

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ- REITORIA DE PÓS- GRADUAÇÃO,
PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Welida Francielly de Camargo Campos

**HIDROGEL COM LÍQUIDO IÔNICO COMO CARREADOR DE
BACTERIÓFAGOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES PROFUNDAS DA
PELE**

**Sorocaba/SP
2020**

Welida Francielly de Camargo Campos

**HIDROGEL COM LÍQUIDO IÔNICO COMO CARREADOR DE
BACTERIÓFAGOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES PROFUNDAS DA
PELE**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Coorientador: Prof.^o Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

**Sorocaba/SP
2020**

Ficha Catalográfica

C218h Campos, Welida Francielly de Camargo
Hidrogel com líquido iônico como carreador de bacteriófagos para
tratamento de infecções profundas da pele / Welida Francielly de Camargo
Campos. – 2020.
101 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Co-orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Pele – Infecções - Tratamento. 2. Bacteriófagos. 3. Farmacologia. 4.
Medicamentos – Formas de dosagem. I. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho,
orient. II. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, co-orient. III.
Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Welida Francielly de Camargo Campos

**HIDROGEL COM LÍQUIDO IÔNICO COMO CARREADOR DE
BACTERIÓFAGOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES PROFUNDAS DA
PELE**

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

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Universidade de Sorocaba

Prof.^a Dr.^a Marcela Pellegrini Peçanha
Universidade de Sorocaba

Prof.^a Dr.^a Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

A Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata a Deus por todas as bênçãos recebidas, por sua bondade e auxílio nessa jornada, pois Ele ouviu minhas orações. Ele é a minha força e o meu escudo, Nele meu coração confia e Dele recebo ajuda (Salmos 28: 6-7).

Agradeço a minha família por todo incentivo, apoio, por toda compreensão nos momentos mais difíceis que, com palavras e gestos de amor, me ajudaram a prosseguir. Por todas as orações e pedidos de bênçãos que fizeram em meu favor.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório (Erica C. S. Silva, Liliam K. Harada, Fernanda Moreli e Thais J. Oliveira) que sempre estiveram dispostas a me auxiliar durante todo o processo para a realização deste trabalho. Obrigada pelo tempo disponibilizado, pelas risadas, desabafos e por toda a palavra de ânimo e força.

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Marta Maria D. C. Vila e ao meu coorientador Prof. Dr. Victor Manuel C. F. Balcão por todo conhecimento compartilhado, pela paciência e motivação. Obrigada pela oportunidade de fazer parte da equipe Phagelab.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Sorocaba (Marcia das Mercedes e Valéria Orsi) e aos membros do Laboratório de Avaliação da Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais da Universidade de Sorocaba (Labiton) (em particular a Taís Germano e a Prof.^a Dr.^a Renata Lima) por toda prestatividade e contribuição para a execução da pesquisa. Aos membros do Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox) (em particular a Thaísa Pickler e a Talita Segato) por todo auxílio durante as análises realizadas, mas também pelas conversas e pelos bons momentos que passamos juntas, por todo apoio e força que me deram. Obrigada!

À Prof.^a Dr.^a Angela F. Jozala, por toda paciência e dedicação durante o treinamento para a realização da análise de citotoxicidade celular. À Prof.^a Dr.^a Marcela Peçanha pelas sugestões e correções realizadas. Ao Prof. Dr. Mattieu Tubino pela parceria, que permitiu a realização de diversas análises no Instituto de Química da Unicamp.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, os quais contribuíram diretamente na minha formação profissional.

Por fim, agradeço à Capes pela concessão de financiamento na forma de bolsa de estudo Capes-Prosop e a Fapesp pelo fomento da pesquisa.

O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem a sua própria razão para
existir.

(Albert Einstein)

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um grave problema de saúde pública em nível global, sobretudo em ambientes hospitalares. Os principais patógenos causadores das infecções resistentes aos antibióticos pertencem ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*). Neste sentido, se faz necessário desenvolver alternativas capazes de combater essas infecções como a terapia fágica. Para o tratamento de infecções da pele e dos tecidos moles, pode-se empregar formulações tópicas. Contudo, muitas vezes, não há uma liberação adequada de ativos, pelo fato da pele atuar como uma barreira natural. Neste contexto, surgiram os líquidos iônicos como promotores de permeação cutânea, capazes de melhorar a entrega de agentes terapêuticos nas camadas mais profundas da pele. Para a administração de ativos por via dérmica, os hidrogéis são uma excelente alternativa por serem maleáveis, flexíveis e biocompatíveis, reduzindo a irritação dos tecidos naturais e permitindo a incorporação de substâncias que favoreçam a permeação cutânea. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um hidrogel contendo o líquido iônico oleato de colina e bacteriófagos líticos para *Acinetobacter baumannii*, para tratamento de infecções da pele. Para isso, dois bacteriófagos foram isolados e caracterizados, sendo posteriormente incorporados, juntamente com o oleato de colina, em hidrogel de alginato de sódio. A caracterização dos bacteriófagos foi realizada através de avaliação dos espectros líticos, eficiência de plaqueamento, curva de crescimento, capacidade de adsorção e análise de eletroforese em gel de poliacrilamida, microscopia eletrônica de transmissão e análise de difração de raios-X. O hidrogel foi caracterizado através de análises de difração de raios-X, espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura e tomografia de raios-X. Por fim, foi avaliada a capacidade de permeação transdérmica dos bacteriófagos, pelo ensaio de permeação em células de Franz, e a citotoxicidade do hidrogel pelo método de difusão em ágar. Como resultado, ambos os bacteriófagos mostraram atividade lítica contra a cepa de *Acinetobacter baumannii*. O hidrogel produzido apresentou homogeneidade, maleabilidade, ausência de fraturas e efetiva capacidade de permeação transdérmica dos bacteriófagos. O hidrogel foi capaz de proteger e estabilizar entidades proteicas bioativas e, ao mesmo tempo, promover uma melhoria no processo de permeação cutânea.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Hidrogel. Infecção. Líquido iônico. Permeação transdérmica.

ABSTRACT

The bacterial resistance to antibiotics is currently a serious global public health problem, especially in hospital environments. The main pathogens that cause antibiotic resistant infections belong to the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter*). Whereas, it is necessary to develop alternatives capable to combat these infections, as phage therapy. For the treatment of skin and soft tissues infections, topical formulations may be employed. However, sometimes, there is not an adequate drug release, because the skin works as a natural barrier. In this context, ionic liquids have emerged as skin permeation promoters, capable to improve the delivery of therapeutic agents to the deeper layers of the skin. For dermal asset administration, hydrogels are an excellent alternative because they are malleable, flexible and biocompatible, reducing the irritation of natural tissues and allowing the incorporation of substances that enhance skin permeation. The objective of this research was to develop a hydrogel containing ionic liquid, choline oleate, and lytic bacteriophages for *Acinetobacter baumannii*, to treat skin infections. For this, two bacteriophages were isolated and characterized, later incorporated along with choline oleate, in the sodium alginate hydrogel. The characterization of the bacteriophage were performed by evaluation of lytic spectra, efficiency of plating, growth curve, adsorption capacity and electrophoresis analysis in polyacrylamide gel, transmission electron microscopy and X-Ray diffraction analysis. The hydrogel was characterized by X-Ray diffraction analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and X-Ray tomography. Finally, the transdermal permeability of bacteriophages was evaluated by the Franz cell permeation assay and the hydrogel cytotoxicity by the agar diffusion method. As a result, both bacteriophages show lytic activity against the *Acinetobacter baumannii* strain. The hydrogel developed showed homogeneity, malleability, absence of fractures and efficacy of bacteriophage transdermal permeation capacity. The hydrogel was able to protect and stabilize bioactive protein entities at the same time, promotes an improvement in the skin permeation process.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Hydrogel. Infection. Ionic Liquid. Transdermal Permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele humana	23
Figura 2. Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia, material genético e principais características	32
Figura 3. Reação de neutralização ácido-base para a formação de oleato de colina	50
Figura 4. <i>Spot test</i> das amostras enriquecidas da (a) água de esgoto hospitalar (Unimed-Sorocaba/SP) e do (b) esgoto (Araçoiaba/SP) da estação de tratamento de águas residuais para detecção de bacteriófagos líticos contra <i>Acinetobacter baumannii</i> , mostrando regiões claras de lise bacteriana	58
Figura 5. Isolamento de bacteriófagos e seleção de placas fágicas com base em morfologias distintas	59
Figura 6. Espectro lítico dos fagos ph0041 e ph0035	60
Figura 7. Eficiência de plaqueamento das partículas fágicas (a) ph0041 e (b) ph0035	62
Figura 8. Curvas de adsorção dos bacteriófagos ph0041 (curva roxa) e ph0035 (curva azul)	63
Figura 9. Curvas <i>One step growth</i> dos bacteriófagos ph0041 (curva roxa) e ph0035 (Curva azul).....	65
Figura 10. Espectrofotometria UV-VIS dos bacteriófagos ph0041 (curva cinza) e ph0035 (curva azul).....	66
Figura 11. Eletroforetogramas dos bacteriófagos ph0041 (Faixa Ph41) e ph0035 (Faixa Ph35) e dos marcadores de massa molecular (Faixa M) corados com Coomassie.....	67
Figura 12. Difratogramas obtidos a partir da difração de raios-X dos bacteriófagos ph0035 (curva azul) e ph0041 (curva roxa)	69
Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos bacteriófagos ph0035 (a, b e c) e ph0041 (d, e e f).....	70
Figura 14. Espectro lítico do coquetel de bacteriófagos pelo método de disco difusão empregado em cultura de <i>Acinetobacter baumannii</i>	71
Figura 15. Aspecto macroscópico do líquido iônico oleato de colina (a) líquido iônico (1:1) e de seu (b) solvente eutético (DES 1:2)	72
Figura 16. Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana realizada com (1) bicarbonato de colina; (2) oleato de colina (1:1); (3) oleato de colina (1:2); (4) ácido oleico; (5) controle positivo (coquetel de antibióticos- penicilina (10000 U.I./mL) / estreptomicina (10 mg/mL)) e	

(6) controle negativo-solução salina; frente a (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *E. coli* e (c) *Staphylococcus aureus* 73

Figura 17. Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana realizada com o líquido iônico (1:1) (I.L 1:1) e com o líquido iônico (1:2) (I.L 1:2 (DES)) frente a cepa de *Acinetobacter baumannii* 74

Figura 18. Hidrogéis de alginato de cálcio. a-hidrogel sem líquido iônico e b- hidrogel com líquido iônico de oleato de colina 1:2 (DES) 76

Figura 19. Difrátogramas de raios X (XRD) de intensidade normalizada de a-hidrogel com oleato de colina 1:2 e coquetel de fagos; b-hidrogel com oleato de colina 1:2; c-hidrogel sem oleato de colina 1:2 e sem coquetel de fagos; d-bacteriófago ph0035 e e-bacteriófago ph0041 78

Figura 20. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). a- oleato de colina 1:2; b- hidrogel sem a microemulsão e sem as partículas fágicas; c- hidrogel com oleato de colina 1:2; d- hidrogel com oleato de colina e partículas fágicas 79

Figura 21. Termogramas calorimetria diferencial de varredura (DSC) do hidrogel sem oleato de colina e sem fagos (curva lilás); do hidrogel com oleato de colina (1:2) (curva roxa) e do hidrogel com oleato de colina (1:2) e coquetel de fagos (curva azul) 81

Figura 22. Tomografia computadorizada de raios X de a-hidrogel sem partículas fágicas e b-hidrogel com partículas fágicas 82

Figura 23. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva (DESEM) da superfície do hidrogel com oleato de colina (1:2) (a: x250; b: x1000; c: x2500) e do hidrogel com oleato de colina (1:2) e com partículas fágicas (e: x250; f: x1000, e g:x2500). Estruturas internas da seção transversal fraturada do hidrogel com oleato de colina 1:2 (d: x250) e do hidrogel com oleato de colina 1:2 e partículas fágicas (h: x250)..... 83

Figura 24. Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos em hidrogel pelo método de disco-difusão 84

Figura 25. Avaliação da capacidade de permeação cutânea do coquetel de bacteriófagos líticos para *Acinetobacter baumannii*, em hidrogel com oleato de colina 1:2 (curva rosa) e em hidrogel sem oleato de colina (curva azul) 85

Figura 26. Análises de difusão em ágar com células HaCaT. Controle negativo (-); controle positivo (+); membranas de hidrogel sem bacteriófagos (S/bacteriófago); membranas de hidrogel contendo um coquetel de bacteriófagos líticos para *A. baumannii*..... 86

Figura 27. Porcentagem de viabilidade celular das amostras de hidrogel sem líquido iônico (LI) (salmão) e hidrogel com líquido iônico (LI) (azul esverdeado) em relação ao controle negativo (preto) e ao controle positivo DMSO (azul), obtidos no ensaio de MTS durante 24, 48 e 72 horas. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de unidades formadoras de placas (UFP's) em diferentes concentrações das suspensões dos fagos ph0035 e ph0041	61
Tabela 2. Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar de acordo com a Norma ISO 10993-5/2009	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CCCD	Coleção de Culturas CEFAR Diagnóstica
CPM30	Cefepim
DME	Diagnósticos Microbiológicos Especializados
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DES	Solvente Eutético Profundo
DESEM	Microscopia Eletrônica de Varredura de Energia Dispersiva
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz-laser
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DRX	Difratometria de Raios- X
ED	<i>Energy-Depersive</i>
EOP	Eficiência de Plaqueamento
ESKAPE	Acrônimo para o grupo de bactérias constituídas por espécies de <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter</i> .
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> (Largura à meia altura)
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HaCaT	Queratinócitos Humanos
IPD	Índice de Polidispersão

IPM10	Imipenem
IPTM	Infecções de Pele e de Tecidos Moles
kDa	Quilo Dalton
LI	Líquido Iônico
LRAC	Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	milímetro
mM	Milimolar
MPM10	Meropenem
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MOI	Multiplicity of Infection
MΩ	Megaohms
nm	Nanômetro
OD	Densidade Ótica (<i>Optical density</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pró-análise
PES	Poliétersulfato
ph	Phage
PhL	PhageLab
POL 300	Polimixina B
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto

SDS-PAGE	Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UI	Unidade Internacional
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNISO	Universidade de Sorocaba
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV-vis	Radiação Ultra- Violeta e Visível
XRT	Tomográfica por Transmissão de Raios-X
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
μS	Microsiemens
λ	Comprimento de Onda (nm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Pele	23
2.2	Infecções da pele	24
2.3	Biofilmes bacterianos	25
2.4	Tratamento de infecções	26
2.5	Bactérias do Grupo ESKAPE	27
2.6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	28
2.7	Terapia fágica	30
2.8	Administração tópica de medicamentos	33
2.9	Hidrogéis	34
2.10	Líquidos iônicos	34
2.11	Microemulsões	35
3	OBJETIVO	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL	38
4.1	Reagentes e consumíveis	38
4.2	Material biológico	39
4.3	Equipamentos analíticos	39
5	MÉTODO	41
5.1	Preparação dos meios de cultura e do tampão fágico	41
5.2	Preparação da suspensão bacteriana de <i>Acinetobacter baumannii</i>	41
5.3	Isolamento de bacteriófagos para <i>Acinetobacter baumannii</i>	41
5.4	Enriquecimento dos bacteriófagos	42
5.5	<i>Spot test</i>	42
5.6	Preparação da cultura de <i>Acinetobacter baumannii</i> em placa de Petri	42
5.7	Verificação da presença de bacteriófagos	43

5.8	Isolamento dos bacteriófagos	43
5.9	Amplificação de bacteriófagos	43
5.10	Nomenclatura dos bacteriófagos	44
5.11	Caracterização biológica dos bacteriófagos	44
	Espectro lítico	44
	Título fágico.....	45
	Eficiência de plaqueamento	46
	Curva de adsorção	46
	Curva <i>One-step growth</i>	47
	Análise das suspensões bacteriofágicas concentradas por meio de varreduras espectrais no Ultravioleta.	47
	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
	Difração de raios-X (DRX).....	48
	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	49
	Espectro lítico do coquetel de fagos	49
5.12	Síntese e caracterização do líquido iônico oleato de colina (1:1) e o solvente eutético profundo de oleato colina (1:2)	49
5.13	Atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão.....	51
5.14	Preparação do hidrogel a base de alginato de sódio integrando uma microemulsão de líquido iônico (1:2) e um coquetel de bacteriófagos líticos	52
	Preparação e caracterização da microemulsão líquida iônica	52
	Análise por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)	53
	Preparação dos hidrogéis	53
5.15	Caracterização do hidrogel.....	53
	Análise por difração de raios-X (DRX) do hidrogel	53
	Análise por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	54
	Análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	54
	Análise tomográfica por transmissão de raios-X (XRT)	54
	Análise de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva (DESEM).....	54
5.16	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	54
5.17	Potencial de citotoxicidade do hidrogel pelo método de difusão em ágar.....	55
5.18	Potencial de citotoxicidade pelo ensaio MTS	55
	Cultivo das células fibroblastos 3T3	55
	Ensaio de citotoxicidade do hidrogel pelo ensaio de MTS	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1	Isolamento, propagação, purificação e caracterização dos bacteriófagos para <i>Acinetobacter baumannii</i>	57
6.2	Caracterização biológica dos bacteriófagos ph0041 e ph0035	59
	Espectros líticos	59
	Título fágico.....	60
	Eficiência de plaqueamento (EOP).....	62

Curva de adsorção	63
Curva <i>One-step growth</i>	64
Análise das suspensões bacteriofágicas concentradas por meio de varreduras espectrais UV-Vis.....	66
Análise por eletroforese (SDS-PAGE) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041	67
Análises por difração de raios X (XRD) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041.....	68
Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041.....	69
Espectro lítico do coquetel na cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC19606).....	70
6.3 Síntese de líquidos iônicos	71
6.4 Atividade antimicrobiana de líquidos iônicos e de reagentes pelo método de disco-difusão.....	72
6.5 Preparação do hidrogel.....	75
6.6 Caracterização do hidrogel.....	77
Difração de raios-X	77
Análise por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	78
Análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	80
Tomografia por transmissão de raios X (XRT).....	81
Análises de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva	82
6.7 Avaliação da atividade lítica das partículas fágicas em hidrogel pelo método de disco-difusão.....	83
6.8 Avaliação da capacidade de permeação cutânea do coquetel de bacteriófagos incorporados no hidrogel.....	84
6.9 Análise da citotoxicidade do hidrogel pelo método de difusão em ágar	86
6.10 Análise da citotoxicidade do hidrogel pelo ensaio de MTS.....	87
7 CONCLUSÃO.....	90
8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
REFERÊNCIAS	92

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa que originou esta dissertação de mestrado denominada **“Hidrogel com líquido iônico como carreador de bacteriófagos para tratamento de infecções profundas da pele”** foi desenvolvido como parte do projeto de pesquisa “TransAppIL- Permeação cutânea de entidades proteicas estabilizadas estruturalmente e funcionalmente, carregadas por líquidos iônicos” o qual teve fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). A autora Welida Francielly de Camargo Campos foi agraciada com bolsa de estudos Capes/Prosup (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares).

Os resultados originados durante a realização desta dissertação foram parcialmente apresentados em formato de painel no XXIX Brazilian Congress of Virology & XIII Mercosur Meeting of Virology, ocorrido em Gramado (RS, Brasil) em outubro de 2018, onde foi apresentado o pôster “Isolation and characterization of *Acinetobacter baumannii* lytic bacteriophages”, tendo como autores Welida F. Campos, Liliam K. Harada, Fernanda C. Moreli, Erica C. Silva, Anahi A. Miguel, Thais J. Oliveira, Marta M. D. C. Vila e Victor M. Balcão. No formato de poster, o trabalho foi apresentado ainda no ANM 2019- International Conference on Advanced Nano Materials em Aveiro/Portugal em de 17 a 19 de julho de 2019, intitulado “Preparation and characterization of a sodium alginate-based biohydrogel integrating the ionic liquid choline geranate as a permeation enhancer for the transdermal veiculation of bacteriophages” dos autores Welida F. Campos, Erica Silva, Liliam K. Harada, Fernanda C. Moreli, José M. Oliveira Jr., Matthieu Tubino, Victor M. Balcão e Marta M. D. C. Vila.

A pesquisa também, gerou resultados a serem divulgados no formato de artigo científico, intitulado de “A tale of three phages: isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*, as potential lethal vectors for respiratory infections”, tendo como autores Fernanda C. Moreli, Welida F. Campos, Liliam K. Harada, Erica C. Silva, Anahi A. Miguel, Thais J. Oliveira, Marta M. D. C. Vila, Matthieu Tubino e Victor M. Balcão.

Como resultados dos estudos desenvolvidos no laboratório PhageLab, paralelos as desta pesquisa, dois artigos científicos foram publicados em revistas científicas. Um deles com o título “Insights into protein-ionic liquid interactions aiming at macromolecule delivery system” dos autores Liliam K. Harada, Jorge F. B. Pereira, Welida F. Campos, Erica C. Silva, Carla G.

Moutinho, Marta M. D. C. Vila, José M. Oliveira Jr., José A. Teixeira, Victor M. Balcão e Matthieu Tubino disponível na revista *Journal Brazilian. Chemical Society*, v. 29, nº 10, p. 1983-1998, 2018 doi.org/10.21577/0103-5053.20180141; e outro artigo intitulado “Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art” dos autores Liliam K. Harada, Erica C. Silva, Welida F. Campos, Fernando S. Del Fiol, Marta Vila, Krystyna Dąbrowsk, Victor N. Krylov, Victor M. Balcão, publicado na revista *Microbiological Research* v. 212–213, p. 38-58, 2018, doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007. Também, como trabalho realizado não diretamente ligado s dissertação elaborou-se o artigo “Non-invasive transdermal delivery of human insulin using ionic liquids: proof-of-concept” tendo como autores Ludmila R. Jorge, Liliam K. Harada, Erica C. Silva, Welida F. Campos, Fernanda C. Moreli, Renata Lima, Gustavo Shimamoto, Jorge F. B. Pereira, José M. Oliveira Jr., Matthieu Tubino, Marta M. D. C. Vila e Victor M. Balcão a ser publicado.

