

Kjos, M., Salehian, Ž., Nes, I.F., Diep, D.B., 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. J. Bacteriol. 192 (22), 5906–5913.

Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., 2011. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. Appl. Environ. Microbiol. 77 (10), 3335–3342.

Kosciuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. Mol. Biol. Rep. 39 (12), 10957–10970.

Kristian, S.A., Lauth, X., Nizet, V., Goetz, F., Neumeister, B., Peschel, A., Landmann, R., 2003. Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. J. Infect. Dis. 188 (3), 414–423.

Kruszewska, D., Sahl, H.G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S.O., Ljungh, A., 2004. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. J. Antimicrob. Chemother. 54 (3), 648–653.

Kutter, E., de Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., Abedon, S.T., 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (1), 69–86.

Laverty, G., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2011. The potential of antimicrobial peptides as biocides. Int. J. Mol. Sci. 12 (10), 6566–6596.

Layton, A.N., Hudson, D.L., Thompson, A., Hinton, J.C., Stevens, J.M., Galyov, E.E., Stevens, M.P., 2010. Salicylidene acylhydrazide-mediated inhibition of type III secretion system-1 in Salmonella enterica serovar Typhimurium is associated with iron restriction and can be reversed by free iron. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett. 302 (2), 114–122.

Le Blay, G., Lacroix, C., Zihler, A., Fliss, I., 2007. In vitro inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 45 (3), 252–257.

Lee, H., Kim, H.Y., 2011. Lantibiotics, class I bactiriocins from the genus Bacillus. J. Microbiol. Biotechnol. 21 (3), 229–235.

Leung, E., Weil, D.E., Raviglione, M., Nakatani, H., 2011. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. Bull. World Health Organ 89 (May (5)), 390-392, http://dx.doi.org/10.2471/BLT.11.088435.

Levin, B.R., Bull, J.J., 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. Nat. Rev. Microbiol. 2 (2), 166–173.

Lewis, K., 2012. Antibiotics: recover the lost art of drug discovery. Nature 485 (7399), 439–440.

Lewis, K., 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 12 (5), 371–387.

Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D., Coulthard, K., 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 25 (1), 11–25.

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Ashley Fetterman, K., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 517 (7535), 455–459.

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 16 (2), 161–168.

Livermore, D.M., 2008. Future directions with daptomycin. J. Antimicrob. Chemother. 62 (3), 41–49.

Loc-Carrillo, C., Abedon, S.T., 2011. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage 1 (2), 111–114.

Loeffler, J.M., Djurkovic, S., Fischetti, V.A., 2003. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect. Immun. 71 (11), 6199–6204.