Outro trabalho realizado com participação da aluna foi apresentado no formato de pôster no evento científico ANM 2018 – International Conference on Advanced Nano Materials em Aveiro/Portugal em de 18 a 20 de julho de 2018, intitulado “Hybrid biopolymer-ionic liquid hydrogels for the transdermal delivery of biomacromolecule” dos autores Liliam Harada, Erica Silva, Welida Campos, Matthieu Tubino, Marta M. D. C. Vila e Victor M. Balcão.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, e por todo o mundo, hospitais enfrentam o aumento da resistência antimicrobiana impulsionada pelos patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE (Gram positivos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e Gram negativos *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*). Estes microrganismos são resistentes a quase todos antibióticos comuns e são os responsáveis pela maioria das infecções hospitalares, principalmente, infecções da pele e dos tecidos moles (WYRES; HOLT, 2018; PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018).

A *Acinetobacter baumannii* é a segunda bactéria mais frequentemente isolada em seres humanos saudáveis. Contudo, exibe patogenicidade, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos. As cepas de *A. baumannii*, geralmente resistentes aos antibióticos, são isoladas normalmente de infecções adquiridas em ambiente hospitalar (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013). Dada a sua capacidade de infectar o trato respiratório humano, a *A. baumannii* pode desencadear casos de pneumonia, especialmente a pneumonia relacionada com mecanismo de ventilação, podendo causar outras severas infecções, como infecções da pele, feridas e bacteremia (ALMASAUDI, 2018). Este patógeno também pode provocar infecções necrosantes após grandes lesões traumáticas ou, até mesmo, após pequenas aberturas na pele ou nas mucosas provocadas por abrasões ou por picadas de insetos. Pacientes pós-cirúrgicos e imunocomprometidos são vulneráveis a esse tipo de infecção o que, muitas vezes, requerem internações hospitalares para tratamentos (STEVENS; BRYANT, 2017).

A emergência de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e a fraca penetração dos antibióticos em biofilmes bacterianos põe em ênfase a necessidade de alternativas seguras e eficazes para o tratamento antimicrobiano. Por este motivo, tem-se buscado alternativas contra os microrganismos patogênicos, que apresentem eficácia e mínimo ou nenhum efeito sobre a microbiota normal do corpo humano, fácil eliminação e, acima de tudo, com reduzida capacidade de indução de resistência bacteriana (CHENG et al., 2014). Entre estes tratamentos, pode-se mencionar a terapia fágica, as bacteriocinas, as endo ou exolisinas codificadas por fagos entre outras alternativas potenciais (ALLEN et al., 2014; RIOS et al., 2016).

A terapia fágica apresenta várias vantagens em relação à terapia antibiótica tradicional. O isolamento de fagos é rápido, relativamente simples e barato (DOSS et al., 2017). Contudo, é necessário verificar qual será o melhor método de administração para a realização da terapia fágica.

A administração tópica e transdérmica de peptídeos e drogas proteicas pode apresentar diversas vantagens quando comparada com a administração intravenosa ou a administração oral. No entanto, devido à excelente função de barreira na pele, principalmente pela estrutura altamente organizada do estrato córneo na parte mais externa da pele, a administração transdérmica, muitas vezes, pode não ser conseguida eficazmente (FUKUSHIMA et al., 2011).

Os líquidos iônicos surgiram como potenciais substâncias promotoras de permeação cutânea, sendo capazes de melhorar a entrega de agentes terapêuticos nas camadas mais profundas da pele. Estes compostos químicos podem ultrapassar as barreiras de proteção da camada córnea e, deste modo, colaborar no tratamento de feridas agudas e crônicas (ZAKREWSKY et al., 2014). A associação dos líquidos iônicos com ativos pode ser estabelecida de diversas maneiras e, os mesmos veiculados em diferentes formas farmacêuticas, como por exemplo, em hidrogéis.

Hidrogéis são matrizes poliméricas com configuração tridimensional capazes de absorver grandes quantidades de água ou outros fluídos biológicos. Em meio aquoso, o hidrogel pode intumescer, sendo considerado de grande potencial para aplicações médicas, visto que a água é o composto mais abundante no corpo humano. As possíveis aplicações dos hidrogéis incluem ainda, a engenharia de tecidos, liberação controlada de medicamentos, materiais de autocura, biossensores, bandagens de hemostasia entre outras. O caráter flexível e macio dos hidrogéis tem a vantagem de reduzir a irritação dos tecidos vizinhos naturais (CHAI; JIAO; YU, 2017). Contudo, a pele é uma barreira natural de proteção, com baixas taxas de permeação. Assim, o desenvolvimento de sistemas promotores de permeação, que promovam uma alteração transiente da estrutura do estrato córneo, possibilitando a permeação mais eficaz de moléculas bioativas é um desafio a ser vencido.

Neste sentido, objetivou-se o desenvolvimento de um sistema de permeação transdérmica capaz de proteger e estabilizar entidades proteicas bioativas, como os bacteriófagos e, ao mesmo tempo, promover uma melhoria no processo de permeação cutânea, favorecendo, desta forma a veiculação de bacteriófagos.

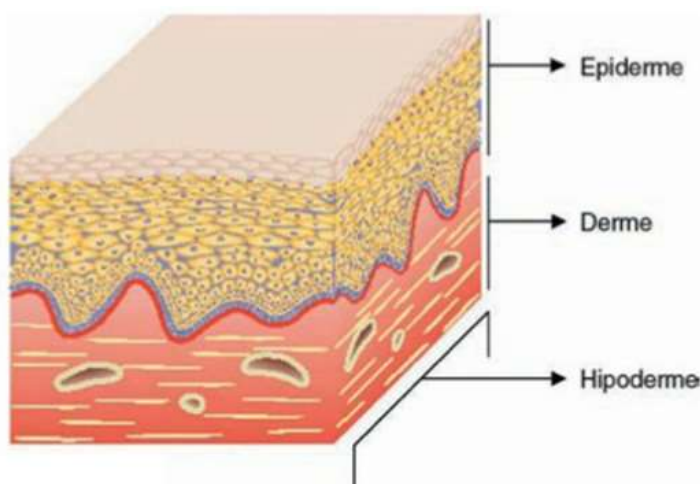
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, possui uma variedade de funções, atuando como uma barreira à perda excessiva de água, a agressões xenobióticas e microbianas. Participa da termorregulação, da proteção contra os raios UV e da resposta imune. Todavia, esta barreira constitui um desafio para o desenvolvimento de formulações cosméticas e farmacêuticas, nas quais a penetração de compostos ativos é crucial (SJOVALL et al., 2018).

A pele humana varia em espessura de acordo com a localização do corpo e é composta por três camadas básicas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Camadas da pele humana



Fonte: PETRI, 2009.

A epiderme tem cerca de 75-150 μm de espessura e é a camada externa da pele contendo células vivas e mortas. É constituída por queratinócitos, que migram continuamente da camada epidérmica inferior (estrato basal) em direção à camada epidérmica superior. No estrato córneo os queratinócitos são transformados em corneócitos, células mortas ricas em queratina. A derme, por sua vez, é muito mais espessa do que a epiderme (1~4 mm), sendo constituída por um tecido conjuntivo denso, formado por redes de fibras de colágeno e elastina, conferindo força e elasticidade à pele, órgãos sensoriais, terminações nervosas, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e raízes folículo-pilosas. A hipoderme é uma camada composta por tecido adiposo que se liga ao tecido muscular subjacente, fornecendo

preenchimento e isolamento para o corpo. Sua espessura varia consideravelmente sobre a superfície do corpo e também varia com a idade, sexo, raça, estado endócrino e nutricional do indivíduo (XU; LU, 2011).

A superfície da pele humana é colonizada por uma variedade de microrganismos que, em sua grande maioria, são inofensivos ou até mesmo benéficos ao hospedeiro. As características físicas e químicas da pele selecionam conjuntos únicos de microrganismos adaptados ao local onde habitam (GRICE; SEGRE, 2011). A colonização da pele por microrganismos, entre eles espécies de estafilococos, corinebactérias, propionibactérias e leveduras, pode trazer benefícios ao hospedeiro ao atuar como inibidor de desenvolvimento de microrganismos patogênicos ao competirem por espaço e alimento (DRYDEN, 2009).

A perda da integridade cutânea, devido a lesões ou doenças, pode resultar em desequilíbrio fisiológico substancial e em incapacidade significativa ou até a morte. Lesões cutâneas, como as úlceras e as feridas cirúrgicas traumáticas, facilitam a colonização dessas lesões por uma ampla gama de bactérias (MAVER et al., 2015).

2.2 Infecções da pele

As infecções da pele e dos tecidos moles (IPTMs) estão entre as infecções bacterianas mais comuns e podem ser consideradas desafios diagnósticos e terapêuticos. As IPTMs envolvem a invasão microbiana das camadas da pele e tecidos moles subjacentes e representam um conjunto heterogêneo de distúrbios da saúde com apresentação variável e etiologia diversa (ESPOSITO et al., 2017).

As IPTMs estão entre as condições mais comuns em pacientes que comparecem ao pronto-socorro. Às vezes, são suficientemente graves para levar a choque séptico e justificar a admissão do paciente em unidade de terapia intensiva (UTI). As IPTMs graves são responsáveis por 4,3 - 10,5% dos episódios sépticos e têm um nível de fatalidade que pode variar entre 1,3 e 7,2% (MALHEIRO et al., 2017).

As IPTMs são geralmente classificadas em duas categorias: infecções purulentas (furúnculos, carbúnculos, abscessos, etc.) e infecções não purulentas (erisipela, celulite, fascíte necrosante, etc.). As infecções de pele também podem ser classificadas em função de sua gravidade, sendo classificadas em leve, moderada e grave. Infecções leves são aquelas que apresentam somente sintomas locais, enquanto infecções moderadas a graves estão associadas aos sinais sistêmicos de infecção, como temperatura superior a 38 °C, frequência cardíaca acima

de 90 batimentos/minuto, frequência respiratória maior que 24 respirações/minuto ou leucograma superior a 12×10^3 células/mm³ (CHAHINE; SUCHER, 2015).

As infecções necrotizantes de tecidos moles estão entre as infecções de pele de maior dificuldade de tratamento. Este tipo de infecção é caracterizado clinicamente pela progressão rápida da doença, com destruição significativa do tecido local, podendo ocorrer na derme e na epiderme, porém afetam mais comumente, as camadas mais profundas do tecido adiposo (HAKKARAINEN et al., 2014).

A celulite infecciosa, úlceras ou infecções no local da ferida, infecções do local cirúrgico, grandes abscessos, queimaduras infectadas, úlceras da pele e úlceras do pé diabético, também são consideradas infecções complicadas e de alta gravidade por envolver tecidos moles mais profundos (LEONG et al., 2018).

De modo geral, o tratamento padrão consiste no uso sistêmico e/ou local de antibióticos de amplo espectro, grandes desbridamentos cirúrgicos e cuidados de suporte. Grande parte dos pacientes requer múltiplas remoções de tecidos mortos por intervenção cirúrgica e os sobreviventes geralmente têm feridas grandes e complexas, exigindo hospitalizações prolongadas. A taxa de mortalidade entre os indivíduos infectados está entre 25% a 35% (HAKKARAINEN et al., 2014).

Além disto, doenças de pele ou feridas podem ser infectadas com o desenvolvimento de uma camada blindada de células bacterianas (ou seja, um biofilme), que é bastante difícil de eliminar. Em tratamento de infecções cutâneas, os biofilmes bacterianos têm sido combatidos com formulações tópicas, mas estas tendem a irritar a pele e, muitas vezes, não são capazes de promover uma adequada liberação transdérmica de fármacos (ZAKREWSKY et al., 2014).

2.3 Biofilmes bacterianos

Bactérias produtoras de biofilme são responsáveis por cerca de 80% das infecções bacterianas em humanos, além de serem responsáveis pelo aumento da resistência aos antibióticos (FLEMING; RUMBAUGH, 2017).

O biofilme é um agregado organizado de microrganismos que vivem dentro de uma matriz polimérica extracelular produzida por eles, ligando-se irreversivelmente a uma superfície inanimada ou viva (JAMAL et al., 2018).

A formação de biofilme é complexa, podendo ser dividida em três etapas, sendo: contato inicial ou fixação às superfícies abióticas ou bióticas, maturação e formação da arquitetura do biofilme. A densidade celular microbiana necessária é atingida através da produção de

substâncias poliméricas extracelulares e do preenchimento de canais com água que funcionam como um sistema circulatório usado para distribuir nutrientes importantes e remover os resíduos das comunidades de microcolônias no biofilme. Finalmente, há o descolamento e a dispersão do biofilme. Nesta fase, as células microbianas dentro do biofilme multiplicam-se e dispersam-se rapidamente, permitindo o descolamento de células microbianas e a transferência para um novo local, ajudando na disseminação de infecções (OTTO, 2013).

Os biofilmes podem se desenvolver sobre a pele humana agravando a patologia, retardando a cicatrização e aumentando a possibilidade de transferência de contato em ambientes domésticos e hospitalares (ZAKREWSKY et al., 2014). Os microrganismos produtores de biofilme representam um risco significativo para a saúde devido à sua resistência aos antibióticos, pois essa resistência promove o aparecimento de infecções que muitas vezes são difíceis e às vezes impossíveis de tratar (CDC, 2020).

2.4 Tratamento de infecções

Os antibióticos mudaram a forma de tratamento e cura de diversas doenças. Contudo, nas últimas décadas, ocorreu um aumento de bactérias patogênicas resistentes a um ou a vários antibióticos. A resistência refere-se à capacidade do patógeno crescer na presença de uma droga (WACLAW, 2016).

Esse aumento de resistência bacteriana tem ocorrido devido ao uso indiscriminado de antibióticos para tratamento humano e em práticas agropecuárias inadequadas (TANGCHAROENSATHIEN, CHANVATIK; SOMMANUSTWEECHAI, 2018). A utilização excessiva de antibióticos é considerada um dos fatores que mais contribui para o aumento significativo da resistência bacteriana (LOUREIRO et al., 2016). Assim, com a falta de fármacos capazes de combater as cepas resistentes, a ocorrência de doenças infecciosas tem aumentado e se agravado, tornando-se um problema de saúde pública global. As mortes relacionadas à resistência antimicrobiana atingiram taxas alarmantes em todo o mundo. Estima-se que cerca de 700.000 pessoas morrem por ano devido a infecções resistentes aos medicamentos. Acredita-se que, até 2050, o número de mortes pode subir para 10 milhões, tornando-se a principal causa de morte no mundo (RAGHEB et al., 2019).

O surgimento de bactérias multirresistentes tem se tornado um problema de saúde pública principalmente para pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A intensa utilização de antimicrobianos impõe uma pressão seletiva e promove o surgimento de

resistência bacteriana. Além disso, os pacientes em UTI ficam sujeitos a infecções devido à baixa imunidade e a utilização de dispositivos invasivos (ventilação mecânica, cateteres venosos centrais e cateteres urinários). As infecções hospitalares adquiridas na UTI têm sido associadas ao aumento da morbidade e da mortalidade (JUÁREZ et al., 2015).

Assim, combater a resistência bacteriana tornou-se um desafio. Neste sentido, se faz necessário desenvolver novas estratégias que sejam eficientes contra os agentes patogênicos resistentes aos antibióticos (CHELLAT; RAGUZ; RIEDL, 2016). A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema coligado às altas taxas de morbidade e mortalidade pelo fato de desencadear infecções difíceis de tratar com os antibióticos convencionais, ou até mesmo infecções intratáveis (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, todavia, podem adquirir resistência aos antibióticos por meio de mutações genéticas e por transferência horizontal de genes (BLAIR et al., 2015). Os principais impulsionadores da transferência horizontal de genes são os plasmídeos, os bacteriófagos e o DNA (ácido desoxirribonucleico) extracelular através dos processos de conjugação, transdução e transformação natural, respectivamente (LERMINIAUX; CAMERON, 2019).

As infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão entre as mais temidas pela dificuldade de tratamento, decorrente da alta resistência desses microrganismos. Consequentemente, estas infecções apresentam escassas opções terapêuticas, além da dificuldade de diagnóstico (NÓBREGA; CARMO FILHO; PEREIRA, 2013).

2.5 Bactérias do Grupo ESKAPE

ESKAPE é um acrônimo utilizado para nomear um grupo de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, constituído por espécies de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*. Este grupo de bactéria representa o maior desafio no tratamento de infecções no ambiente hospitalar em função dos diversos mecanismos de resistência destes agentes, aos antimicrobianos disponíveis para uso clínico (SILVA et al., 2017). Além disto, os patógenos do grupo ESKAPE são produtores de biofilmes, o que dificulta a ação dos antibióticos e das células da resposta imune do hospedeiro (MULANI et al., 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos onde são citadas 12 famílias de bactérias, sendo que, seis delas pertencentes ao grupo ESKAPE, que se tornaram uma ameaça à saúde humana devido a sua resistência aos antibióticos. A lista da OMS

é dividida em três categorias, de acordo com a urgência da necessidade de novos antibióticos: prioridade crítica, alta e média. No grupo com prioridade crítica encontram-se bactérias multirresistentes que representam uma ameaça em ambientes hospitalares, lares de idosos e entre pacientes cujo cuidado requer dispositivos como ventiladores e cateteres de sangue. Nesta classe estão presentes *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e várias *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (WHO, 2017).

2.6 *Acinetobacter baumannii*

A *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria oportunista cocobacilo, Gram-negativa, aeróbica, pleomórfica, não móvel e não fermentadora. Tolerante a amplas faixas de temperatura, pH e umidade. A *A. baumannii* pode sobreviver em superfícies secas por cinco meses, representando um desafio para as medidas de controle de infecção hospitalar (ALMAGHRABI; MARTIN; MOHAME, 2018).

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores são microrganismos incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através da fermentação, degradando-os por via oxidativa. O uso abusivo e empírico de antibióticos promoveu o desenvolvimento de resistência bacteriana nesses patógenos, tornando-os os principais causadores de infecções associados aos cuidados de saúde, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os bacilos Gram-negativos não fermentadores mais frequentemente isolados são a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Acinetobacter baumannii* (GREWAL et al., 2017).

A *A. baumannii* é responsável por infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário e meningite (MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013). Pacientes que sofrem de uma doença subjacente ou que foram submetidos a grandes procedimentos cirúrgicos são os mais acometidos por infecções por *A. baumannii*, visto que esta bactéria pode entrar facilmente no corpo através de feridas abertas, cateteres intravasculares e ventiladores mecânicos (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014).

Normalmente, as infecções da pele e dos tecidos moles causadas por *Acinetobacter* são infecções referentes a pacientes que sofreram queimaduras graves ou lesões traumáticas. As primeiras evidências de infecções de pele por *Acinetobacter baumannii* apareceram em clínicas militares que lidaram com feridas traumáticas de guerra, onde foi possível isolar *A. baumannii* de lesões histopatológicas compatíveis com fasciíte necrosante e osteomielite (BUCHAN; LEDEBOER; EDMISTON, 2011).

A *A. baumannii* tem como alvo específico tecidos úmidos como mucosas ou áreas da pele que estão expostas, seja por acidente ou lesão (HOWARD et al., 2012). Inicialmente a pele e os tecidos moles infectados por *A. baumannii* apresentam uma aparência de "peau d'orange" (semelhante à da pele de laranja). No estágio seguinte a pele se assemelha a uma lixa que, eventualmente, dá lugar a vesículas claras na pele. Em áreas de ruptura da pele podem surgir bolhas hemorrágicas, com um processo necrosante visível seguido por bacteremia (SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008).

Nos últimos anos a *A. baumannii* tornou-se motivo de preocupação para a área de saúde por promover infecções graves associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade devido à sua capacidade excepcional de adquirir resistência a quase todos os antibióticos disponíveis. Neste sentido, a *A. baumannii* foi nomeada como patógeno prioritário na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o desenvolvimento de novos antibióticos (ELHOSSEINY; ATTIA, 2018).

Devido ao rápido acúmulo de resistência a múltiplos antibióticos, o grupo dos antibióticos carbapenêmicos classificados como um subgrupo dos antibióticos β -lactâmicos é um dos únicos grupos efetivos de antibióticos contra infecções por *A. baumannii* multirresistente. Semelhante a outros β -lactâmicos, os carbapenêmicos inibem a síntese da parede celular, resultando em morte celular. Todavia, o número de cepas de *A. baumannii* que apresentam resistência aos carbapenêmicos vem aumentando rapidamente. Antibióticos como a colistina estão sendo utilizados como recurso de tratamento, porém, podem causar efeitos colaterais físicos graves, incluindo neurotoxicidade ou nefrotoxicidade (CHEN et al., 2017).

O aumento da resistência antimicrobiana da *Acinetobacter baumannii* tem sido amplamente documentado, sendo reconhecido como um dos bacilos Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos mais difíceis de controlar, sobrevivendo por períodos prolongados sob uma ampla gama de condições ambientais. A resistência antimicrobiana desse microrganismo patogênico limita muito as opções terapêuticas para pacientes infectados com este patógeno (ELIOPOULOS; MARAGAKIS; PERL, 2018).

A dispersão de bactérias resistentes em conjunto com o desenvolvimento lento de novos antibióticos gera um *déficit* de terapias efetivas contra infecções bacterianas. O tempo e os recursos financeiros gastos desde a fase de descoberta, da avaliação da eficácia clínica e da segurança até a fase de aprovação, tornou-se um desafio para encontrar e introduzir novos antibióticos no mercado. É necessário, portanto, o investimento em alternativas que possam reduzir a resistência e os efeitos colaterais normalmente causados pelo uso de antibióticos (SHARMA et al., 2018).

Buscam-se então alternativas atóxicas e seletivas contra patógenos com mínimo ou nenhum efeito sobre a microbiota intestinal, de fácil decomposição e eliminação do corpo e do ambiente e, acima de tudo, com reduzida de indução de resistência (CHENG et al., 2014). Dentre as alternativas para o tratamento de infecções por bactérias resistentes aos antibióticos convencionais destaca-se a fagoterapia ou terapia fágica (RIOS et al., 2016).

2.7 Terapia fágica

Existem algumas controvérsias a respeito da data da descoberta dos bacteriófagos. Todavia, em 1896 o microbiologista Ernest Hankin relatou que as águas dos rios indianos Ganges e Yamuna continham um princípio biológico capaz de destruir culturas de bactérias indutoras da cólera. Hankin afirmou que está “substância” poderia passar por filtros de porcelana com poros suficientemente finos para reter microrganismos maiores como as bactérias (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001).

No ano de 1915 o microbiologista Frederick Twort estava tentando propagar o vírus “Vaccinia” em placas de ágar. Twort constatou a presença de manchas transparentes e, ao observar mais de perto, observou que se tratavam de bactérias mortas. Além disso, essas zonas eram transmissíveis o que o fez propor três possíveis explicações. Sugeriu que poderia ser uma manifestação incomum do ciclo de vida bacteriano, ou uma enzima produzida pelas próprias bactérias ou, mais radicalmente, algum tipo de “vírus ultra-microscópico”. No entanto, Twort não teve recursos para verificar se essas hipóteses seriam ou não verdadeiras (KEEN, 2015).

Foi então que, em 1917, o microbiologista Félix Hurbert d’ Herelle descreveu o que segundo ele, seria um parasita intracelular de bactérias dando-lhe o nome de bacteriófago. Em 1919 d’Herelle testou coquetéis de fagos contra disenteria e desenvolveu produtos com fagos comercializados pela empresa que mais tarde se tornaria a L’Oréal (GROSS, 2011).

Os bacteriófagos ou fagos são a forma mais abundante de vida. Estima-se que existam cerca de 10^{31} entidades fágicas no planeta, sendo 10 vezes mais do que o número de células bacterianas (KUREK et al., 2016). Os fagos são vírus que consistem em um genoma de DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico) cercado por um revestimento proteico (capsídeo) (LIN; KOSKELLA; LIN, 2017).

Apesar dos numerosos estudos disponíveis sobre bacteriófagos de DNA, a biologia dos bacteriófagos de RNA tem sido pouco investigada. Mais de 1900 genomas de bacteriófagos foram depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI) nos Estados

Unidos da América. Contudo, somente seis sequências genômicas são atribuídas aos fagos de RNA (YANG et al., 2016).

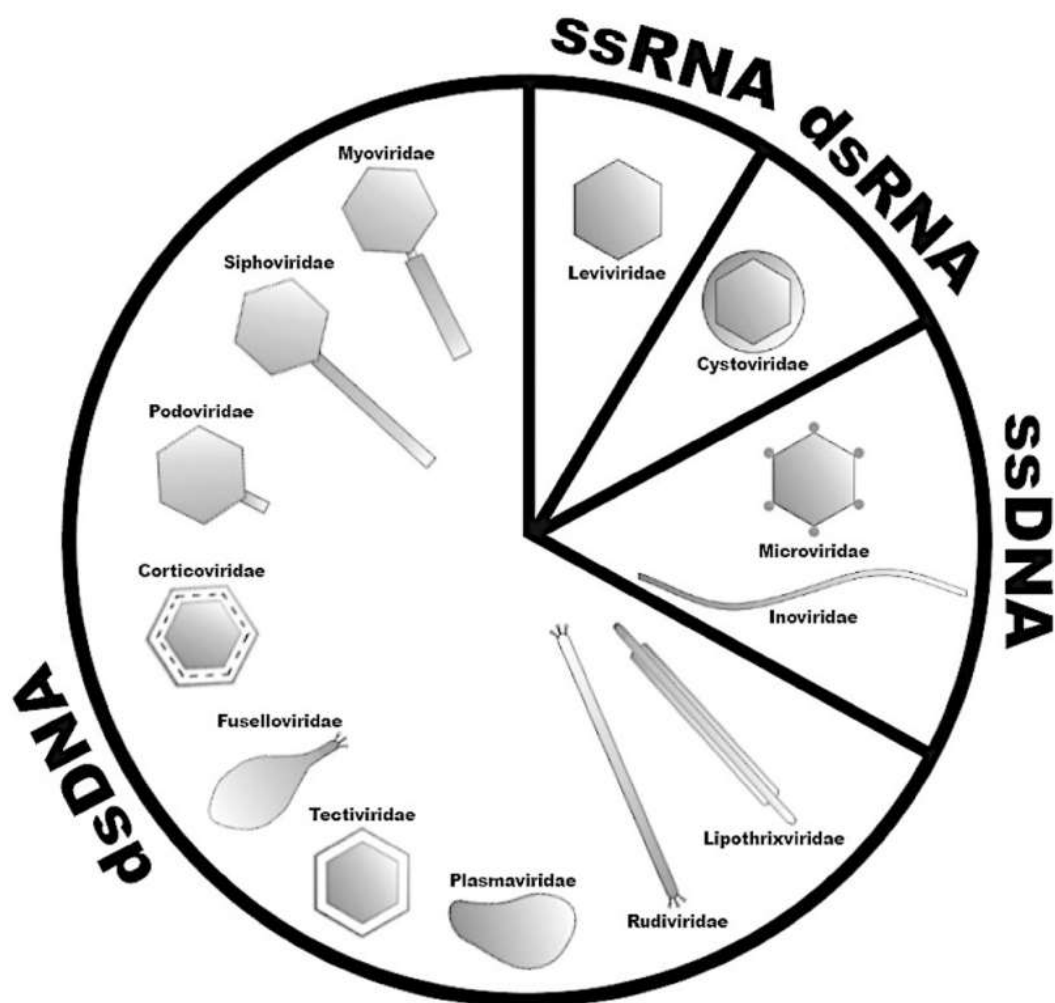
Os fagos são parasitas bacterianos, incapazes de se reproduzirem independentemente, dependendo do hospedeiro para a sua sobrevivência. Ao infectarem bactérias, os fagos incorporam seu genoma viral no genoma do hospedeiro, replicando-se como parte do hospedeiro (ciclo lisogênico) ou multiplicando-se dentro da célula hospedeira antes de liberar novas partículas de fago (ciclo lítico) (BALCAZAR, 2014).

Durante o ciclo lisogênico o material genético do bacteriófago é integrado no genoma do hospedeiro, criando um prófago. O prófago permanece em estado latente, sendo replicado com o genoma do hospedeiro até o ciclo lítico ser induzido. No ciclo lítico, novos fagos são produzidos utilizando o metabolismo do hospedeiro, sendo liberados durante a lise da célula bacteriana (POPA; LANDAN; DAGAN, 2017).

No ciclo lítico a maquinaria metabólica do hospedeiro é redirecionada para a produção de novas partículas bacteriofágicas, onde ocorre a replicação do genoma do bacteriófago no citoplasma bacteriano com a síntese de proteínas virais para a formação da capsíde e da cauda. Os vírions de bacteriófagos podem ser montados em ciclos de 30 min. A produção de holinas e lisinas sintetizadas pelos bacteriófagos causam a lise da bactéria, libertando uma onda de vírions recém formados (HARADA et al., 2018a).

Basicamente existem três meios para a caracterização dos fagos, sendo: i) o fenótipo da infecção (incluindo a gama de hospedeiros); ii) morfologia (incluindo a forma da partícula, suas dimensões, propriedades físico-químicas e características de ácidos nucleicos); e iii) a sequência do genoma. Considerando sua morfologia, os bacteriófagos fagos podem medir de 24 a 200 nanômetros, apresentar capsídeo com forma icosaédrica, cúbica, filamentosa ou pleomórfica e presença de cauda. Estas características são utilizadas como parâmetros na classificação de acordo com sua taxonomia, permitindo a classificação dos fagos com base no tipo de morfologia e de ácidos nucleicos em 13 famílias (BATALHA, 2017). A Figura 2 mostra a classificação dos diferentes bacteriófagos.

Figura 2. Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia, material genético e principais características



Fonte: HARADA et al., 2018a

A terapia fágica apresenta várias vantagens em relação à terapia antibiótica tradicional, tais como o isolamento de fagos é rápido, relativamente simples e barato; a resistência ao fago se desenvolve cerca de dez vezes mais lentamente que a resistência aos antibióticos e os fagos permanecem infecciosos sob condições ambientais muito adversas e, tendem a continuar se replicando até que a densidade populacional da bactéria hospedeira tenha sido significativamente reduzida (DOSS et al., 2017). Os fagos não infectam células humanas ou animais, porém, são altamente específicos e eficientes contra suas bactérias alvo, portanto, em contraste com a maioria dos antibióticos, eles não causam uma redução ou mesmo a eliminação da microbiota natural nos organismos hospedeiros (PARASION et al., 2014).

2.8 Administração tópica de medicamentos

A administração de fármacos através da pele pode ser conseguida por duas vias: a tópica e a transdérmica. A via tópica tem como principal objetivo uma ação terapêutica local e a via transdérmica que tem uma ação terapêutica sistêmica. Uma das grandes vantagens da administração tópica de fármacos é a ação direta no sítio alvo ou muito próximo, necessitando assim de uma menor quantidade de substância ativa e como tal, originando menos efeitos secundários (LOURENÇO, 2013).

A entrega eficiente de ativos através da pele tem sido uma meta dos pesquisadores há décadas devido a inúmeras vantagens quando comparada com a administração intravenosa ou a administração oral. Estas vantagens incluem a melhora na bioatividade das drogas, pois não sofrem ação de enzimas hidrolíticas do trato gastrointestinal ou do metabolismo hepático de primeira passagem quando administrado via oral; promoção de maior adesão do paciente e redução dos efeitos colaterais. No entanto, devido à excelente função de barreira na pele, principalmente pela estrutura altamente organizada do estrato córneo na parte mais externa da pele, a administração transdérmica pode não ser conseguida eficazmente (FUKUSHIMA et al., 2011; SCHOELLHAMMER; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2014).

Para tentar solucionar a dificuldade de permeação de ativos muitas abordagens estão sendo desenvolvidas afim de aumentar a permeabilidade das drogas através da pele pela ruptura do estrato córneo. Entre elas, podem se destacar o uso de promotores químicos de permeação, métodos térmicos, eletroporação, iontoforese, sonoforese, ablação a laser e microagulhas (KALLURI; BANGA, 2011; CHOI et al., 2012).

Os promotores de permeação são compostos químicos, por si só, farmacologicamente inativos, mas que podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo, quando incorporados numa formulação transdérmica e, deste modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco (MARTINS; VEIGA, 2002). No entanto, muitos destes compostos são irritantes e não são bem tolerados (DOBLER et al., 2016).

Alguns estudos relataram a incorporação bem-sucedida de líquidos iônicos (LIs) em emulsões e, particularmente, em microemulsões, como substitutos de óleo ou água, como aditivos ou como surfactantes (ALMEIDA et al., 2017). Estudos mostraram a relevância do uso de LIs para melhorar a solubilidade e a permeação de sistemas tópicos de liberação de medicamentos (ZAKREWSKY et al., 2014; CAPARICA et al., 2018).

Para a aplicação tópica e veiculação de ativos farmacêuticos também tem se verificado na literatura especializada o uso da forma farmacêutica hidrogel que apresenta facilidade de aplicação e remoção (JODAR et al., 2015).

2.9 Hidrogéis

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais de estrutura hidrofílica com capacidade de absorver e liberar água como respostas as condições ambientais. O teor de água retida na malha de rede do hidrogel pode variar em função da estrutura da rede do polímero, temperatura e pH do meio ambiente e força iônica da solução aquosa no contato com o hidrogel (CELESTINO et al., 2017).

A estrutura tridimensional dos hidrogéis deve-se à presença de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Devido a estas ligações cruzadas, os hidrogéis tendem a apresentar um comportamento elástico e, por vezes, viscoelástico. A reticulação entre as cadeias poliméricas pode ser fornecida por ligações de hidrogênio, interações de vander Waals e ligações covalentes (KHAN et al., 2016).

As propriedades físicas ajustáveis, degradabilidade controlável e a capacidade de proteger drogas lábeis da degradação, permitem que os hidrogéis sirvam como veículo capaz de controlar a liberação de ativos. O alto teor de água (tipicamente entre 70-99%) fornece similaridade física aos tecidos humanos, conferindo aos hidrogéis excelente biocompatibilidade e a capacidade de encapsular facilmente drogas hidrofílicas (LI; MOONEY, 2016).

A liberação de princípios ativos carregados por hidrogéis pode ocorrer por diversos mecanismos em processos isolados ou não, como por dissolução do ativo no hidrogel; por liberação de microcápsulas contendo princípios ativos; por liberação via estímulos do ambiente como variação de pH, temperatura, etc.; por degradação/erosão do hidrogel, ou por intumescimento do hidrogel com liberação da substância ativa. Estes mecanismos são fortemente influenciados pelas características físico-químicas dos hidrogéis tais como a estrutura molecular da matriz, grau de intumescimento, reticulação, entre outros (ALCÂNTARA, 2013).

2.10 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos são compostos químicos constituídos por íons, possuindo pontos de fusão abaixo de 100 °C. Possuem propriedades interessantes, tais como baixa pressão de vapor

à temperatura ambiente, perfis de solubilidade extensos e variáveis, alta estabilidade térmica, não inflamável, polaridade adaptável, perfis químicos inertes, ponto de fusão excepcionalmente baixo e viscosidade variável. Eles são compostos por dois componentes distintos, ânions e cátions. O cátion geralmente é maior e orgânico, enquanto o ânion é relativamente menor e inorgânico. Esta combinação leva a uma diminuição na cristalinidade do sistema, permitindo que os líquidos iônicos sejam líquidos em baixas temperaturas (SIDAT et al., 2019).

Estudos realizados por Zakrewsky e colaboradores (2014) mostraram que os líquidos iônicos aumentaram a permeabilidade de algumas drogas pela barreira cutânea. O estudo revelou também que os líquidos iônicos podem romper os arranjos regulares e compactos dos corneócitos, alterar as propriedades superficiais do estrato córneo e tornar a estrutura da pele mais permeável. Além disso, vários líquidos iônicos apresentaram propriedades antimicrobianas ao agir em bactérias patogênicas Gram-negativas formadoras de biofilme (HARADA et al., 2018b).

Devido as suas interessantes características, os líquidos iônicos estão sendo aplicados em diversas áreas inclusive na indústria farmacêutica, onde estão sendo utilizados em sistemas de administração oral para fármacos pouco solúveis em água (WILLIAMS et al., 2014), como agentes facilitadores de permeação cutânea, como antimicrobianos (ZAKREWSKY et al., 2014) e no preparo de microemulsões (ZHOU; LUO; FU, 2014).

A permeação favorecida pelos líquidos iônicos pode ser utilizada para a veiculação de importantes moléculas bioativas para o tratamento de patologias da pele. Dentre as entidades proteicas de interesse estão os bacteriófagos.

2.11 Microemulsões

As microemulsões são definidas como dispersões homogêneas termodinamicamente estáveis, fluidas, transparentes (ou translúcidas), que possuem uma composição quaternária incluindo fase oleosa, fase aquosa, surfactante e coagente tensoativo em proporções apropriadas (CONEAC et al., 2015). As microemulsões têm despertado o interesse de pesquisadores devido ao seu potencial como veículos de entrega de drogas em aplicações alimentícias farmacêuticas e na indústria petroquímica (ARAÚJO et al., 2018).

Para a indústria farmacêutica as microemulsões são úteis para administração tópica de fármacos devido às suas diversas vantagens, como alta capacidade de solubilizar compostos hidrofílicos e lipofílicos, excelente estabilidade termodinâmica, fácil preparação, baixo custo, claridade ótica e aumento da penetração de drogas através de a pele. Contudo, devido à sua alta

fluidez, as microemulsões são difíceis de aplicar na pele, sendo necessário aumentar a sua viscosidade com a adição de agentes gelificantes (CONEAC et al., 2015).

Os líquidos iônicos podem funcionar como um componente da fase aquosa ou da fase oleosa de microemulsões com excelente capacidade de solubilização tanto de drogas hidrofóbicas como de hidrofílicas. Microemulsões contendo líquido iônico são capazes de superar as incapacidades das microemulsões convencionais favorecendo a dissolução de uma série de substâncias químicas que são insolúveis em água e resultam em melhores atividades farmacológicas das drogas (WANG et al., 2018).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um hidrogel com líquido iônico impregnado com partículas bacteriofágicas para o tratamento de infecções cutâneas profundas causadas por *Acinetobacter baumannii*.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Isolar, propagar, purificar e caracterizar (biologicamente e físico-quimicamente) bacteriófagos estritamente líticos para *Acinetobacter baumannii* (ATCC-19606);
- ❖ Sintetizar o líquido iônico oleato de colina, nas proporções 1:1 e 1:2 de bicarbonato de colina: ácido oleico, para estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas;
- ❖ Produzir um hidrogel contendo líquido iônico em sua formulação e incorporar as entidades proteicas bioativas (bacteriófagos);
- ❖ Caracterizar físico-quimicamente o hidrogel;
- ❖ Avaliar a manutenção da atividade biológica das partículas bacteriofágicas, os parâmetros de permeação cutânea e o perfil de liberação das entidades proteicas integradas no hidrogel;
- ❖ Determinar a citotoxicidade do hidrogel produzido.

4 MATERIAL

4.1 Reagentes e consumíveis

O fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico, cloreto de cálcio e cloreto de sódio foram adquiridos da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema/SP, Brasil). O sulfato de magnésio foi adquirido da Labsynth (Diadema/SP, Brasil).

Para o preparo dos líquidos iônicos o bicarbonato de colina foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA) e o ácido oleico foi adquirido da Labsynth - Produtos para Laboratório (Diadema SP, Brasil).

O meio de cultura *tryptic soy broth* (TSB) e *trypticase soy agar* (TSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). O ágar bacteriológico foi adquirido da Gibco Diagnostics (Madison WI, USA).

Os Sensidiscs para antibiogramas na forma de discos impregnados com polimixina B (POL300), cefepim (CPM30), imipenem (IPM10) e meropenem (MPM10), foram adquiridos na DME - Diagnósticos Microbiológicos Especializados (Araçatuba/SP, Brasil).

O sistema de filtração esterilizante utilizado (Stericup® com membrana de poliétersulfato (PES) com diâmetro de poro de 0,22 µm) foi adquirido da empresa Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha).

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizados o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazólio] da Promega (Madison, WI/USA) e o dimetilsulfóxido (DMSO) ambos cedidos gentilmente pela profa. Dr.^a Ângela Jozala.

Para a eletroforese foram utilizados padrão de cor dupla Precision Plus Protein™ pré-corados com proteínas de pesos moleculares variando de 10 kDa a 250 kDa e tampão de Laemmli (161-0737) ambos da Bio-RAD (Califórnia, CA, USA).

A água empregada nas preparações foi purificada em ultrapurificador (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) com resistividade final de 18,2 MΩ.cm⁻¹ e condutividade de 0,05 µS.cm⁻¹. Os solventes utilizados foram todos de grau analítico sem purificação adicional. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

4.2 Material biológico

A linhagem bacteriana utilizada a *Acinetobacter baumannii* (American Type Culture Collection - ATCC 19606) foi adquirida em *slants* da Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello (Campinas/SP, Brasil) e reativada seguindo as indicações do fornecedor.

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* (CCCD- S007) e *Escherichia coli* (CCCD- E003) foram adquiridas da Cefar (São Paulo/SP, Brasil) e reativadas seguindo as indicações do fornecedor.

As linhagens celulares HaCaT (queratinócitos humano) e NIH-3T3 (células fibroblastos) utilizadas no ensaio de citotoxicidade foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ Cod. 0341 e BCRJ Cod. 0017, respectivamente) gentilmente cedidas pela prof^a. Dr.^a Renata Lima. As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5% CO₂, em meio de crescimento DMEM High (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% (m/m) de antibióticos (Penicilina 0,1 U.I./mL/Estreptomicina 0,1 mg/mL).

A água de esgoto do Hospital Unimed "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP foi coletada em 22 de fevereiro de 2017 e a água da Estação de Tratamento de Esgoto de Araçoiaba da Serra/SP foi coletada no dia 26 de fevereiro de 2017.

4.3 Equipamentos analíticos

Para a reativação da bactéria *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, o isolamento e a propagação dos bacteriófagos os equipamentos utilizados foram: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Primatec, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo/SP, Brasil).

A distribuição de pesos moleculares das proteínas dos bacteriófagos foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando um sistema Mini-Protean® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, USA), juntamente com uma fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-RAD, Califórnia CA, USA) e um banho seco digital também da Bio-RAD (Califórnia CA, USA).

Para o preparo da emulsão utilizou-se homogeneizador UltraTurrax (modelo T25D da IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). O potencial zeta, o tamanho hidrodinâmico

e o índice de polidispersão da emulsão foram determinados em sistema ZetaPALS (modelo NanoBrook 90PlusPALS) da Brookhaven Instruments (Holtsville, Nova York, USA).

Para a preparação dos hidrogéis foi utilizado agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasil). As imagens tomográficas do hidrogel foram captadas por meio de um tomógrafo de transmissão de raios X de 3ª geração desenvolvido por Oliveira Jr. e Martins (2009) da Bruker micro CT (modelo SkyScan 1174, Kontich, Bélgica). Para a liofilização das amostras de hidrogel empregou-se um liofilizador Thermo Fischer (modelo Moduly OD, Massachusetts, EUA). A superfície e a morfologia das amostras de hidrogel foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura de energia dispersiva (DESEM) da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo Leo 440i, Cambridge, Reino Unido) equipado com um detector Energy- Dispersive Detector (EDS) (modelo 6070, Cambridge, Reino Unido). Para o preparo da amostra de hidrogel empregou-se dispositivo de metalização (Sputter Coater EMITECH, modelo K450 Kent, Reino Unido). Estes equipamentos pertencem ao Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Os estudos de permeação foram realizados em células de vidro de difusão vertical (Dry Heat Transdermal System modelo DHC-6T, Logan Instruments Corporation, Somerset EUA).