- Lohans, C.T., Vederas, J.C., 2012. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. Int. J. Microbiol. 2012, 386410.
- Lu, T.K., Collins, J.J., 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (12), 4629-4634
- Mainous, A.G., Everett, C.J., Post, R.E., Diaz, V.A., Hueston, W.J., 2009. Availability of antibiotics for purchase without a prescription on the internet. Ann. Fam. Med. 7 (5), 431–435
- Manoharadas, S., Witte, A., Blasi, U., 2009. Antimicrobial activity of a chimeric enzybiotic towards Staphylococcus aureus. J. Biotechnol. 139 (1), 118-123.
- Marlovits, T.C., Stebbins, C.E., 2010. Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr. Opin. Microbiol. 13 (1), 47–52. Martínez-Júlvez, M., Rojas, A.L., Olekhnovich, I., Espinosa, A.V., Hoffman, P.S.,
- Sancho, J., 2012. Structure of RdxA: an oxygen insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in Helicobacter pylori. J. Fed. Eur. Biochem. Soc. 279 (23), 4306-4317.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S., 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J. Infect. Chemother. 11 (5), 211-219.
- Maura, D., Debarbieux, L., 2011. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90 (3), 851-859
- May, J.J., Finking, R., Wiegeshoff, F., Weber, T.T., Bandur, N., Koert, U., Marahiel, M.A., 2005. Inhibition of the D-alanine: D-alanyl carrier protein ligase from Bacillus subtilis increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall. Fed. Eur. Biochem. Soc. J. 272 (12), 2993-3003.
- McGowan, S., Buckle, A.M., Mitchell, M.S., Hoopes, J.T., Gallagher, D.T., Heselpoth, R.D., Shen, Y., Reboul, C.F., Law, R.H., Fischetti, V.A., Whisstock, J.C., Nelson, D.C., 2012. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (31), 12752-12757
- McInturff, J.E., Wang, S.J., Machleidt, T., Lin, T.R., Oren, A., Hertz, C.J., Krutzik, S.R., Hart, S., Zeh, K., Anderson, D.H., Gallo, R.L., Modlin, R.L., Kim, J., 2005. Granulysin-derived peptides demonstrate antimicrobial and anti-inflammatory effects against Propionibacterium acnes. J. Invest. Dermatol. 125 (2), 256-263.
- McPhee, J.B., Scott, M.G., Hancock, R.E., 2005. Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. Combinatorial Chem. High Throughput Screen, 8 (3), 257–272.
- Meir, S., Weber, R., Zbinden, R., Ruef, C., Hasse, B., 2011. Extended-spectrum β-lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. Infection 39 (4), 333-340.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., de Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., de Vos, D., Vaneechoutte, M., 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. PLoS One 4 (3), e4944, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004944.
- Moayeri, M., Wiggins, J.F., Lindeman, R.E., Leppla, S.H., 2006. Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. Antimicrob. Agents Chemother. 50 (8), 2658–2665.
- Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., Debarbieux, L., 2011. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. PLoS One 6 (2), e16963.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M.V., Christensen, B.E., Kjaerulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M., Kristensen, H.H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature 437 (7061), 975–980.
- Nabel, G.J., 2013. Designing tomorrow's vaccines. N. Engl. J. Med. 368 (6), 551–560. Nakatsuji, T., Gallo, R.L., 2012. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. J. Invest. Dermatol. 132 (3), 887–895.
- Nascimento, I.P., Leite, L.C., 2012. Recombinant vacines and the development of
- new vaccine strategies. Braz. J. Med. Biol. Res. 45 (12), 1102-1111. Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V.A., 2001. Prevention and elimination of upper
- respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (7), 4107-4112.
- Nelson, D., Schuch, R., Chahales, P., Zhu, S., Fischetti, V.A., 2006. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (28), 10765–10770.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2010. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. Appl. Environ. Microbiol. 76 (8), 2445–2450.
- Nieves, W., Asakrah, S., Qazi, O., Brown, K.A., Kurtz, J., Aucoin, D.P., McLachlan, J.B., Roy, C.J., Morici, L.A., 2011. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary Burkholderia pseudomallei infection. Vaccine 29 (46), 8381-8389.
- Nishant, T., Sathish, K.D., Arun, K.R., Hima, B.K., Raviteja, Y., 2011. Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. J. Microbial. Biochem. Technol. 3 (5), 121-124
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K., 2012. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Sci. 17 (1), 1–16.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide

(class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (1), 19-37

- Nitsch-Osuch, A., Gyrczuk, E., Wardyn, A., Życińska, K., Brydak, L., 2016. Antibiotic prescription practices among children with influenza. Adv. Exp. Med. Biol. 905, 25-31
- Nizet, V., 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. Curr. Issues Mol. Biol. 8 (1), 11-26.
- Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L., 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg. Infect. Dis. 17 (October (10)), 1791-1798, http:// dx.doi.org/10.3201/eid1710.110655.
- Nosanchuk, J.D., Dadachova, E., 2012. Radioimmunotherapy of fungal diseases: the therapeutic potential of cytocidal radiation delivered by antibody targeting fungal cell surface antigens. Front. Microbiol. 2 (283), 1-6.
- O'Flaherty, S., Ross, R.P., Meaney, W., Fitzgerald, G.F., Elbreki, M.F., Coffey, A., 2005. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. Appl. Environ. Microbiol. 71 4), 1836-1842
- O'Flaherty, S., Ross, R.P., Coffey, A., 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 33 (4), 801-819.
- Obeso, J.M., Martinez, B., Rodriguez, A., García, P., 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against Staphylococcus aureus in milk. Int. J. Food Microbiol. 128 (2), 212–218.
- Ojala, V., Laitalainen, J., Jalasvuori, M., 2013. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. Evol. Appl. 6 (6), 925–932.
- Oldfield, E., Feng, X., 2014. Resistance-resistant antibiotics. Trends Pharmacol. Sci. 35 (12), 664-674
- Oleksiewicz, M.B., Nagy, G., Nagy, E., 2012. Anti-bacterial monoclonal antibodies: back to the future? Arch. Biochem. Biophys. 526 (2), 124-131.
- Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13 (4), 210-219.
- Orito, Y., Morita, M., Hori, K., Unno, H., Tanji, Y., 2004. Bacillus amyloliquefaciens phage endolysin can enhance permeability of Pseudomonas aeruginosa outer membrane and induce cell lysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65 (1), 105–109.
- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E.C., Rehm, B.H., Hancock, R.E., 2008. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. Infect. Immun. 76 (9), 4176–4182.
- Pang, Y.P., Davis, J., Wang, S., Park, J.G., Nambiar, M.P., Schmidt, J.J., Millard, C.B., 2010. Small molecules showing significant protection of mice against botulinum neurotoxin serotype A. PLoS One 5 (4), e10129.
- Papagianni, M., Anastasiadou, S., 2009. Pediocins: the bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. BioMed Central Microbial Cell Factor 8 3–19
- Park, S.C., Park, Y., Hahm, K.S., 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. Int. J. Mol. Sci. 12 (9), 5971-5992.
- Parracho, H.M., Burrowes, B.H., Enright, M.C., McConville, M.L., Harper, D.R., 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. J. Mol. Genet. Med. 6, 279–286 (Epub 2012 April 23)
- Peters, B.M., Shirtliff, M.E., Jabra-Rizk, M.A., 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? PLoS Pathogens 6 (10), e1001067.
- Piddock, L.V., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. 19 (2), 382–402. Pina, E., Silva, M.G., Silva, E.G., Uva, A.S., 2010a. Infecção relacionada com a
- prestação de cuidados de saúde: infecções da corrente sanguínea (septicemia). Revista Portuguesa de Saúde Pública 28 (1), 19–30.
- Pina, E., Ferreira, E., Margues, A., Matos, B., 2010b. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. Revista Portuguesa de Saúde Pública 10, 27-39.
- Pirnay, J., de Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., van den Mooter, G., Buckling, A., Debarbieux, L., Pouillot, F., Azeredo, J., Kutter, E., Dublanchet, A., Górski, A., Adamia, R., 2011. The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure? Pharm. Res. 28 (4), 934-937.
- Pirnay, J., Verbeken, G., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., Huys, I., Lavigne, R., Merabishvili, M., Vaneechoutte, M., Buckling, A., de Vos, D., 2012. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. Future Virol. 7 (4), 379-390.
- Potera, C., 2013. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. Environ. Health Perspect. 121 (2), 48-53.
- Pouillot, F., Blois, H., Iris, F., 2010. Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria. Biosecur. Bioterror. 8(2) 155-169
- Proença, D., Fernandes, S., Leandro, C., Silva, F.A., Santos, S., Lopes, F., Mato, R., Cavaco-Silva, P., Pimentel, M., São-José, C., 2012. Phage endolysins with broad antimicrobial activity against Enterococcus faecalis clinical strains. Microbial Drug Resist. 18 (3), 322-332.
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., Rajendhran, J., 2013. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. Int. J. Peptides 2013, http://dx.doi.org/10.1155/ 2013/675391 (15 pp., Article ID 675391).
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., Saravanakumar, A., 2010. Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Adv. J. Food Sci. Technol. 2 (2), 138-144
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M., 2007. Listeria - review of epidemiology and pathogenesis. J. Microbiol. Immunol. Infect. 40 (1), 4-13.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2012. Rang & Dale's Pharmacology, 7th ed. Elsevier, Churchill Livingstone.

Rashel, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., Yagyu, K., Muraoka, A., Sugai, M., Hiramatsu, K., Honke, K., Matsuzaki, S., 2007. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. J. Infect. Dis. 196 (8), 1237–1247.

Rhoads, D.D., Wolcott, R.D., Kuskowski, M.A., Wolcott, B.M., Ward, L.S., Sulakvelidze, A., 2009. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. J. Wound Care 18 (6), 237–238.

Rivera, J., Nakouzi, A.S., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Dadachova, E., Casadevall, A., 2009. Radiolabeled antibodies to *Bacillus anthracis* toxins are bactericidal and partially therapeutic in experimental murine anthrax. Antimicrob. Agents Chemother. 53 (11), 4860–4868.

Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Donovan, D.M., Götz, F., García, P., 2013. The phage lytic proteins from the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiIPLA88 display multiple active catalytic domains and do not trigger staphylococcal resistance. PLoS One 8 (5), e64671, http://dx.doi.org/10. 1371/journal.pone.0064671.