As análises microscópicas dos bacteriófagos foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) da Jeol (modelo JEM-1400 PLUS, Jeol, Tóquio, Japão), equipado com um filamento de hexaboreto de lantânio (LaB6), operando a 120 kV e com câmera com sensor CCD (Charge- Coupled Device) da Gatan Inc. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, EUA) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a aquisição digital de imagens. Os resultados (imagens e medições) foram analisados utilizando o software Micrografia Digital da Gatan Inc. (Pleasanton CA, USA). Este equipamento pertence ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA). Os difratogramas de raios X das amostras das suspensões de bacteriófagos concentrados e dos hidrogéis foram obtidos em difratômetro de Raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão) usando radiação de raios X de uma lâmpada de cobre com radiação $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) filtrada através de um alvo cobre. Para as análises de DSC utilizou-se um calorímetro diferencial de varredura da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A). Estes equipamentos são de propriedade do Instituto de Química da Unicamp.

Para o ensaio de citotoxicidade dos hidrogéis empregou-se Leitora de Microplacas da Tecan (modelo Infinite 200 Pro, Männedorf, Suíça).

5 MÉTODO

5.1 Preparação dos meios de cultura e do tampão fágico

Os meios preparados seguiram as orientações dos fornecedores e de Pires (2017). O caldo TSB (*tryptic soy broth*) foi preparado dissolvendo-se 24 g do meio TSB em 800 mL de água ultrapura. Para a preparação do caldo TSB 2x foram adicionados 48 g de TSB em 800 mL de água ultrapura. O meio TSA (*trypticase soy agar*) foi preparado através da mistura de 24 g de TSB e 9,6 g de ágar em 800 mL de água ultrapura. A preparação do *soft agar* (0,6% (p/v) ágar) foi realizada adicionando-se 15 g de TSB e 3 g de ágar em 500 mL de água ultrapura. Por fim, preparou-se o tampão fágico onde foram adicionados 40,19 mM K_2HPO_4 ; 22,05 mM KH_2PO_4 ; 85,55 mM NaCl; 1,00 mM $MgSO_4$ e 1,00 mM $CaCl_2$ em 1000 mL de água ultrapura. Todos os meios de cultura e o tampão fágico foram autoclavados a 121 °C, 1 atm, por 20 min.

5.2 Preparação da suspensão bacteriana de *Acinetobacter baumannii*

A cepa bacteriana de *Acinetobacter baumannii* foi reativada seguindo orientações do fornecedor. Uma amostra da superfície do *slant* foi inoculada em 5 mL de caldo TSB e incubada a 37 °C por 24 horas. Da suspensão resultante, 50 µL foram retirados e inoculados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB estéril, que foi então incubado a 37 °C durante 24 horas.

A cultura bacteriana foi reativada periodicamente até o término do trabalho experimental, de forma a manter a viabilidade bacteriana e a fase exponencial de crescimento da mesma.

5.3 Isolamento de bacteriófagos para *Acinetobacter baumannii*

Para a realização do isolamento e caracterização de bacteriófagos estritamente líticos para *Acinetobacter baumannii*, amostras de água de esgoto hospitalar (Hospital Unimed “Miguel Soeiro” em Sorocaba/SP, Brasil) e da água da estação de tratamento de Araçoiaba (Águas de Araçoiaba) foram utilizadas.

A metodologia de isolamento aplicada para o isolamento dos bacteriófagos está de acordo com as determinações de Carvalho (2017).

5.4 Enriquecimento dos bacteriófagos

Antes de proceder ao isolamento dos bacteriófagos das fontes ambientais foi necessário realizar o enriquecimento para aumentar o número de partículas fágicas presentes nas amostras.

Para o enriquecimento, foi necessário acrescentar 50 mL de cada amostra de água de esgoto em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio TSB 2x estéril e 300 µL de suspensão de *A. baumannii*. Os frascos foram incubados por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas por 20 minutos a 2500 rpm, procedendo-se a filtração do sobrenadante em seringas estéreis com filtros de 0,20 µm.

5.5 Spot test

Para verificar se as amostras continham fagos líticos para *A. baumannii* foi realizado o teste de verificação da presença de bacteriófagos líticos para *Acinetobacter baumannii* através da técnica de *spot test*.

O *spot test* consiste em pingar alíquotas de 10 µL do filtrado resultante do processo de enriquecimento sobre a superfície de cultura de *A. baumannii* cultivada em TSA (CARVALHO, 2017).

5.6 Preparação da cultura de *Acinetobacter baumannii* em placa de Petri

A cultura de *A. baumannii* foi preparada seguindo a técnica de *pour-plate*. Uma mistura homogênea contendo 100 µL da suspensão bacteriana e 5 mL de *soft agar*, foram adicionados em um tubo de ensaio. A mistura foi vertida em placa de Petri e deixada em repouso por cerca de 1-2 minutos para solidificação do meio e as mesmas incubadas a 37 ° *overnight*. Esta técnica foi utilizada em diversos procedimentos descritos na sequência.

5.7 Verificação da presença de bacteriófagos

A atividade lítica das amostras foi analisada contra a estirpe de *Acinetobacter baumannii* crescida em *soft agar*. Quando há infecção pelo bacteriófago, ocorre a morte bacteriana com formação de halos de lise, confirmando a presença de bacteriófagos. A utilização de *soft agar* facilita a difusão dos bacteriófagos pelo meio.

Para verificar a presença de bacteriófagos nas amostras foi realizado um *spot test*. Quatro gotas de 10 µl do filtrado obtido no enriquecimento foram gotejadas em placa de Petri com a cultura de *Acinetobacter baumannii*. A placa foi então incubada a 37 °C *overnight*. No dia seguinte foi observada a formação, ou não de halos de lises.

5.8 Isolamento dos bacteriófagos

Foram feitas estrias por toda a placa de Petri contendo a cultura de *A. baumannii* com uma tira de papel de filtro umedecida com o filtrado obtido no enriquecimento a fim de diluir e isolar os fagos presentes na amostra. Este método é denominado *paper strip* e permite a diluição da amostra e assim, o isolamento de placas fágicas. A placa estriada foi incubada a 37 °C *overnight*. Após o período de incubação, foram obtidas placas de lises isoladas. Um palito estéril foi utilizado para perfurar uma única placa fágica e, com o mesmo palito, foram feitos furos em outra placa de Petri contendo a *Acinetobacter baumannii*. Um papel filtro foi passado sobre os furos e também por toda a placa para diluir e isolar os bacteriófagos. A placa foi incubada a 37 °C *overnight*. Assim que decorrido o tempo de incubação foi possível visualizar formação de placas líticas.

5.9 Amplificação de bacteriófagos

A partir das placas fágicas obtidas no isolamento, foram selecionadas duas, uma de cada amostra de água, para realizar a propagação fágica. Os bacteriófagos isolados foram propagados por inoculação em dupla camada de ágar. Com o auxílio de um palito estéril, picou-se a placa fágica selecionada e, com o mesmo palito, foram realizados furos em 10 placas de Petri contendo *A. baumannii*. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*. Após a incubação, foram adicionados a cada placa 5 mL de tampão fágico estéril e as mesmas foram incubadas *overnight* à 4 °C. Em tubos do tipo Falcon de 15 mL foram adicionados 10 mL do tampão contendo os fagos eluídos e clorofórmio para uma concentração final de 10% (v/v) com o objetivo de lisar

as células bacterianas e dissociar os fagos dos restos celulares. Procedeu a uma centrifugação de 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi filtrado usando um sistema de filtração esterilizante (Stericup®) com membrana polietersulfônica (PES) com poros de 0,22 µm, de forma a remover eventuais células bacterianas, *debris* celulares e meio de cultura. A solução fágica obtida foi armazenada à 4 °C até sua utilização.

5.10 Nomenclatura dos bacteriófagos

A nomenclatura adotada para nomear os bacteriófagos foi a seguinte: PhL-UNISO significa PhageLab-UNISO; AB-ATC significa *Acinetobacter baumannii* da ATCC; ph00ij significa fago isolado da fonte ij onde i = 1 é a maior placa, i = 2 é a placa de tamanho médio, i = 3 é a placa de tamanho intermediário, e i = 4 é a placa de tamanho muito pequeno, j = 1 significa esgoto hospitalar e j = 5 significa esgoto da estação de tratamento de águas residuais.

Utilizando a nomenclatura acima mencionada, os bacteriófagos estritamente líticos para *Acinetobacter baumannii* isolados foram denominados PhL_UNISO_AB-ATC_ph0041 (isolado da água de esgoto hospitalar) e PhL_UNISO_AB-ATC_ph0035 (isolado a partir da água de esgoto doméstico). Contudo, no decorrer do trabalho, os fagos foram designados como ph0041 e ph0035.

5.11 Caracterização biológica dos bacteriófagos

A eficiência e a extensão dos impactos virais dependem de características próprias de cada vírus (HOWARD-VARONA et al., 2017). Assim, visando a caracterização e diferenciação dos bacteriófagos isolados (ph0041 e ph0035) foram determinados os espectros líticos, títulos fágicos, eficiências de plaqueamento, curvas de adsorção e a determinação dos parâmetros de crescimento de bacteriófagos através do período de latência e do *burst size* (carga de liberação viral) obtidos através da curva *One-step growth*. Também foi determinado o perfil proteico dos bacteriófagos por eletroforese em gel de agarose (SDS-PAGE) e avaliada a forma dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Espectro lítico

Os espectros líticos dos bacteriófagos foram avaliados visualmente através da observação das áreas de lise, isto é, a capacidade de infecção dos bacteriófagos. Os resultados

mostram que ocorreu a formação de placas fágicas após a adição de 10 µL de cada suspensão bacteriofágica não diluída e incubação, comprovando a eficiência lítica de cada suspensão. As placas fágicas foram categorizadas como claras, moderadamente claras e turvas.

300 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a 25 mL de caldo TSB e incubados a 37 °C até a fase exponencial observando-se a densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm próxima a 0,5 na escala de McFarland ($OD_{600} \approx 0,5$). Em um tubo de ensaio foram adicionados e homogeneizados suavemente 100 µL da suspensão bacteriana juntamente com 5 mL de *soft agar*. A mistura foi então vertida em placa de Petri contendo meio TSA. Após aproximadamente 2 minutos, para secagem, pingou-se 10 µL de cada suspensão fágica sobre a *Acinetobacter baumannii*. A placa foi incubada a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, a atividade lítica foi verificada pela formação de halos de lise sobre a cultura de *Acinetobacter baumannii*.

Título fágico

Após a produção da suspensão estoque concentrada de bacteriófagos determinou-se o título fágico. Para a verificação do título fágico, a suspensão concentrada de bacteriófagos (mantida a 4 °C) foi diluída utilizando diluições de base 10. Em tubos de ensaio adicionaram-se 100 µL de suspensão bacteriana, 5 mL de *soft agar* e 100 µL de cada diluição, decorrendo uma suave homogeneização. O líquido foi vertido para placas de Petri contendo a cultura de *Acinetobacter baumannii* sobre meio TSA. As placas foram incubadas a 37 °C, *overnight*. Após incubação, as placas de Petri foram inspecionadas visualmente para verificar a presença de placas fágicas. Foram consideradas apenas as placas de Petri com 20 a 200 placas fágicas. O número de unidades formadoras de placas (UFP) foi registrado para cada diluição e o título fágico obtido empregando-se a Equação 1.

$$\text{Título fágico (UFP/mL)} = \text{número de placas fágicas} \times \frac{1}{\text{Diluição}} \times \frac{1}{V_{(\text{bacteriófagos inoculados})} \text{ (mL)}}$$

(Equação 1)

Onde: UFP significa unidade formadora de placa; e V é volume.

Eficiência de plaqueamento

Para a determinação da eficiência de plaqueamento, 300 µL da suspensão bacteriana foram adicionados à 25 mL de caldo TSB estéril, seguindo de incubação a 37 °C até a fase exponencial ($OD_{600} \approx 0,5$). Foram feitas diluições de base 10 e em uma placa de Petri, dividida em 10 partes e identificadas com as respectivas diluições, contendo meio TSA, foram vertidos 5 mL de soft agar contendo 100 µL da suspensão de *Acinetobacter baumannii*. Gotejou-se 5 µL de cada diluição sobre a cultura de *A. baumannii* na divisão correspondente. A placa foi deixada em repouso por aproximadamente uma hora para secar as gotas, sendo posteriormente incubada a 37 °C *overnight*. Após a incubação, verificou-se a formação de zonas de lise indicativas de atividade fágica.

Curva de adsorção

Para determinar o número de partículas de fagos adsorvidas dentro de um período de tempo, foi realizado o teste de adsorção. 100 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em 25 mL de caldo TSB e incubados a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, 2 mL de suspensão bactéria ($OD_{600} = 0,5$) foi infectada com a suspensão fágica ($MOI = 0,1$ aproximadamente 8×10^5 - do inglês *Multiplicity of Infection*, ou seja, razão vírus/bactéria). Homogeneizou-se e após 30 segundos retirou-se uma amostra de 100 µL. A cada 1 minuto foi retirada amostras de 100 µL até que se completassem 10 minutos para o preparo de diluições seriadas ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-8}$) em cada tempo. As diluições de 10^{-1} foram realizadas utilizando-se 850 µL de caldo TSB e 50 µL de clorofórmio e as demais em 900 µL de tampão fágico. As diluições foram vertidas em placas de Petri contendo *Acinetobacter baumannii* e incubadas a 37 °C, *overnight*. Observou-se a formação de áreas de lises que foram contadas para a construção do gráfico da curva de adsorção.

As taxas de adsorção foram estimadas ajustando os dados experimentais ao modelo da Equação 2 abaixo descrita (SANTOS et al., 2014; SHAO; WANG, 2008).

$$\ln(P_t/P_0) = -\delta(X_0/\mu(t)).(e^{\mu(t).t}-1)$$

(Equação 2)

Onde: P_t e P_0 são as concentrações de bacteriófagos nos tempos t e 0 , δ é a taxa de adsorção de bacteriófagos a ser estimada, X_0 é a concentração de células bacterianas (suscetíveis, não infectadas) no tempo 0 ; $\mu(t)$ é a taxa de multiplicação de bactérias; e t é o tempo de infecção.

Curva *One-step growth*

As curvas *One-step growth* (ou curva de crescimento de bacteriófago lítico) foram realizadas para determinar os períodos de latência e *burst size* (número esperado de vírions produzidos por uma célula infectada ao longo de sua vida útil) dos bacteriófagos isolados.

Foram inoculados 300 μ L de *A. baumannii* em um Erlenmeyer contendo 25 mL de caldo TSB e incubados a 37 °C *overnight*. Após o período de incubação, 10 mL da suspensão bacteriana ($OD_{600} = 0,5$) foram centrifugados a 2500 rpm por 20 minutos, descartando o sobrenadante. As células foram então ressuspensas em 5 mL de caldo TSB e em 5 mL de suspensão fágica ($MOI = 0,1$, aproximadamente 8×10^5 UFP/mL).

A suspensão, contendo bacteriófagos e bactérias, foi incubada a 37 °C por 5 minutos e, após o período de incubação, seguiu-se uma nova centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos. Ao precipitado foram adicionados 10 mL de caldo TSB. Amostras de 100 μ L foram retiradas em intervalos de 5 minutos até que se completassem 30 minutos. As demais amostras foram retiradas com intervalo de 10 minutos até que se completassem 90 minutos.

Diluições seriadas foram preparadas ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-6}$) para todos os tempos em 900 μ L de tampão fágico. Todas as diluições foram plaqueadas em placas de Petri com *Acinetobacter baumannii* e incubadas a 37 °C *overnight*. Os resultados foram posteriormente plotados para determinar o período latente do bacteriófago e o *burst size*.

Análise das suspensões bacteriofágicas concentradas por meio de varreduras espectrais no Ultravioleta.

As suspensões fágicas foram submetidas a varredura na faixa do Ultravioleta 200-400 nm empregando-se espectrofotômetro UV-VIS. As amostras das suspensões foram diluídas na proporção de 1:20 (suspensão: solvente) em H_2O .

Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a determinação do perfil proteico dos bacteriófagos ph0041 e ph0035 e a distribuição de pesos moleculares, foram adicionados 750 µL de solução fágica (PhL_UNISO_AB-ATC_ph0035, contendo $1,42 \times 10^{12}$ vírions ou PhL_UNISO_AB-ATC_ph0041, contendo $3,88 \times 10^7$ vírions), 475 µL de tampão de disrupção (1,51 % (m/v) Tris-Base; 25 µL (v/v) de β- mercaptoetanol em um tubo Eppendorf®. Na sequência, a solução foi aquecida a 100 °C por 10 minutos.

Foi realizada a corrida de SDS-PAGE das amostras (20 µL) e dos marcadores de peso molecular (5 µL) em gel (formado por gel com 5% acrilamida-bisacrilamida e gel de separação com 12% de acrilamida-bisacrilamida) com uma tensão de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 45 minutos aproximadamente. Após a corrida dos géis (duplicata), estes foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 por uma hora, permitindo assim, a visualização das bandas de proteína. Posteriormente os géis foram colocados em água ultrapura para remoção do excesso de corante e fotografados para análise.

Através do eletroforetograma foi possível construir uma curva de calibração, utilizando os marcadores de peso molecular (faixa M), resultando na equação linear $\text{Log}_{10}(\text{MW, kDa}) = -1,3423 \times R_f + 2,1853$ ($r^2 = 0,9190$), onde m é o marcador de massa molecular, MW é a massa molar de cada banda, R_f é a distância percorrida e R^2 é o coeficiente de determinação.

Difração de raios-X (DRX)

As suspensões bacteriofágicas foram analisadas por difratometria de raios-X (DRX). A varredura foi realizada em ângulos de difração de 2-Theta variando de 5° a 90°, com uma tensão de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA e potência de raio de 3 kW.

Para relacionar o tamanho de partículas submicrométricas, ou cristalitos, em um sólido com o alargamento de um pico em um padrão de difração utilizou-se a Equação 3 de Scherrer (SCHERRER, 1918).

$$\tau(\text{nm}) = \frac{(K \times \lambda)}{(\text{FWHM} \times \cos(\theta))}$$

(Equação 3)

Onde: t e λ têm a mesma unidade de medida (nm); FWHM é a largura total a metade do máximo do pico em rad; K é um fator de forma adimensional (0,94;) e θ é metade do ângulo de Bragg em rad.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise microscópica das suspensões virais, uma alíquota de 5 a 10 μL de cada suspensão concentrada foi diluída em água ultrapura (1:5) visando uma melhor observação das estruturas. Foram aplicados 3 μL das amostras diluídas na superfície das grades de cobre de malha 300 *mesh* (Ultrathin Formvar/Carbon, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, E.U.A.). As amostras foram secas em temperatura ambiente utilizando papel de filtro. A seguir cada tela foi então flutuada, separadamente, com uma gota de acetato de uranila a 2% (m/m), com pH igual a 7,0. Após 30 segundos, a solução em excesso de acetato de uranila foi removida usando papel de filtro. As telas foram então submetidas a visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

Espectro lítico do coquetel de fagos

Preparou-se um coquetel de bacteriófagos através da mistura de 100 μL de cada suspensão fágica para avaliar o espectro lítico dos bacteriófagos sobre a *A. baumannii*.

Em uma placa de Petri dividida em cinco partes, contendo a *Acinetobacter baumannii*, foram adicionados discos de antibiótico (POL 300 = antibiótico polimixina B; CPM30 = antibiótico cecefima; IPM10 = antibiótico imipenem e MPM10= antibiótico meropenem) e 5 μL do coquetel de bacteriófagos. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e verificou-se se houve lise bacteriana.

O halo de lise bacteriana do coquetel fágico foi comparado as lises bacterianas obtidas pela ação dos antibióticos.

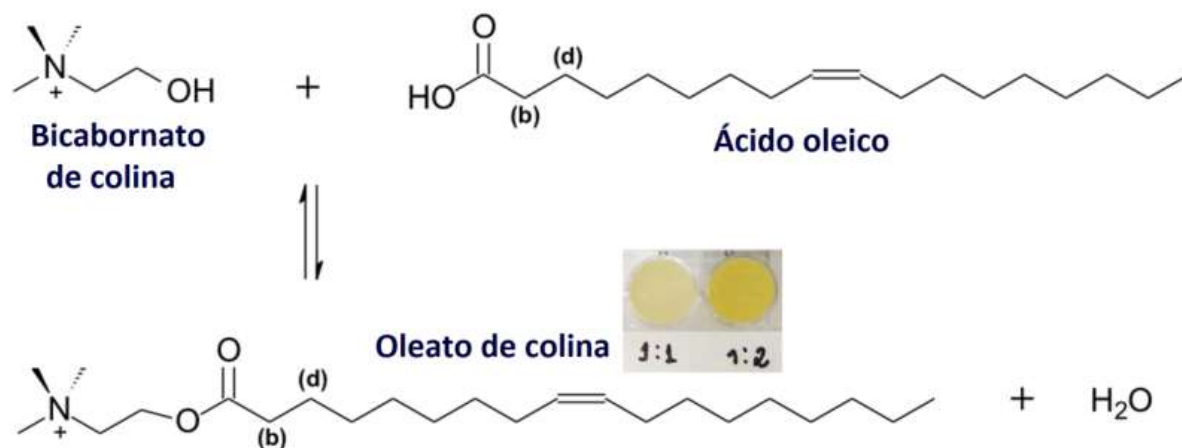
5.12 Síntese e caracterização do líquido iônico oleato de colina (1:1) e o solvente eutético profundo de oleato colina (1:2)

O oleato de colina e seu respectivo solvente eutético profundo foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Zakrewsky et al. (2014). Inicialmente, foi preparado o líquido iônico na proporção de 1:1, consistindo apenas por pares de cátion (colina) e ânion

(oleato). Em seguida, o solvente eutético profundo foi preparado na proporção de 1:2 para aumentar a fluidez do líquido iônico, variando as proporções de ácido oleico.

A metodologia utilizada para a síntese do oleato de colina e seu respectivo solvente eutético profundo foi a neutralização ácido-base ilustrada na Figura 3.

Figura 3. Reação de neutralização ácido-base para a formação de oleato de colina



Fonte: Elaboração própria

Preparação do líquido iônico oleato de colina (1:1)

Uma proporção de 1:1, ou seja, uma parte de bicarbonato de colina para uma parte de ácido oleico foi utilizada para formar um líquido iônico (LI) constituído apenas por pares de cátions e ânions. O LI foi preparado por neutralização com bicarbonato de colina. Em um balão de fundo redondo de 1000 mL, foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (m/m) (equivalentes a 18,72 g, ou 0,1133 mol de bicarbonato de colina puro). Na mesma proporção molar, foram adicionados aproximadamente 35,95 mL de ácido oleico, com excesso de 4,05 mL, resultando em um volume total de 40 mL de ácido oleico (equivalentes a 35,6 g, ou 0,1260 mol de ácido oleico puro). Uma alíquota de 20 mL de metanol foi adicionada à mistura para melhorar a homogeneização à temperatura ambiente, em sistema aberto. Utilizou-se agitador magnético para mistura e homogeneização da solução até cessar a produção de CO₂. A reação ficou em agitação por 12 horas. O solvente foi removido em evaporador rotativo a 60 °C por cerca de 20 minutos. O produto obtido foi acondicionado em recipiente adequado, vedado com Parafilm® e armazenamento em temperatura ambiente.

Preparação do líquido iônico oleato de colina (1:2) (DES - solvente eutético profundo)

Uma proporção de 1:2, ou seja, uma parte de bicarbonato de colina para duas partes de ácido oleico foi utilizada para formar um solvente eutético (DES), constituído apenas por pares de cátions e ânions. O DES foi preparado por neutralização de bicarbonato de colina. Em um balão de fundo redondo de 1000 mL, foram adicionados 8,75 mL de bicarbonato de colina 80% (m/m) (equivalentes a 8,19 g, ou 0,0496 mol de bicarbonato de colina puro). Foram adicionados ao sistema aproximadamente 31,42 mL de ácido oleico, com excesso de 0,08 mL, resultando em um volume total de 31,5 mL de ácido oleico (equivalentes a 28,03 g, ou 0,099 mol de ácido oleico puro). Uma alíquota de 20 mL de metanol foi adicionada à mistura para melhorar a agitação à temperatura ambiente, em sistema aberto. Utilizou-se agitador magnético para agitar e homogeneizar a solução até cessar a produção de CO₂. A reação ficou em agitação por 12 horas. O solvente foi removido em evaporador rotativo a 60 °C por cerca de 20 minutos. O produto obtido foi acondicionado em recipiente adequado, vedado com Parafilm® e armazenado em temperatura ambiente.

5.13 Atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão

A atividade antimicrobiana dos líquidos iônicos e de seus reagentes foi analisada por método de disco-difusão (CSLI, 2003) em culturas de *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *E. coli* (CCCD-E003) e *Staphylococcus aureus* (CCCD-S007) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

As placas de Petri, contendo as cepas mencionadas acima, foram divididas em seis partes. Essas partes foram numeradas de 1 a 6, onde 1 corresponde ao bicarbonato de colina; 2 corresponde ao oleato de colina (1:1); 3 corresponde ao oleato de colina (1:2); 4 corresponde ao ácido oleico; 5 corresponde ao controle positivo (solução de coquetel antibiótico (penicilina 10000 UI/mL/estreptomicina 10 mg/mL) e 6 corresponde ao controle negativo (solução salina 0,9 %). Discos de papel de filtro foram impregnados com as amostras e colocados sobre as cepas.

Por se tratar de amostras viscosas, foi necessário utilizar a massa e a densidade das mesmas para se obter o volume utilizado. Para isso discos de papel de filtro foram pesados e introduzidos no tubo contendo as amostras. Após 10 segundos foi realizada uma nova pesagem para verificar a massa da amostra. As amostras obtidas foram: $m_{\text{ácido oleico}} = 0,0104 \text{ g}$; $m_{\text{bicarbonato de colina}} = 0,0230 \text{ g}$; $m_{\text{oleato de colina (1:1)}} = 0,0255 \text{ g}$; $m_{\text{oleato de colina (1:2)}} = 0,0192 \text{ g}$. As densidades,

retiradas da literatura, foram as seguintes: $\rho_{\text{ácido oleico}} = 0,893 \text{ g/mL}$; $\rho_{\text{bicarbonato de colina}} = 1,17 \text{ g/mL}$; $\rho_{\text{oleato de colina (1:1)}} = 0,94 \text{ g/mL}$; $\rho_{\text{oleato de colina (1:2)}} = 0,92 \text{ g/mL}$. O volume administrado foi calculado utilizando a Equação 4.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Equação (4)

Onde: ρ corresponde a densidade absoluta em g/mL; m é a massa; V o volume.

Os volumes obtidos foram: $V_{\text{ácido oleico}} = 0,0116 \text{ mL}$; $V_{\text{bicarbonato de colina}} = 0,0196 \text{ mL}$; $V_{\text{oleato de colina (1:1)}} = 0,0271 \text{ mL}$; $V_{\text{oleato de colina (1:2)}} = 0,0209 \text{ mL}$.

A atividade antimicrobiana dos líquidos iônicos foi avaliada na cepa de *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), utilizando o mesmo procedimento acima citado, obtendo-se um volume igual a 0,016 mL para o oleato de colina (1:1) e igual a 0,015 mL para o oleato de colina (1:2).

Esta técnica também foi utilizada para a avaliação da manutenção da atividade lítica do hidrogel contendo os bacteriófagos. Os ensaios foram realizados utilizando uma estirpe de *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606). O hidrogel foi aplicado diretamente na superfície do meio de cultura TSA com *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606). Após 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C as placas foram inspecionadas visualmente para observação de halos de inibição do crescimento.

5.14 Preparação do hidrogel a base de alginato de sódio integrando uma microemulsão de líquido iônico (1:2) e um coquetel de bacteriófagos líticos

Preparação e caracterização da microemulsão líquida iônica

Para incorporar o líquido iônico ao hidrogel, uma emulsão com o líquido iônico foi preparada de acordo com Pires e Moura (2017). A emulsão foi preparada agitando 0,75% (m/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de oleato de colina (1:1 ou 1:2) em 250 ml de água ultrapura. A solução foi misturada num homogeneizador UltraTurrax a 12000 rpm durante 5 minutos. O potencial zeta, o tamanho hidrodinâmico e o índice de polidispersão da emulsão foram determinados em um sistema ZetaPALS para escolher a emulsão mais estável. Na emulsão escolhida adicionou-se metilparabeno a 0,1% (m/v).

Análise por espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS)

Para as análises por DLS das emulsões produzidas prepararam-se diluições de amostras seguindo recomendações do fabricante do equipamento, sendo empregados 50 µL de emulsão em 20 mL de água ultrapura. Esta diluição foi homogeneizada e introduzida na cubeta (cerca de 2/3 do volume da mesma) do equipamento ZetaPALS NanoBrook 90 PlusPALS.

Preparação dos hidrogéis

Para preparar o hidrogel à base de alginato de sódio, utilizou-se 1,5% (m/v) de alginato de sódio com baixa viscosidade (300-400 cps), 0,2% (m/v) de carbonato de cálcio e 0,86% (m/v) de gluconolactona. As substâncias foram dissolvidas, separadamente, na microemulsão preparada, com a ajuda de agitação magnética a 200 rpm durante 5 minutos. Após este período, as dispersões foram reunidas e misturadas por agitação magnética a 200 rpm durante 5 minutos. Antes de formar o gel, adicionou-se a suspensão bacteriofágica (100 µL de cada suspensão de fago lítico para *Acinetobacter baumannii*). A dispersão foi vertida em moldes de plástico. Após 5 horas, ocorreu a gelificação com formação do hidrogel integrando o líquido iônico e o coquetel de bacteriófagos.

Hidrogéis sem o LI foram preparados da mesma maneira, contudo, no lugar da microemulsão foram utilizados 5 mL água ultrapura.

5.15 Caracterização do hidrogel

Análise por difração de raios-X (DRX) do hidrogel

Os difratogramas das amostras de hidrogel foram obtidos em um difratômetro de raios-X, usando radiação de raios-X com uma lâmpada de cobre com radiação $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). A varredura foi realizada em ângulos de difração de 2-Theta (de 5° a 90°, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2° min^{-1}), com uma tensão de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA e potência de raios-X de 3 kW.

Análise por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho tanto do oleato de colina como das amostras de hidrogel foram obtidos na região de número de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 30 mL min^{-1} , razão ou velocidade de aquecimento de 10 °C min^{-1} , faixa de aquecimento de 25 °C a 250 °C . Empregou-se cadinho de alumínio e massa de amostra em torno de 2 mg .

Análise tomográfica por transmissão de raios-X (XRT)

As imagens da análise tomográfica por transmissão de raios-X foram coletadas usando tomógrafo com tensão de operação ajustada a 35 kV e corrente elétrica com $800\text{ }\mu\text{A}$.

Análise de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva (DESEM).

Para a análise de microscopia eletrônica as amostras foram liofilizadas e posteriormente revestidas com uma fina camada de ouro (200 Å de espessura) por pulverização catódica sobre uma camada de carbono produzida por evaporação em um dispositivo de metalização. Depois, as amostras assim preparadas foram submetidas ao microscópio eletrônico de varredura para observação de suas morfologias.

5.16 Estudos de permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação foram realizados em células de vidro de difusão vertical com um volume receptor de aproximadamente 8 mL e uma área de difusão de $176,715\text{ mm}^2$ para avaliação da capacidade de permeação do coquetel de bacteriófagos líticos. Como membrana de permeação escolheu-se a pele de orelha de porco.

As amostras da pele da orelha de porco foram separadas da cartilagem, tomando cuidado para não serem danificadas e foram armazenadas no congelador a -4 °C até serem utilizadas (SALERNO; CARLUCCI; BREGNI, 2010). No momento do uso, as amostras de pele da

orelha de porco foram descongeladas e cortadas no tamanho requerido para serem colocadas na célula de Franz (0,5 mm de espessura x 30 mm de comprimento). No compartimento doador, em cima da membrana da pele de porco, foram colocados os discos de amostras de hidrogel. Depois disso, este compartimento foi fechado. No compartimento receptor foi adicionada solução salina (0,9% NaCl, m/m). O compartimento foi imerso em banho termostático a 32 ± 3 °C e as células foram equilibradas por 30 minutos. O experimento foi seguido por 12 horas com coleta de amostras a 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 420, 540, 660 e 720 minutos. Em 200 µL das alíquotas coletadas foram adicionados um volume igual de suspensão de bactérias mais 5 mL de *soft agar*. Esta mistura foi vertida em placas de Petri contendo meio TSA sólido. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de placa (UFP's, halos de inibição de crescimento) foi determinado com auxílio de um contador de colônias (Phoenix Luferco modelo CP 608, Araraquara, Brasil).

5.17 Potencial de citotoxicidade do hidrogel pelo método de difusão em ágar

As células HaCat foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ empregando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino a 10% (m/m), por um período de 48 horas a 37 °C, em uma câmara de incubação com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio líquido foi descartado e meio sólido *overlay* (meio Eagle 2x concentrado, ágar a 1,8% (m/m) contendo 0,01% (m/m) de vermelho neutro como corante vital) foi adicionado sobre a cultura de células bacterianas. Após solidificação, as amostras foram colocadas no centro da placa e incubadas por 24 horas a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂. As leituras das placas foram feitas macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade era observada pela formação de um halo claro em torno da amostra, correspondendo às células mortas. As células mortas circundando a amostra foram avaliadas microscopicamente para detecção de alterações morfológicas.

5.18 Potencial de citotoxicidade pelo ensaio MTS

Cultivo das células fibroblastos 3T3

As células fibroblastos (NIH-3T3) foram cultivadas em frascos de 25 cm³ utilizando meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose*, Sigma) suplementado 10%

(m/m) de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Pen/Strep - Sigma) a 37 °C em uma câmara de incubação com 5% de CO₂. Até atingir a confluência de 90%. Após o período de crescimento as células foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer, utilizando azul de Trypan, para aplicação nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular (GRANJA et al., 2019)

Ensaio de citotoxicidade do hidrogel pelo ensaio de MTS

Para a avaliação da citotoxicidade do material foram utilizadas placas de 24 poços, na concentração de 1×10^4 células mL⁻¹ por poço utilizando meio DMEM suplementado 10% (m/m) de soro fetal bovino e 1% de antibiótico a 37 °C em uma câmara de incubação com 5% de CO₂. Após 24 horas o meio foi descartado e um novo meio foi adicionado. Seguidamente discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, das amostras de hidrogel sem líquido iônico e hidrogel com líquido iônico foram adicionadas no centro do poço. Como controle negativo (controle de viabilidade celular) foi utilizado o meio DMEM enriquecido e para controle positivo (controle de morte celular) foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram incubadas nas mesmas condições citadas. O teste foi realizado em triplicata. A viabilidade celular foi analisada após 24, 48 e 72 horas por calorimetria, utilizando tetrazólio, o MTS, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazólio] (CARDOSO, 2019). Após cada período de tempo os poços foram preenchidos com 375 µL do meio de cultura celular - DMEN e 75 µL do MTS foram adicionados, e as placas foram incubadas por mais 1 hora a 37 °C. O MTS, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto denominado formazan. Em seguida, a quantidade de formazan formada foi avaliada por espectrofotometria no equipamento Leitora de Microplacas Tecan Infinite 200 Pro, no comprimento de onda de 490 nm, sendo a absorbância registrada o valor diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

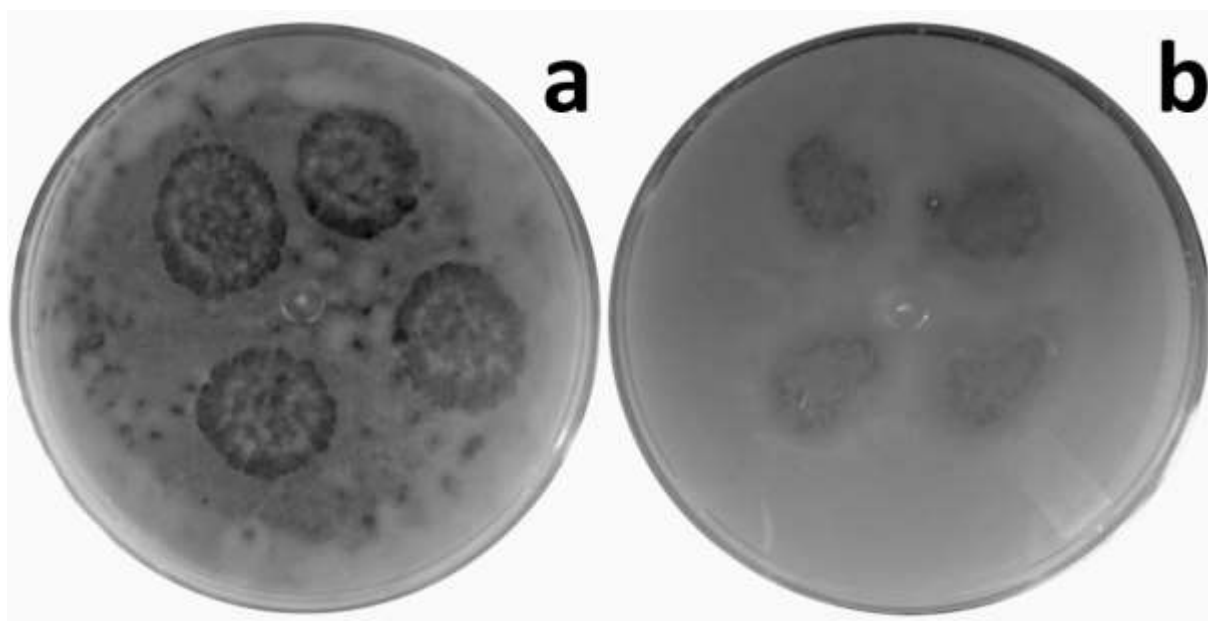
6.1 Isolamento, propagação, purificação e caracterização dos bacteriófagos para *Acinetobacter baumannii*

Antes do isolamento, é necessário realizar o enriquecimento. A etapa de enriquecimento tem como objetivo aumentar a concentração de fagos que possam estar presentes nas amostras coletas. A densidade e diversidade das populações das células hospedeiras é o principal fator que determina a abundância e diversidade de fagos. A prevalência de grandes e diferentes populações de bactérias patogênicas em águas residuárias faz das mesmas uma fonte importante para o isolamento de vários bacteriófagos (MARTINS; MARTINS, 2014).

Após o enriquecimento das amostras de água (água de esgoto hospitalar e da estação de tratamento de água) foi realizado o *spot test* para verificar se as amostras continham bacteriófagos líticos. As zonas de lise bacteriana formadas no *spot test* indicaram a presença de bacteriófagos como pode ser observado na Figura 4. Na Figura 4a, podem-se observar as zonas de lise claras na cultura de *Acinetobacter baumannii*, formadas pela gota da amostra obtida no enriquecimento com água de esgoto coletada do Hospital Unimed. Na Figura 4b é possível observar zonas de lise turvas na cultura de *Acinetobacter baumannii* formadas pela gota da amostra enriquecida com água de esgoto coletada da estação de tratamento de águas da estação Águas de Araçoiaba.

O *spot test* indicou que ambas as amostras utilizadas continham bacteriófagos líticos para a cepa de *Acinetobacter baumannii* utilizadas neste estudo. Bacteriófagos isolados produzem zonas claras indicativas de lise bacteriana das respectivas células hospedeiras, típicos de fagos líticos (MARTINS, MARTINS, 2014).

Figura 4. *Spot test* das amostras enriquecidas da (a) água de esgoto hospitalar (Unimed-Sorocaba/SP) e do (b) esgoto (Araçoiaba/SP) da estação de tratamento de águas residuais para detecção de bacteriófagos líticos contra *Acinetobacter baumannii*, mostrando regiões claras de lise bacteriana



Fonte: Elaboração própria

A morfologia das placas depende do fago, do hospedeiro e das condições de crescimento. No entanto, com raras exceções as placas fágicas, após um período de incubação, assumem tamanhos diferentes e adquirem um limite definitivo, podendo assim, ser um indicativo para verificar a presença de diferentes fagos (GALLET; KANNOLY; WANG, 2011). Contudo, como podem ser observadas na Figura 5, as estrias feitas com as amostras enriquecidas produziram placas de morfologias e tamanhos similares, sendo necessário, portanto, outras análises para comprovar se os fagos isolados eram, ou não diferentes.

Além da visualização das características das zonas de lise, a classificação e caracterização dos fagos podem ser realizadas através da microscopia eletrônica ou ainda através da determinação da sua sequência gênica e da sua estrutura proteica (SOUSA, 2012).

Os fagos produzidos a partir das placas de lise foram denominados oficialmente de PhL_UNISO_AB-ATC_ph0041 e PhL_UNISO_AB-ATC_ph0035. Na decorrência deste trabalho, os fagos foram retratados como ph0041e ph0035.

Figura 5. Isolamento de bacteriófagos e seleção de placas fágicas com base em morfologias distintas



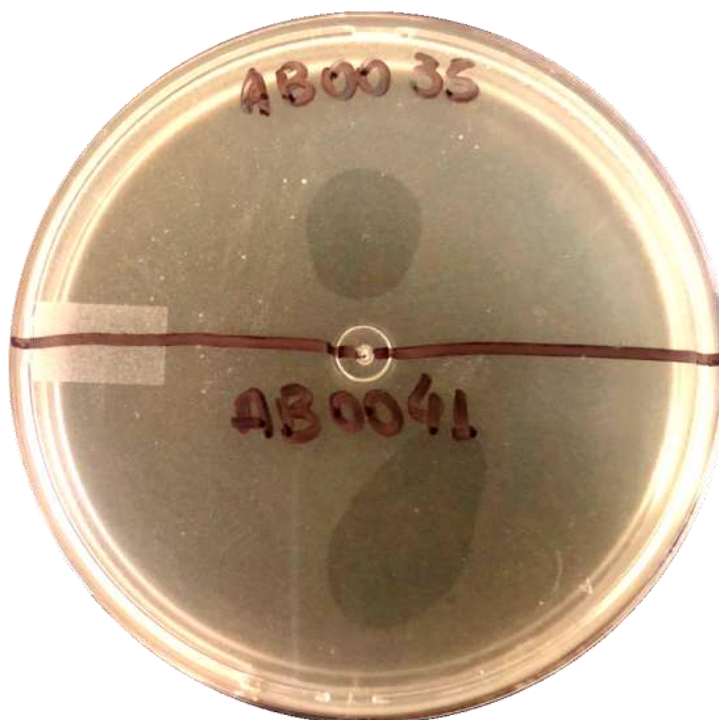
Fonte: Elaboração própria

6.2 Caracterização biológica dos bacteriófagos ph0041 e ph0035

Espectros líticos

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos após a avaliação dos espectros líticos das partículas dos bacteriófagos isolados.

Figura 6. Espectro lítico dos fagos ph0041 e ph0035



Fonte: Elaboração própria

A determinação do espectro lítico de um fago é importante para verificar sua eficiência frente a bactéria hospedeira. A capacidade lítica de um fago indica a possibilidade de sua aplicação terapêutica frente ao patógeno hospedeiro (AZEREDO, 2013). Como pode ser visto na Figura 6, os bacteriófagos ph0041 e ph0035 produziram placas claras, revelando especificidade dos bacteriófagos para a cepa de *Acinetobacter baumannii*, sendo que o bacteriófago ph0041 produziu uma placa de lise cerca de 43% maior que a produzida pelo bacteriófago ph0035. Deste modo, pode-se afirmar que os dois fagos isolados apresentam atividade lítica frente a *Acinetobacter baumannii*.

Título fágico

O título fágico de cada suspensão obtida foi calculado utilizando a Equação 1. Para a suspensão do bacteriófago ph0041 o título fágico obtido foi $7,750 \times 10^7$ UFP mL⁻¹, enquanto que a suspensão do bacteriófago ph0035 apresentou um título igual a $2,838 \times 10^{12}$ UFPmL⁻¹. Títulos fágicos acima de 10^{-11} UFP mL⁻¹ são considerados elevados (BONILLA et al., 2016).

O título fágico tem como objetivo verificar a concentração dos fagos na suspensão obtida. A concentração de fagos, avaliada através do título fágico, é um dos fatores de influência

no combate às infecções. A alta concentração de fagos é crucial para o sucesso dos tratamentos (QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018).