Romanelli, R.M., Clemente, W.T., Lima, S.S., Rezende, E.M., Martinho, G.H., Paiva, L.F., Neves, F.A., Madeira, J.G., Amâncio, G.C., Lima, A.S., Faria, L.C., Coutinho, R.I., 2010. MRSA outbreak at a transplantation unit. Braz. J. Infect. Dis. 14 (1), 54–59.

Rouveix, B., 2007. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 59 (6), 1208–1209.

Samad, A., Sultana, Y., Aqil, M., 2007. Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr. Drug Deliv. 4 (4), 297–305.

Sang, Y., Blecha, F., 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. Anim. Health Res. Rev. 9 (2), 227–235.

Sass, P., Bierbaum, G., 2007. Lytic Activity of recombinant bacteriophage φ11 and φ12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 73 (1), 347–352.

Saylor, C., Dadachova, E., Casadevall, A., 2009. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. Vaccine 27 (6), 38–46.

Schmelcher, M., Powell, A.M., Becker, S.C., Camp, M.J., Donovan, D.M., 2012. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. Appl. Environ. Microbiol. 78 (7), 2297–2305.

Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S., Merril, C.R., 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. J. Virol. 75 (6), 2509–2515.

Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, V.A., 2002. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. Nature 418 (6900), 884–889.

Schuch, R., Pelzek, A.J., Raz, A., Euler, C.W., Ryan, P.A., Winer, B.Y., Farnsworth, A., Bhaskaran, S.S., Stebbins, C.E., Xu, Y., Clifford, A., Bearss, D.J., Vankayalapati, H., Goldberg, A.R., Fischetti, V.A., 2013. Use of a bacteriophage lysin to identify a novel target for antimicrobial development. PLoS One 8 (4), e60754.

Seo, M., Won, H., Kim, J., Mishig-Ochir, T., Lee, B., 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules 17 (10), 12276–12286.

Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. 121 (2), 123–138.

Singh, P.K., Chittpurna, A., Sharma, V., Patil, P.B., Korpole, S., 2012. Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus sp* Strain GI-9. PLoS One 7 (3), e31498.

Skurnik, M., Strauch, E., 2006. Phage therapy: facts and fiction. Int. J. Med. Microbiol. 296 (1), 5–14.

Slaninová, J., Mlsová, V., Kroupová, H., Alán, L., Tůmová, T., Monincová, L., Borovičková, L., Fučík, V., Ceřovský, V., 2012. Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. Peptides 33 (1), 18–26.

Soto, C.M., Ratna, B.R., 2010. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 21 (4), 426–438.Stavri, M., Piddock, L.J., Gibbons, S., 2007. Bacterial efflux pumps from natural

Stavri, M., Piddock, L.J., Gibbons, S., 2007. Bacterial efflux pumps from natural sources. J. Antimicrob. Chemother. 59 (6), 1247–1260.Stojković, E.A., Rothman-Denes, L.B., 2007. Coliphage N4 N-acetylmuramidase

Stojković, E.A., Rothman-Denes, L.B., 2007. Coliphage N4 N-acetylmuramidase defines a new family of murein hydrolases. J. Mol. Biol. 366 (2), 406–419.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morrais, J., 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 45 (3), 649–659.

Summers, W.C., 2012. The strange history of phage therapy. Bacteriophage 2 (2), 130–133.

Suttmann, H., Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., Wullich, B., Unteregger, G., Stöckle, M., Lehmann, J., 2008. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. BMC Urol. 8, 5–11.

Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F.E., Nakamura, S., Hong, P.Y., Yasunaga, T., Kamagata, Y., Liu, W.T., 2012. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. Environ. Microbiol. 14 (2), 441–452.

Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y., Unno, H., 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* 0157:H7 in gastrointestinal tract of mice. J. Biosci. Bioeng. 100 (3), 280–287.

Tessema, G.T., Moretro, T., Kohler, A., Axelsson, L., Naterstad, K., 2009. Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. Appl. Environ. Microbiol. 75 (22), 6973–6980.

Theuretzbacher, U., 2009. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? Int. J. Antimicrob. Agents 34 (1), 15–20. Tominaga, T., Hatakeyama, Y., 2007. Development of innovative pediocin PA-1 by DNA shuffling among class IIa bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 73 (16), 5292–5299.

Tsang, K.Y., Luk, S., Lo, J.Y., Tsang, T.Y., Lai, S.T., Ng, T.K., 2012. Hong Kong experiences the "Ultimate superbug": NDM-1 Enterobacteriaceae. Hong Kong Med. J. 18 (5), 439–441.

Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., van der Merwe, M.J., Rautenbach, M., 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant Listeria monocytogenes cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylg/vcerols. Appl. Environ. Microbiol. 68 (11), 5223–5230.

Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., Rautenbach, M., 2004. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin resistant Listeria monocytogenes strains. Microbiology 150 (9), 3025–3033.

Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T 40 (4), 277–283.

Viertel, T.M., Ritter, K., Horz, H.-P., 2014. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. J. Antimicrob. Chemother. 69 (9), 2326–2336.

Viswanathan, V.K., 2014. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. Gut Microbes 5 (1), 3-4.

Volozhantsev, N.V., Verevkin, V.V., Bannov, V.A., Krasilnikova, V.M., Myakinina, V.P., Zhilenkov, E.L., Svetoch, E.A., Stern, N.J., Oakley, B.B., Seal, B.S., 2011. The genome sequence and proteome of bacteriophage ΦCPV1 virulent for *Clostridium perfringens*. Virus Res. 155 (2), 433–439.

WHO, 2015. Antimicrobial Resistance, April 2015, Available online at www.who.int.

Walsh, T.R., 2011. New Delhi metallo-beta-lactamase-1: detection and prevention. Can. Med. Assoc. J. 183 (11), 1240–1241.

Wang, I.N., Deaton, J., Young, R., 2003. Sizing the holin lesion with an endolysin-beta-galactosidase fusion. J. Bacteriol. 185 (3), 779–787.

Wardal, E., Sadowy, E., Hryniewicz, W., 2010. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. Pol. J. Microbiol. 59 (2), 79–87.

Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A., 2003. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. Transplant. Proc. 35 (4), 1385–1386.

Wegener, H.C., 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. Curr. Opin. Microbiol. 6 (5), 439–445.

Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol. Rev. 28 (2), 127–181.

Weisman, L.E., Thackray, H.M., Steinhorn, R.H., Walsh, W.F., Lassiter, H.A., Dhanireddy, R., Brozanski, B.S., Palmer, K.G., Trautman, M.S., Escobedo, M., Meissner, H.C., Sasidharan, P., Fretz, J., Kokai-Kun, J.F., Kramer, W.G., Fischer, G.W., Mond, J.J., 2011. A randomized study of a monoclonal antibody (pagibaximab) to prevent stabhylococcal sepsis. Pediatrics 128 (2), 271–279.

delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. Pharm. Res. 28 (7), 1500–1519.

Wittebole, X., de Roock, S., Opal, S.M., 2013. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 4 (8), 1–10.

Wright, A., Hawkins, C.H., Anggård, E.E., Harper, D.R., 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. Clin. Otolaryngol. 34 (4), 349–357.

Wu, H., Lu, H., Huang, J., Li, G., Huang, Q., 2012. EnzyBase: a novel database for enzybiotic studies. BMC Microbiol. 12, 54, http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-54.

Xu, T., Ying, J., Yao, X., Song, Y., Ma, P., Bao, B., Jiang, W., Wu, X., Tou, H., Li, P., Ren, P., Fei, J., Yang, L., Liu, Q., Xu, Z., Zhou, T., Ni, L., Bao, Q., 2012. Identification and characterization of two novel bla(KLUC) resistance genes through large-scale resistance plasmids sequencing. PLoS One 7 (10), e47197.

Yan, R., Zhao, Z., He, Y., Wu, L., Cai, D., Hong, W., Wu, Y., Cao, Z., Zheng, C., Li, W., 2011. A new natural alpha-helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. Peptides 32 (1), 11–19.

Yang, H., Liang, L., Lin, S., Jia, S., 2010. Isolation and characterisation of a virulent AB1 of Acinetobacter baumannii. BMC Microbiol. 10, 131, http://dx.doi.org/10. 1186/1471-2180-10-131.

Yeung, A.T., Gellatly, S.L., Hancock, R.E., 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. Cell. Mol. Life Sci. 68 (13), 2161–2176.

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. 53 (12), 5046–5054.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R., 2012. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicolol. 52, 337–360.

Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415 (6870), 389–395.

Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2006. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. Appl. Environ. Microbiol. 72 (5), 3383–3389.

Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., Loessner, M.J., 2002. The murein hydrolase of the bacteriophage Ply 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. Appl. Environ. Microbiol. 68 (11), 5311–5317.