Foram calculados os títulos das suspensões em diferentes concentrações. Os resultados obtidos estão disponibilizados na tabela abaixo (Tabela 2) e comprovaram que o processo permitiu a obtenção de suspensões com concentrações de fagos adequadas para uso em tratamento de infecções.

Tabela 1. Número de unidades formadoras de placas (UFP's) em diferentes concentrações das suspensões dos fagos ph0035 e ph0041

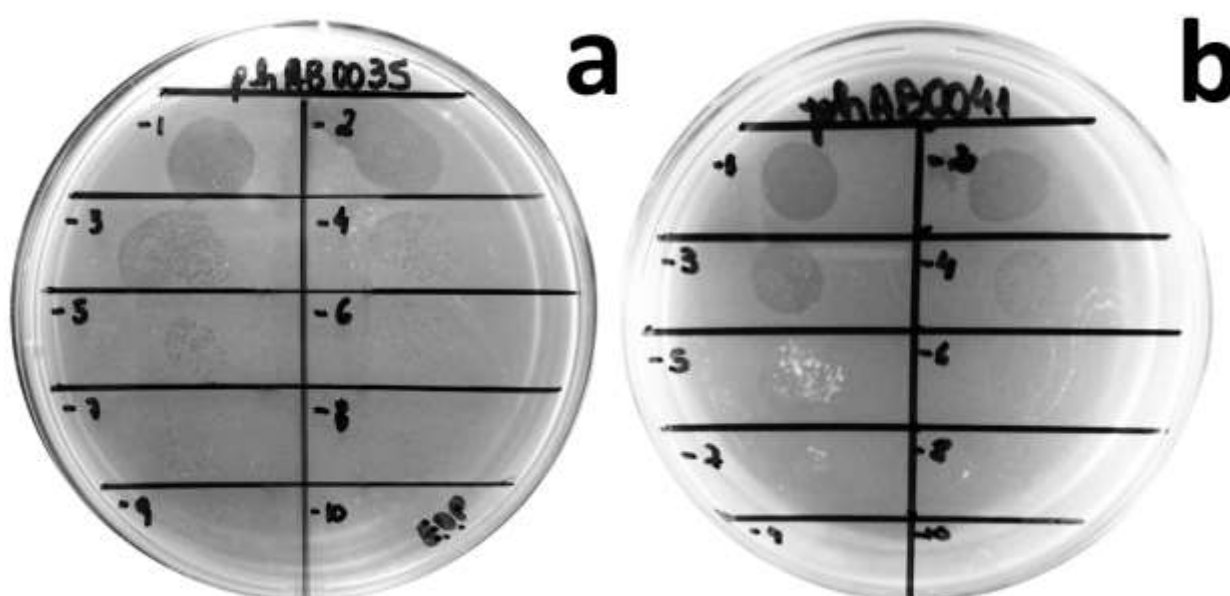
Volume da amostra de suspensão de fago concentrada (µL)	Volume final de diluição	Fago	Número de PFU's na amostra de suspensão de fagos concentrada	Concentração de partículas fágicas (UFPs/mL)
10	2000	ph0035	$2,8384 \times 10^{11}$	$1,41920 \times 10^{10}$
		ph0041	$7,7500 \times 10^{05}$	$3,87500 \times 10^{05}$
25	2000	ph0035	$5,6768 \times 10^{10}$	$2,83840 \times 10^{10}$
		ph0041	$1,5500 \times 10^{06}$	$7,75000 \times 10^{05}$
50	2000	ph0035	$1,4192 \times 10^{11}$	$7,09600 \times 10^{10}$
		ph0041	$3,8750 \times 10^{06}$	$1,93750 \times 10^{06}$
100	2000	ph0035	$2,8384 \times 10^{11}$	141920×10^{11}
		ph0041	$7,7500 \times 10^{12}$	$3,87500 \times 10^{06}$
150	2000	ph0035	$4,2576 \times 10^{11}$	$2,12880 \times 10^{11}$
		ph0041	$1,625 \times 10^{07}$	$5,81250 \times 10^{06}$
200	2000	ph0035	$5,6768 \times 10^{11}$	$2,83840 \times 10^{11}$
		ph0041	$1,5500 \times 10^{07}$	$7,75000 \times 10^{06}$

Fonte: Elaboração própria

Eficiência de plaqueamento (EOP)

Os resultados obtidos na eficiência de plaqueamento (EOP) com os bacteriófagos ph0035 e ph0041 são exibidos na Figura 7.

Figura 7. Eficiência de plaqueamento das partículas fágicas (a) ph0041 e (b) ph0035



Fonte: Elaboração própria

A eficiência de plaqueamento é o número relativo de placas que a suspensão bacteriofágica é capaz de produzir em um determinado hospedeiro bacteriano, tornando-se um parâmetro de importância na avaliação do potencial do fago como agente terapêutico. A determinação da EOP permite avaliar a capacidade dos fagos em infectar e lisar a células bacteriana (MIRZAEI; NILSSON, 2015).

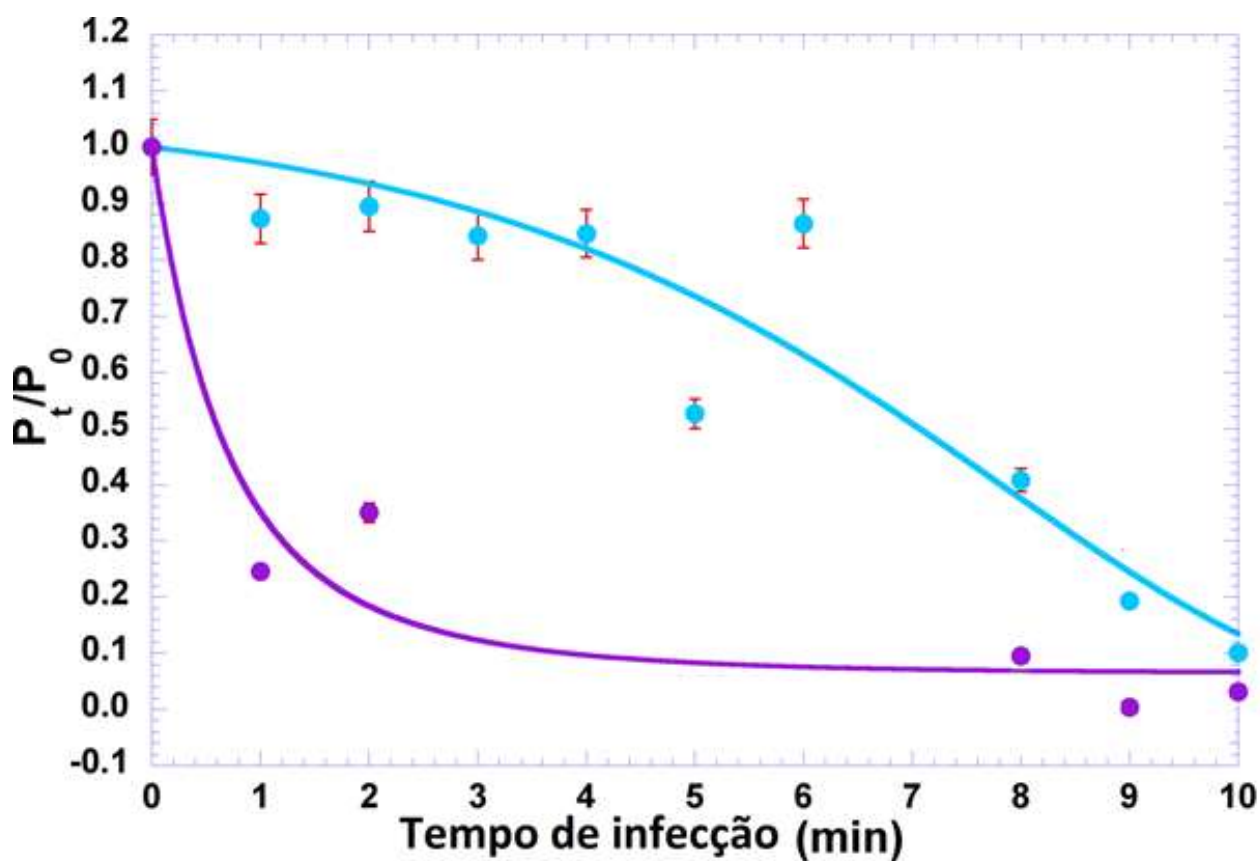
Analisando a Figura 7 é possível observar lises claras nas primeiras três diluições do bacteriófago ph0041 (Figura 6a) e do bacteriófago ph0035 (Figura 6b). A intensidade da claridade das lises foi reduzindo nas diluições seguintes para ambos os fagos. Não foi possível observar placas fágicas nas diluições maiores (acima de 10^{-6}) tanto do bacteriófago ph0041 quanto do bacteriófago ph0035. Conclui-se portanto, que os fagos ph0041 e ph0035 não foram capazes de produzir bacteriófagos progênicos suficientes na cepa de *Acinetobacter baumannii* para formar placas nas maiores diluições.

Foi possível verificar também que as placas de lise produzidas, em meios sólidos, pelos bacteriófagos isolados foram extremamente pequenas com um tamanho de até 0,7 mm de diâmetro.

Curva de adsorção

Os resultados obtidos nos ensaios de adsorção dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 em células de *Acinetobacter baumannii* são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Curvas de adsorção dos bacteriófagos ph0041 (curva roxa) e ph0035 (curva azul)



Fonte: Elaboração própria

A adsorção é a capacidade de ligação de uma molécula presente na superfície do vírus com receptores específicos da membrana celular do hospedeiro, sendo essencial para a infecção do vírus na célula hospedeira (STEPHENS et al., 2013).

As taxas de adsorção dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 nas células de *Acinetobacter baumannii* foram estimadas por ajuste não linear dos dados experimentais para o modelo descrito na Equação 2.

O ajuste não linear dos dados exibidos na Figura 8 para o modelo na Equação 2 foi realizado usando o software Kaleida Graph v. 4.5.2 para MacOS X.

As taxas de adsorção dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 nas células de *Acinetobacter baumannii* foram as seguintes: taxa de adsorção das partículas do bacteriófago ph0035 ($X_0 = 5,578 \times 10^7$ UFC mL⁻¹; (ajuste não linear = 0,93545)) igual a $4,6518 \times 10^{-10}$ UFP⁻¹ UFC⁻¹ mL⁻¹ h⁻¹ e a taxa de replicação bacteriana foi igual a 0,34173 h⁻¹ e para o bacteriófago ph0041 ($X_0 = 5,043 \times 10^7$ UFC mL⁻¹; (ajuste não linear = 0,96748)) a taxa de adsorção das partículas foi igual a $2,6394 \times 10^{-8}$ UFP⁻¹ UFC⁻¹ mL⁻¹ h⁻¹ e a taxa de replicação bacteriana foi igual a 0,4816 h⁻¹.

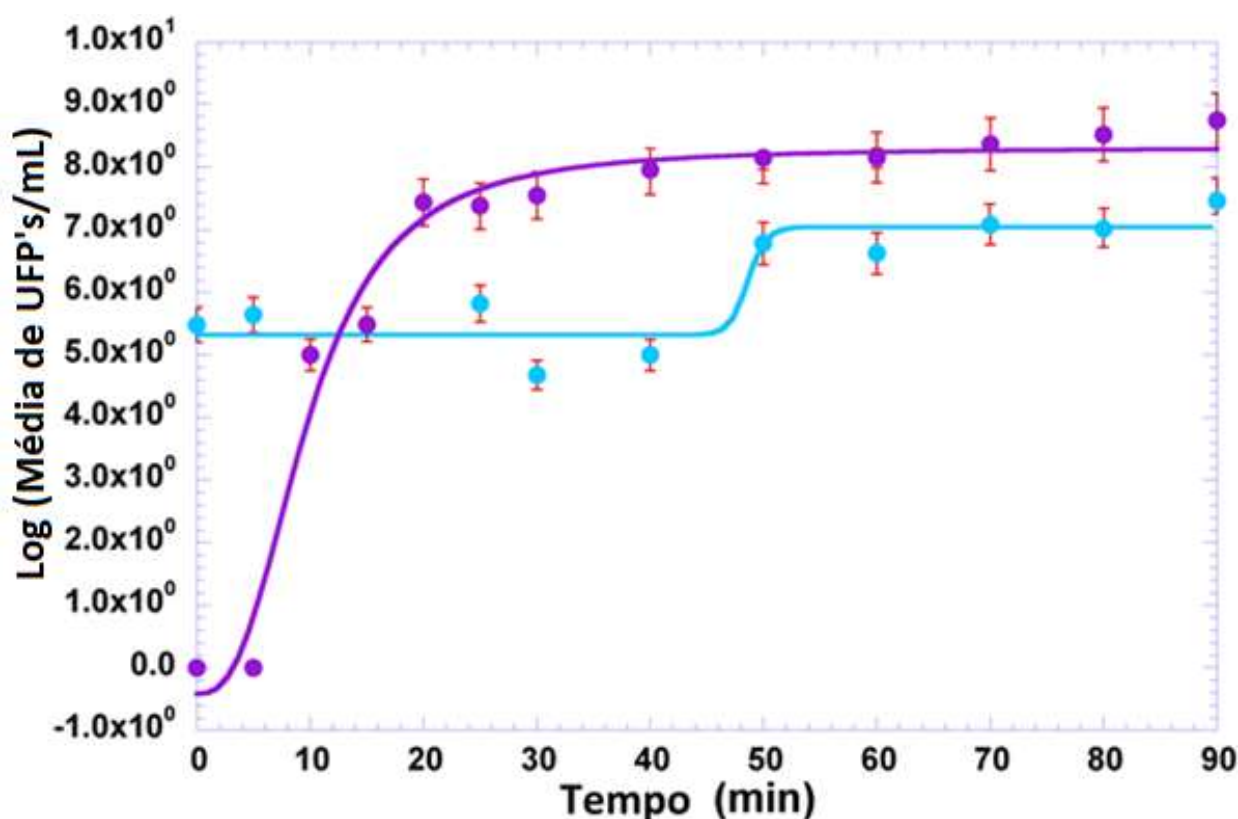
O estabelecimento de um perfil de adsorção mostrou que após 5 minutos mais de 90% das partículas do fago ph0041 e 30% das partículas do fago ph0035 foram adsorvidas às células do hospedeiro (*Acinetobacter baumannii*).

É fundamental avaliar a capacidade de adsorção dos fagos isolados, pois esta pode ser utilizada como um indicativo da capacidade de infecção dos bacteriófagos na célula hospedeira com consequente morte celular (SHAO; WANG, 2008). Os resultados mostraram que os vírus são capazes de se ligar às células hospedeiras de modo adequado para o sucesso de sua replicação viral.

Curva *One-step growth*

As curvas *One-step growth* dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 são mostrados na Figura 9, usando *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) na fase exponencial ($OD_{600nm} = 0,5; \approx 603 \times 10^7$ UFCmL⁻¹) e as suspensões fágicas de ambos os fagos com um título de 8×10^5 PFUmL⁻¹.

Figura 9. Curvas *One step growth* dos bacteriófagos ph0041 (curva roxa) e ph0035 (Curva azul)



Fonte: Elaboração própria

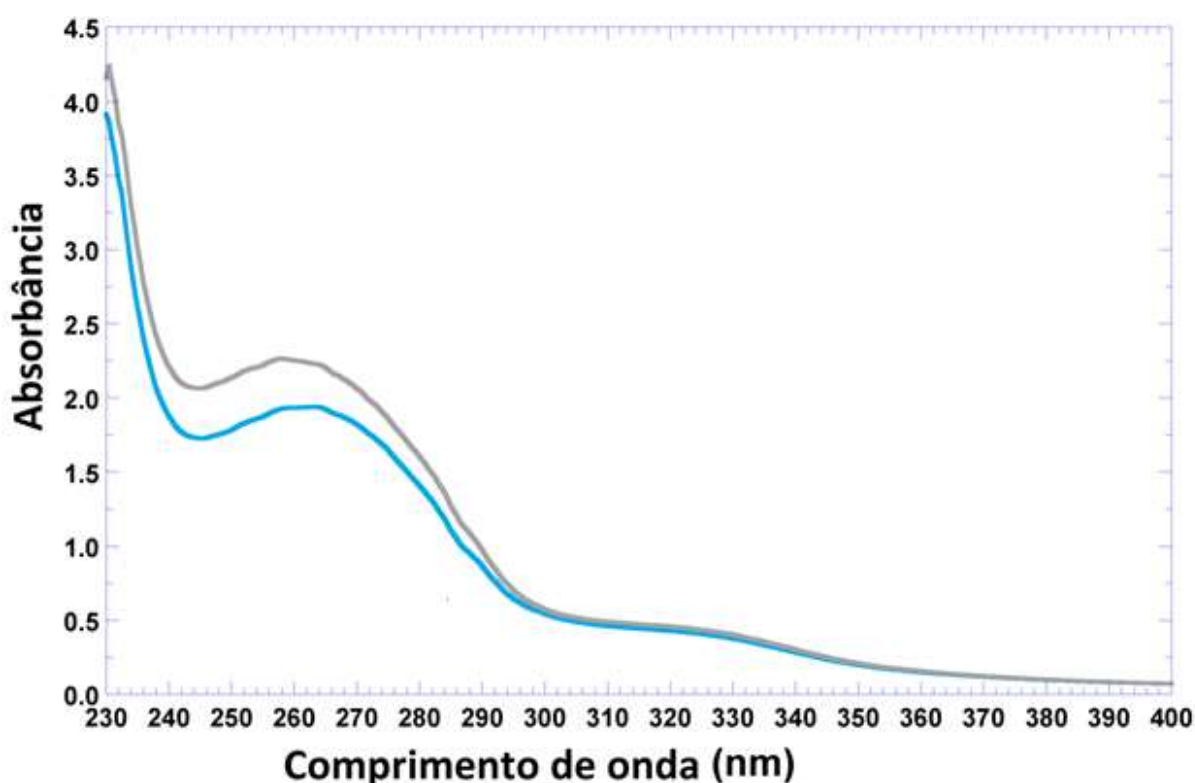
Os resultados obtidos foram posteriormente plotados para determinar o período do eclipse do bacteriófago, período latente, período de acumulação intracelular e o número de vírions por célula infectada. Na curva *One step growth*, o período do eclipse representa o tempo após a penetração do bacteriófago na bactéria hospedeira onde ocorre a biossíntese e montagem dos vírions maduros; o período latente representa o tempo após a penetração do bacteriófago até a lise da célula bacteriana com liberação de vírions maduros; o número de vírions por célula infectada é o rendimento viral. A diferença entre o período latente e o período do eclipse representa a fase de acumulação intracelular (STEPHENS et al., 2013).

Para o bacteriófago ph0035 foram estimados 45 minutos para o período do eclipse, 50 minutos para o período latente, 5 minutos para o período de acumulação intracelular e $1,4 \times 10^0$ vírions por célula infectada, enquanto que para o bacteriófago ph0041 foram obtidos 5 minutos para o período do eclipse, 30 minutos para o período latente, 25 minutos para o período de acumulação intracelular e $8,2 \times 10^0$ vírions por célula infectada. A ação rápida destes bacteriófagos pode ser uma vantagem quando utilizados como agentes terapêuticos.

Análise das suspensões bacteriofágicas concentradas por meio de varreduras espectrais UV-Vis

Os resultados obtidos a partir das varreduras espectrais UV-Vis realizadas para as suspensões fágicas são exibidos na Figura 10. As suspensões dos dois fagos apresentaram uma absorção mínima que pode ser observada em torno de 245 nm e uma absorção máxima em 258 nm para as suspensões do bacteriófago ph0041 e 263 nm para a suspensão do bacteriófago ph0035. Suspensões que não apresentam estas características, provavelmente são suspensões que possuem muitos contaminantes celulares (restos celulares e quaisquer outras proteínas intracitoplasmáticas liberadas após a lise celular). Isto ocorre geralmente quando a suspensão contém poucas partículas fágicas. Logo, pode-se concluir que as suspensões fágicas produzidas apresentaram poucos contaminantes.

Figura 10. Espectrofotometria UV-VIS dos bacteriófagos ph0041 (curva cinza) e ph0035 (curva azul)

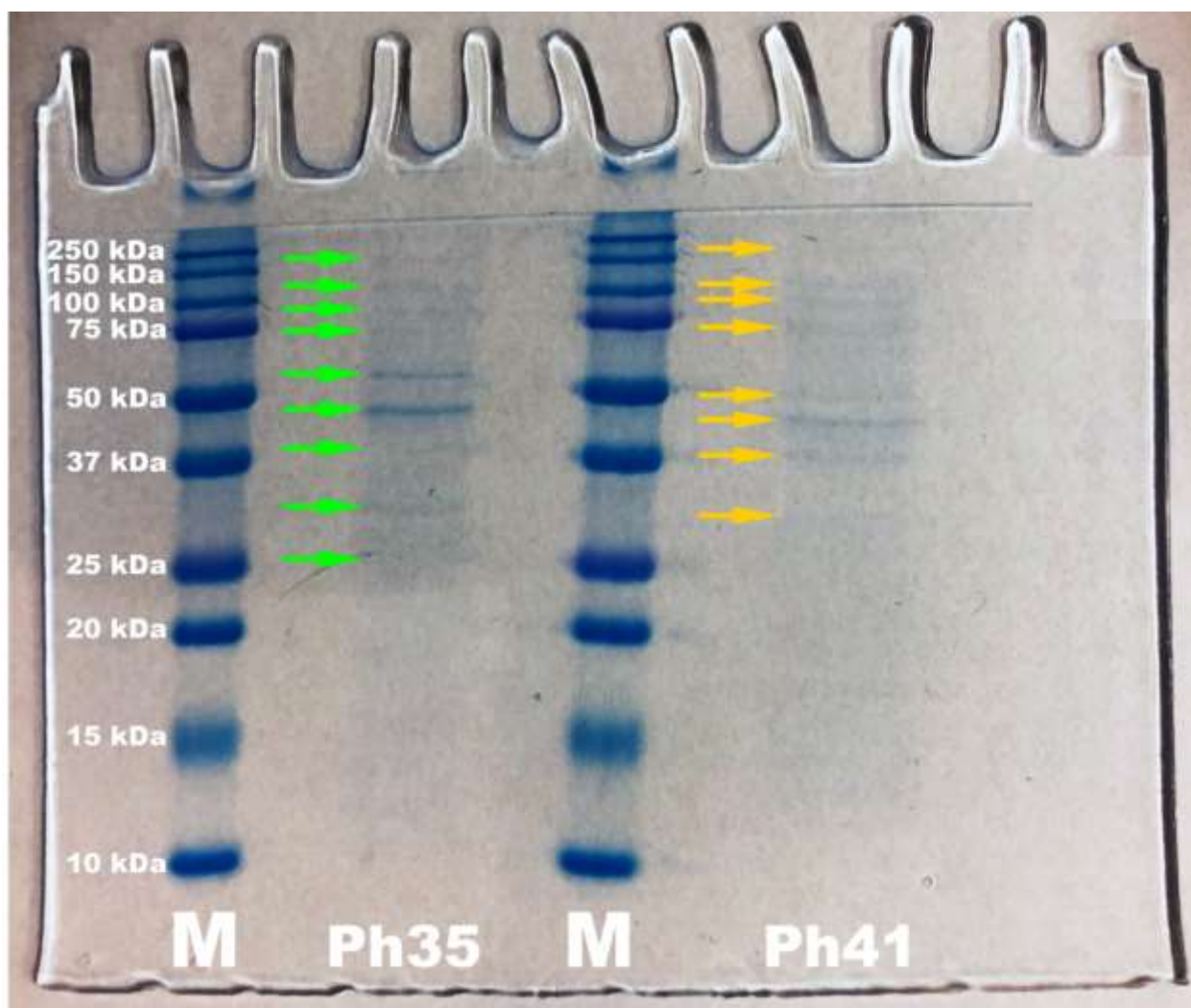


Fonte: Elaboração própria

Análise por eletroforese (SDS-PAGE) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041

As suspensões bacteriofágicas concentradas e purificadas exibiram uma grande variedade de bandas de proteínas. A Figura 11 representa os resultados da análise SDS-PAGE das suspensões dos bacteriófagos isolados.

Figura 11. Eletroforetogramas dos bacteriófagos ph0041 (Faixa Ph41) e ph0035 (Faixa Ph35) e dos marcadores de massa molecular (Faixa M) corados com Coomassie



Fonte: Elaboração própria

Aplicando o cálculo da mobilidade relativa das bandas e aplicação da curva de calibração resultante dos marcadores de massa molecular, obtiveram-se os seguintes massas moleculares: 131,02 kDa, 116,51 kDa, 105,65 kDa, 97,70 kDa, 80,34 kDa, 70,06 kDa, 59,91 kDa, 47,38 kDa

e 37,46 kDa para o bacteriófago ph0035, e 128,90 kDa, 112,69 kDa, 104,36 kDa, 94,81 kDa, 71,09 kDa, 64,58 kDa, 56,46 kDa e 43,99 kDa para o bacteriófago ph0041.

Como as massas moleculares entre os fagos são diferentes pode-se concluir que os bacteriófagos isolados são diferentes. Esta conclusão foi adicionalmente suportada pela análise de MET realizada e os demais ensaios de caracterização biológica.

Análises por difração de raios X (XRD) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041

A análise de difração de raios X foi utilizada para verificar se as amostras analisadas são cristalinas ou amorfas.

As propriedades físicas e químicas de um material dependem de como os átomos estão dispostos neste material, ou seja, de sua estrutura atômica e molecular. A técnica de difração de raios-X é um método experimental mais geral empregado para a determinação estrutural de sistemas pequenos, como haletos alcalinos, até macromoléculas como o vírus (NOVAIS, 2009).

Assim, dentre as diferentes ferramentas que permitem o conhecimento das estruturas biológicas, em nível atômico, destaca-se a técnica de difração de raios-X. Considerando que existe uma relação íntima entre estrutura tridimensional das proteínas e sua atividade é interessante o uso da difração de raios-X para a caracterização de fagos (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

Os resultados obtidos a partir das análises de difração de raios-X realizadas para as suspensões fágicas concentradas são apresentados na Figura 12 na forma de difratogramas normalizados e permite observar um pico de cristalinidade.

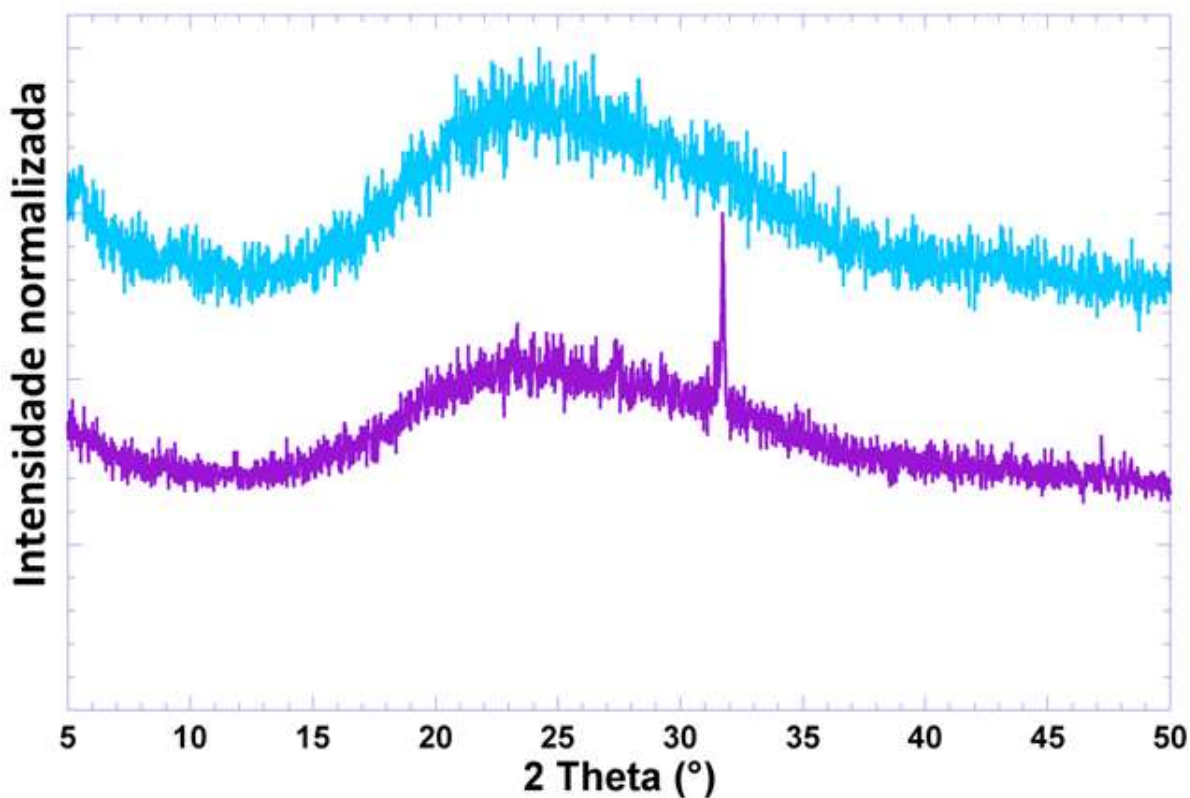
O difratograma de raios-X do bacteriófago ph0041, Figura 12, revelou um pico de cristalinidade a $2\theta = 31,70^\circ$, levando em consideração que o comprimento de onda de raios-X utilizado foi igual a 1,5418 angstrom (0,15418 nm). Através da conversão de todos os ângulos em graus para radianos foi possível calcular o tamanho provável do cristalito detectado utilizando a equação de Scherrer (SCHERRER, 1918). O tamanho provável do cristalito do bacteriófago ph0041 é de $\tau_{2\theta = 31,70} = 43,16$ nm.

Os difratogramas dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 apresentaram muitos ruídos talvez pela presença de outras substâncias como debris celulares, sais orgânicos advindos do processo de isolamento, purificação e propagação dos fagos.

Os resultados mostraram que o bacteriófago ph0041 exibiu um pico muito bem definido na região de $30,00 \leq 2\theta \leq 33,00$. O pico gerado pelo espalhamento de raios-X pelas estruturas

crystalinas servem como assinatura para o material analisado (MBONYIRYIVUZE et al., 2015).

Figura 12. Difratomogramas obtidos a partir da difração de raios-X dos bacteriófagos ph0035 (curva azul) e ph0041 (curva roxa)

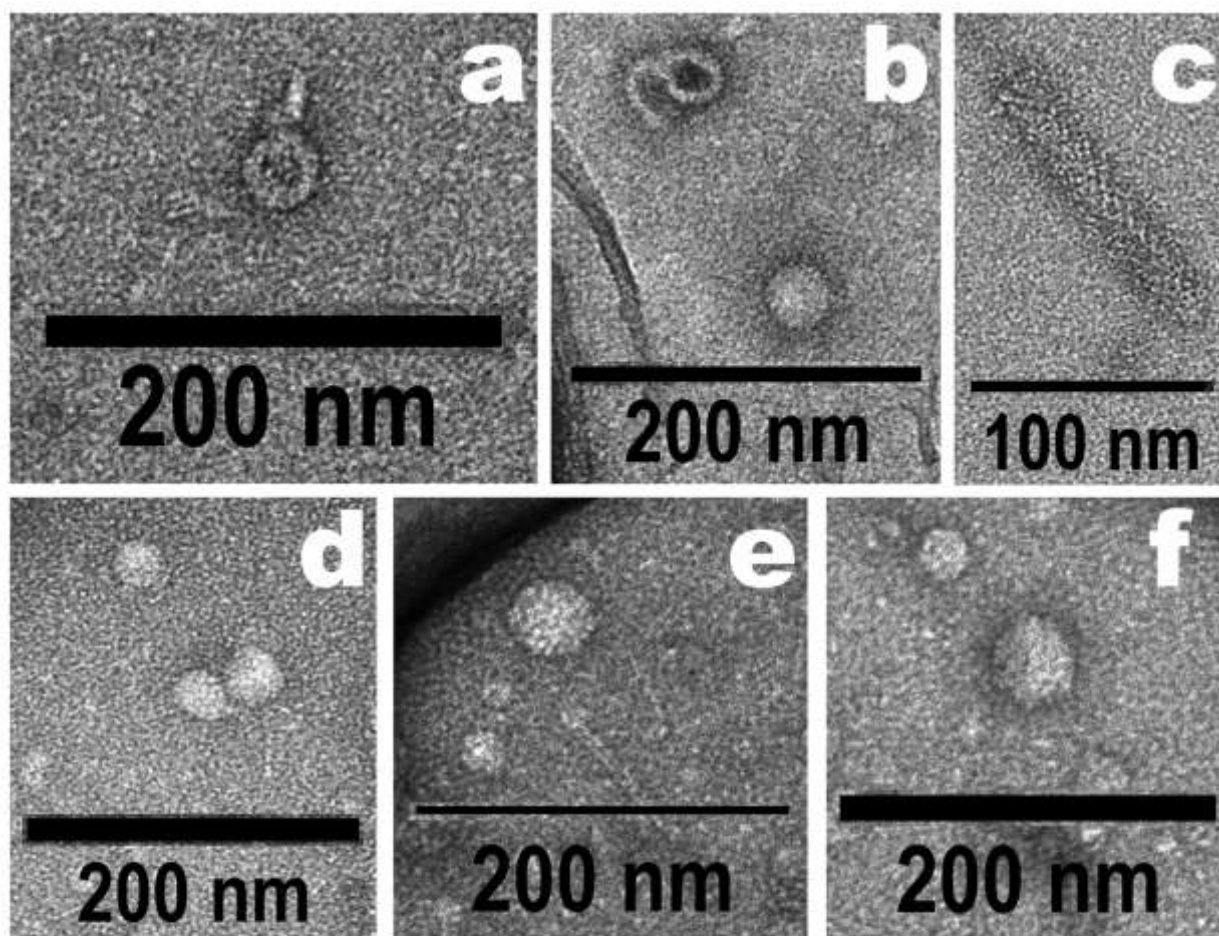


Fonte: Elaboração própria

Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos bacteriófagos ph0035 e ph0041.

As fotomicrografias representadas na Figura 13 permitem observar a estrutura das partículas bacteriofágicas isoladas, ph0035 (Figura 13a-c) e ph0041 (Figura 13d-f). O fago ph0035 pertence provavelmente à família *Myoviridae* e os fagos ph0041 pertencem provavelmente à família *Siphoviridae* (SHEN et al., 2012).

Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos bacteriófagos ph0035 (a, b e c) e ph0041 (d, e e f)



Fonte: Elaboração própria

Espectro lítico do coquetel na cepa de *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606)

Analisando a Figura 14 pode-se observar a formação de uma zona de lise límpida na cultura de *Acinetobacter baumannii*, indicando que o coquetel de bacteriófagos exibiu atividade lítica contra esta estirpe.

Figura 14. Espectro lítico do coquetel de bacteriófagos pelo método de disco difusão empregado em cultura de *Acinetobacter baumannii*



Fonte: Elaboração própria

A cepa de *Acinetobacter baumannii* usada nesta pesquisa demonstrou possuir uma resistência moderada a dois antibióticos utilizados exclusivamente em hospitais, polimixina B e cefepima.

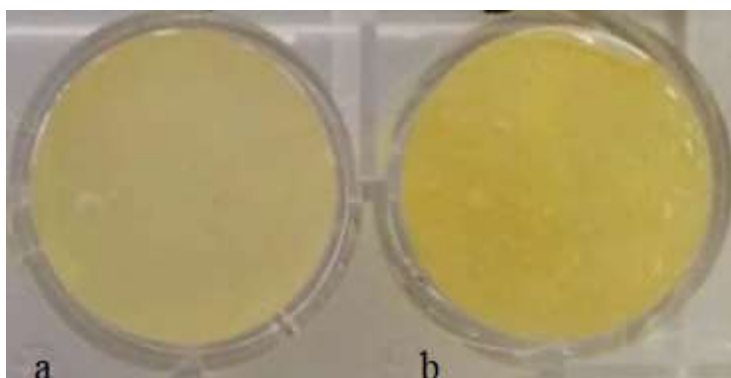
Embora as bactérias possam se tornar resistentes aos fagos, isto não é tão preocupante como a resistência bacteriana aos fármacos. Assim como as bactérias, os fagos podem sofrer mutações e, portanto, podem evoluir para combater a resistência bacteriana aos bacteriófagos. Além disso, o uso de coquetéis de fagos pode evitar o desenvolvimento de resistência. A fagoterapia pode ser realizada em conjunto com o uso de antibióticos. A junção da fagoterapia e a antibioticoterapia são sinérgicas, resultando em benefícios ao paciente (GOLKAR, BAGASRA; PACE, 2014). Neste sentido, os bacteriófagos isolados poderiam ser utilizados para o tratamento de pacientes infectados por estas cepas pela eficácia antimicrobiana demonstrada pelo coquetel fágico.

6.3 Síntese de líquidos iônicos

Os líquidos iônicos obtidos diferenciaram-se entre si em cor, textura e viscosidade. Como pode ser observado na Figura 15. O líquido iônico (1:1) (Figura 15a) apresentou uma cor mais

esbranquiçada, textura mais consistente e maior viscosidade do que o seu solvente eutético (Figura 15b).

Figura 15. Aspecto macroscópico do líquido iônico oleato de colina **(a)** líquido iônico (1:1) e de seu **(b)** solvente eutético (DES 1:2)



Fonte: Elaboração própria.

A escolha do líquido iônico oleato de colina para o desenvolvimento do hidrogel foi baseada nos resultados obtidos em outro projeto de pesquisa realizado no Laboratório de Bacteriófagos e Biofilme da Universidade de Sorocaba (PhageLab). Foi comprovado, através de ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e permeação transdérmica em células de Franz, que o oleato de colina não apresentou genotoxicidade e citotoxicidade significativas, além de atuar como um facilitador de permeação transdérmica para o ativo insulina (JORGE, 2019). Além disto, a reação de neutralização ácido-base envolvida na síntese dos líquidos iônicos apresentou-se como um processo simples, conforme afirmou Oliveira e colaboradores (2010).

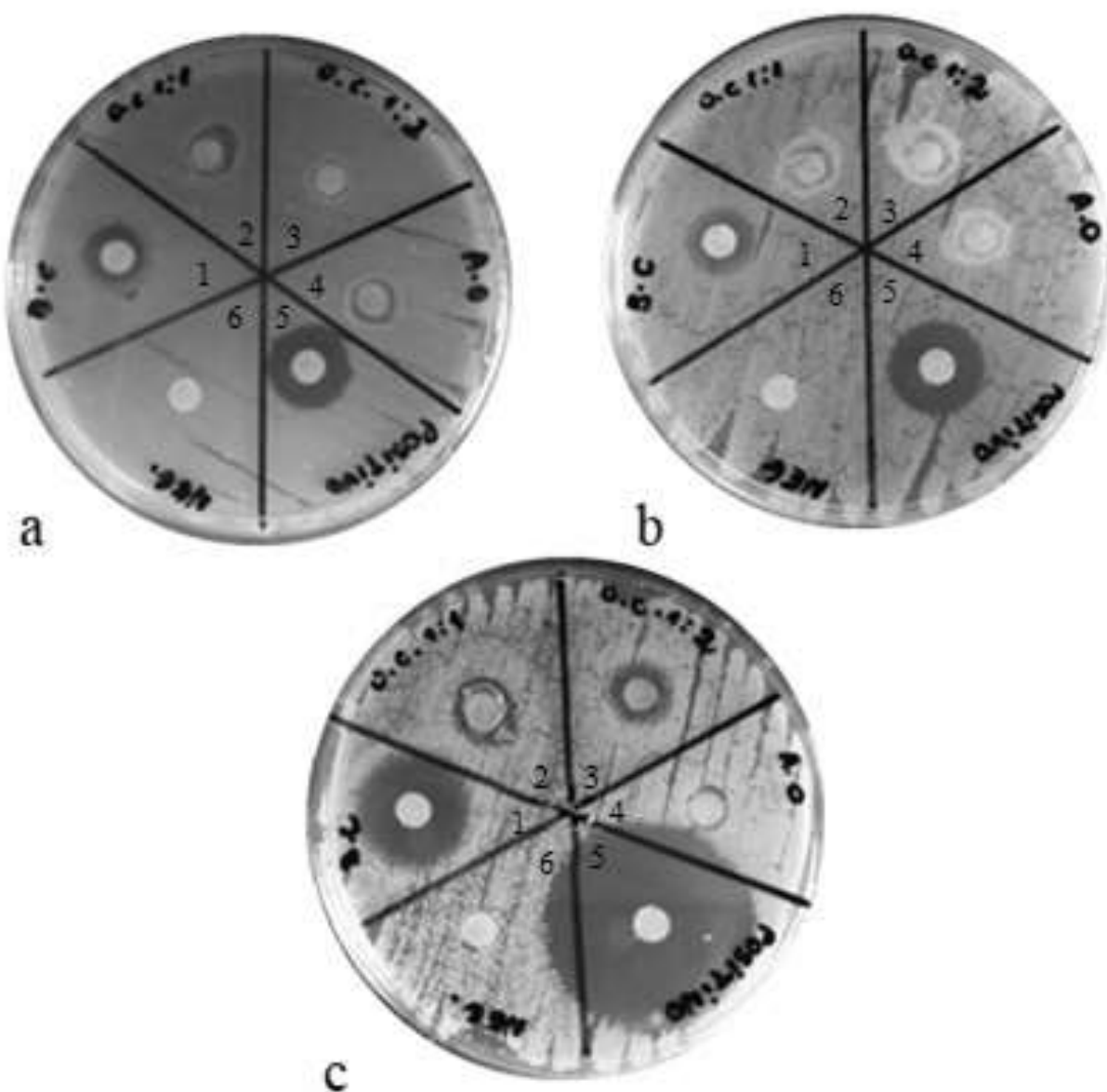
6.4 Atividade antimicrobiana de líquidos iônicos e de reagentes pelo método de disco-difusão

Os líquidos iônicos sintetizados e seus reagentes básicos foram avaliados quanto o seu potencial de atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão frente às cepas de referência (*P. aeruginosa* (CCCD- P004), *E. coli* (CCCD-E003) e *S. aureus* (CCCD-S007)), conforme os procedimentos para a realização do teste de eficácia antimicrobiana preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Como pode ser observado a partir da Figura 16, apenas o oleato de colina 1:1 mostrou uma atividade antimicrobiana moderada positiva contra *Pseudomonas aeruginosa*, (Figura 16a,

2). Nenhum dos líquidos iônicos oleato de colina 1:1 e 1:2 apresentou qualquer efeito sobre *Escherichia coli* (Figura 16b, 2 e 3), no entanto ambas substâncias exibiram uma leve atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Figura 16c, 2 e 3).

Figura 16. Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana realizada com (1) bicarbonato de colina; (2) oleato de colina (1:1); (3) oleato de colina (1:2); (4) ácido oleico; (5) controle positivo (coquetel de antibióticos-penicilina (10000 U.I./mL) / estreptomicina (10 mg/mL)) e (6) controle negativo-solução salina; frente a (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *E. coli* e (c) *Staphylococcus aureus*



Fonte: Elaboração própria

Os líquidos iônicos (1:1 e 1:2) foram analisados quanto à sua potencial atividade antimicrobiana contra a cepa de *Acinetobacter baumannii*. A formação de halo de inibição foi avaliada qualitativamente, e nenhuma atividade antimicrobiana foi observada nas amostras. Os resultados desses testes são mostrados na Figura 17.

Figura 17. Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana realizada com o líquido iônico (1:1) (I.L 1:1) e com o líquido iônico (1:2) (I.L 1:2 (DES)) frente a cepa de *Acinetobacter baumannii*



Fonte: Elaboração própria

A análise da atividade antimicrobiana do oleato de colina e do seu respectivo solvente eutético foi realizada a fim de se verificar se os mesmos possuíam a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, visto que vários estudos demonstraram o potencial antimicrobiano de diversos líquidos iônicos (GHANEM et al., 2018).

A capacidade inibitória dos líquidos iônico, se positiva, seria um resultado importante, visto que os mesmos poderiam contribuir, juntamente com os bacteriófagos, na luta contra as infecções provocadas pela *Acinetobacter baumannii*. No entanto, os líquidos iônicos foram utilizados neste trabalho apenas como facilitadores de permeação dos bacteriófagos.

Os resultados mostraram que os líquidos iônicos em estudo não possuem uma capacidade inibitória significativa contra as cepas utilizadas, portanto, a inibição bacteriana obtida nas demais análises deve-se a capacidade lítica dos bacteriófagos isolados.

6.5 Preparação do hidrogel

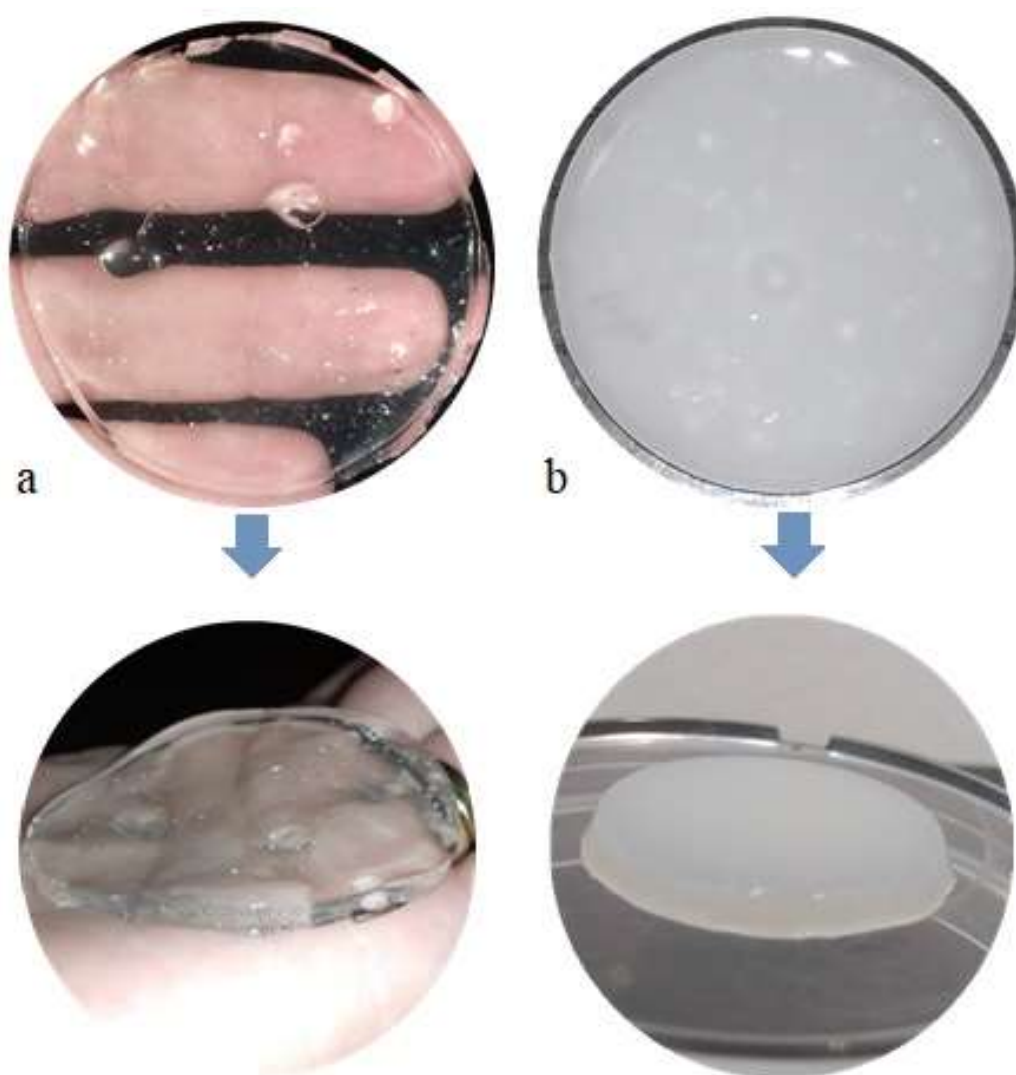
Para a obtenção de um hidrogel com líquido iônico impregnado de partículas bacteriofágicas foi necessário, inicialmente o preparo de uma microemulsão óleo em água (O/A) (PIRES; MOURA, 2017) para incorporação do líquido iônico. Para a obtenção da melhor emulsão foram preparadas e avaliadas emulsões com os líquidos iônicos 1:1 e 1:2. Na sequência, agregou-se esta microemulsão a uma formulação adequada para a obtenção de um hidrogel envolvendo alginato de sódio como agente gelificante. Por fim, adicionou-se o coquetel bacteriofágico antes da completa gelificação do hidrogel. O alginato de sódio foi utilizado devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade no contato *in vivo* e sua capacidade de gelificação adequada (MANJULA et al., 2013).

Os resultados obtidos pela análise por DLS das emulsões formuladas contendo oleato de colina 1:2 foram: tamanho hidrodinâmico de $232,20 \pm 3,78$ nm, potencial Zeta médio de $-73,41 \pm 2,22$ mV, e um índice de polidispersão (IPD) de $0,264 \pm 0,035$. Para a emulsão formulada empregando oleato de colina 1:1, os resultados foram: tamanho hidrodinâmico de $381,44 \pm 22,40$ nm, potencial Zeta médio de $-31,87 \pm 2,23$ mV e um índice de polidispersão de $0,314 \pm 0,200$. Os valores negativos do potencial Zeta promovem a repulsão eletrônica das partículas, contribuindo para a alta estabilidade da emulsão. O índice de polidispersão (IPD) é usado para descrever o grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas. O valor numérico de IPD varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com múltiplas populações de tamanho de partícula) (DANAEI et al., 2018). Em relação ao tamanho das partículas ambas formulações permitiram a obtenção de uma microemulsão. De acordo com a Comissão Europeia (EC, 2011), os nanomateriais são “um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, não ligadas, como um agregado ou como um aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas no número distribuição de tamanho, uma ou mais dimensões externas estão na faixa de tamanho de 1 nm - 100 nm”. Assim, pelos resultados obtidos definiu-se a microemulsão formulada com o líquido iônico 1:2 como a mais adequada, sendo utilizada para a obtenção dos hidrogéis. Esta microemulsão apresentou menor tamanho de partícula, menor

índice de polidispersão e maior potencial zeta. A microemulsão escolhida apresentou-se clara e estável ao longo de todo o período do experimento.

O método de obtenção do hidrogel de alginato foi a gelificação iônica, onde o cálcio foi liberado sob condições controladas dentro da solução de alginato. Neste método, a gelificação é mediada por uma mudança no pH, que, por sua vez, libera os cátions de ligação cruzada da insolubilidade de uma forma quelada (GURIKOV; SMIRNOVA, 2018), possibilitando a preparação de hidrogéis com boa aparência, adequada consistência e flexibilidade para o uso pretendido. A formulação proposta permitiu obter um hidrogel consistente e estável, capaz de ser manipulado sem perder sua forma. O hidrogel apresentou coloração esbranquiçada uniforme, sem bolhas ou rachaduras (Figura 18).

Figura 18. Hidrogéis de alginato de cálcio. **a**-hidrogel sem líquido iônico e **b**- hidrogel com líquido iônico de oleato de colina 1:2 (DES)



Fonte: Elaboração própria

6.6 Caracterização do hidrogel

O sucesso do tratamento de infecções de pele empregando-se bacteriófagos depende da capacidade de liberação de fagos no local da infecção. Neste sentido, tem se verificado o desenvolvimento de vários tipos hidrogéis, com diferentes características, e formulações tópicas contendo bacteriófagos para o tratamento de infecções de pele (QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018).

O hidrogel obtido foi caracterizado por difração de raios X (DRX), espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise térmica via DSC e microanálise estrutural via DESEM.

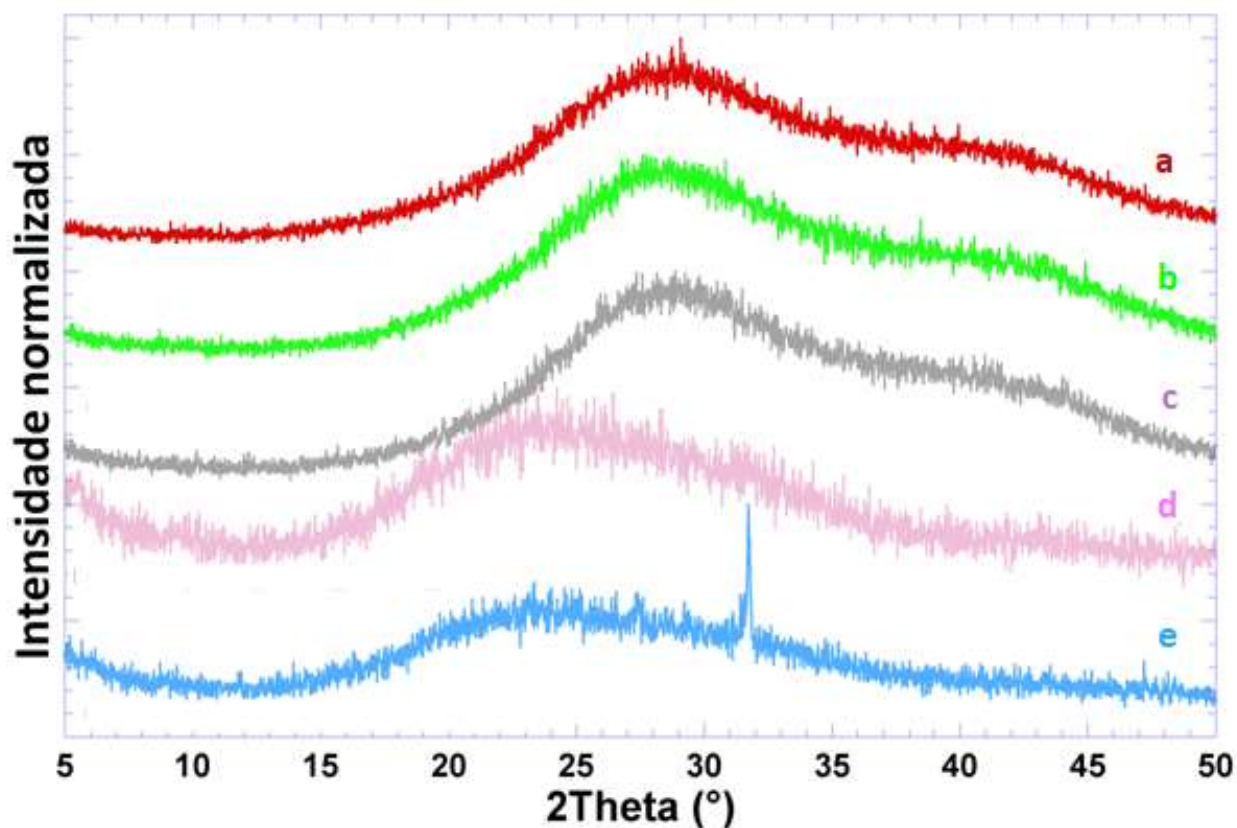
Difração de raios-X

Os resultados das análises de DRX realizadas para os hidrogéis são mostrados na Figura 19 na forma de difratogramas normalizados. A normalização dos difratogramas foi realizada dividindo-se os valores de intensidade pelo valor máximo de intensidade em cada difratograma, permitindo uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X dos hidrogéis contendo bacteriófagos. A difração de raios-X é uma técnica analítica que tem sido utilizada para a análise do grau de cristalinidade. Quando a luz de raios-X incide sobre um cristal, ocorre a formação de diversos padrões de difração, refletindo as características físico-químicas das estruturas cristal (DAS; ALI; HAMID, 2014).

A análise de DRX revelou comportamento amorfo sem picos de cristalinidade para os hidrogéis. Os difratogramas dos bacteriófagos ph0035 e ph0041 eram ruidosos, com o difratograma do bacteriófago ph0041 exibindo um pico de cristalinidade bem definido na região de $30,00 \leq 2\theta \leq 33,00$.

Era esperado que o pico de cristalinidade referente ao difratograma do bacteriófago ph0041 (Figura 19e) fosse visível no difratograma do hidrogel com o coquetel fágico (Figura 19a). No entanto, não foi possível a sua detecção possivelmente devido a concentração de fagos ser relativamente baixa. Outra possível justificativa seria o fato dos comprimentos de onda de raios-X utilizados para determinar a estrutura de proteínas serem de ordem de $1 \text{ \AA}$ (10^{-10} m), gerando um sinal muito fraco o que dificulta a detecção do mesmo, pois 99% da radiação atravessa a amostra sem interagir com seus átomos (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

Figura 19. Difratomogramas de raios X (XRD) de intensidade normalizada de **a**-hidrogel com oleato de colina 1:2 e coquetel de fagos; **b**-hidrogel com oleato de colina 1:2; **c**-hidrogel sem oleato de colina 1:2 e sem coquetel de Fagos; **d**-bacteriófago ph0035 e **e**-bacteriófago ph0041

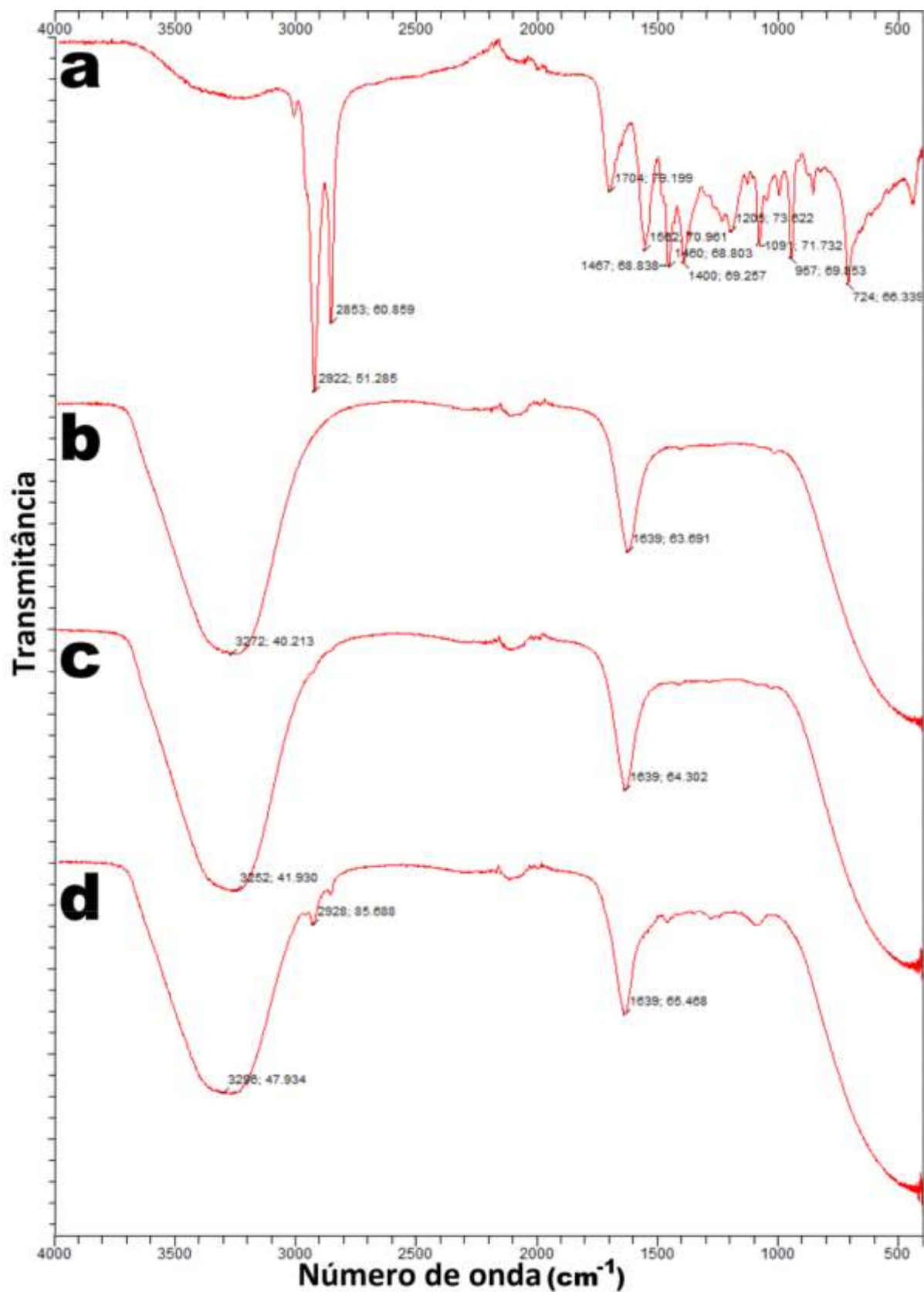


Fonte: Elaboração própria

Análise por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 20 mostra os espectros de FTIR do oleato de colina 1:2 (Figura 20a), do hidrogel sem a microemulsão e sem partículas bacteriofágicas (Figura 20b), do hidrogel com oleato de colina 1:2 (Figura 20c) e hidrogel com oleato de colina 1:2 e com partículas de bacteriofágicas (Figura 20d).

Figura 20. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). **a-** oleato de colina 1:2; **b-** hidrogel sem a microemulsão e sem as partículas fágicas; **c-** hidrogel com oleato de colina 1:2; **d-** hidrogel com oleato de colina e partículas fágicas



Nos espectros de oleato de colina (Figura 20a) pode-se observar dois picos a 2922 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , que podem ser atribuídos ao alongamento assimétrico e ao estiramento simétrico de CH_2 , respectivamente (ZHANG; HE; GU., 2006).

Os espectros de FTIR de hidrogéis mostraram picos próximos a 1649 cm^{-1} (Figura 20b, c, d) que podem ser atribuídos a vibrações de alongamento assimétricas de carboxilato e $3272,40\text{ cm}^{-1}$ (Figura 20b), $3298,47\text{ cm}^{-1}$ (Figura 20c) e $3252,41\text{ cm}^{-1}$ (Figura 20d), que podem ser relacionados a vibrações de alongamento de ligações O – H (DAEMI; BARKANI, 2012).

Os espectros de FTIR dos hidrogéis confirmam a similaridade das estruturas químicas dos biopolímeros e mostraram que não houve interferência entre componentes utilizados na formulação.

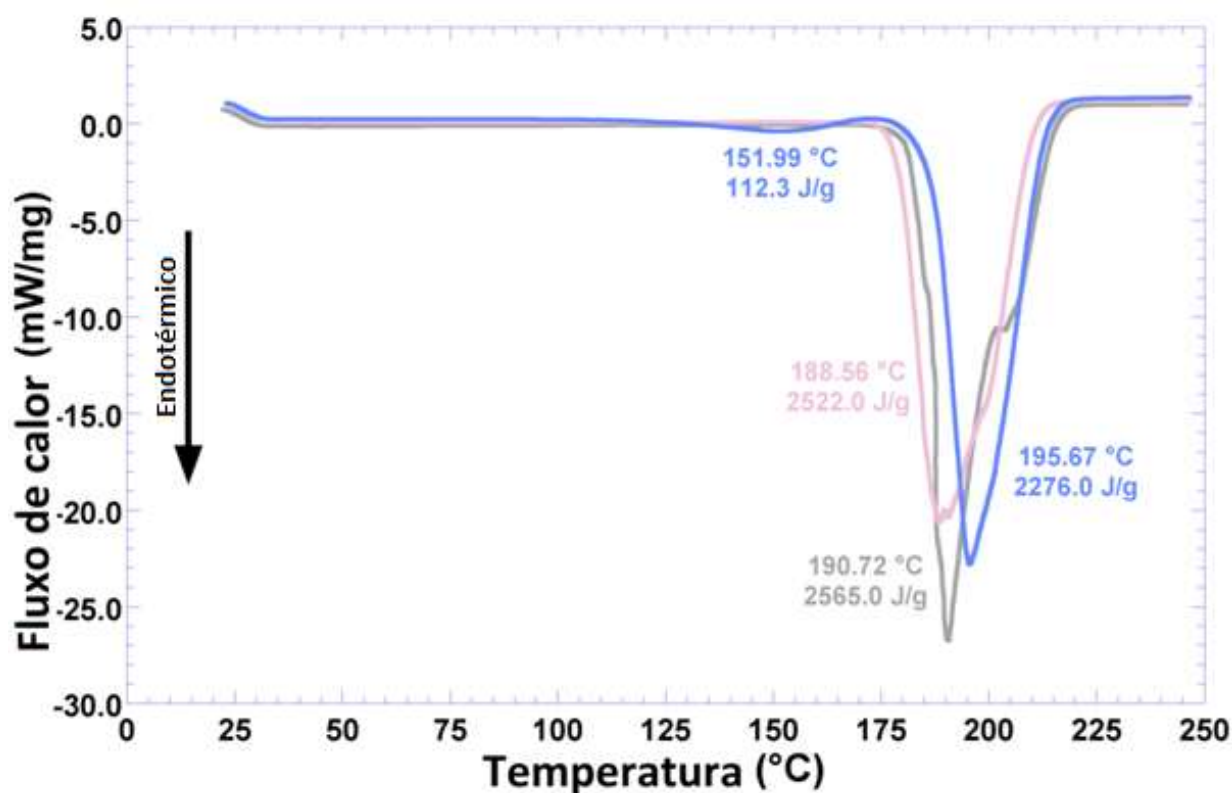
Análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas de DSC dos hidrogéis produzidos estão ilustrados na Figura 21. Os hidrogéis produzidos são basicamente feitos de alginato de sódio. Assim, pode-se observar eventos térmicos muito semelhantes e as proporções entre suas entalpias de fusão são da mesma ordem de grandeza.

Os principais eventos endotérmicos nas amostras são os picos endotérmicos a $188,56\text{ }^{\circ}\text{C}$ do hidrogel com oleato de colina 1:2 com entalpia de fusão associada de 2522 J/g ; a $190,72\text{ }^{\circ}\text{C}$ do hidrogel sem a microemulsão e sem partículas bacteriofágicas com entalpia de fusão associada de 2565 J/g ; e a $195,67\text{ }^{\circ}\text{C}$ do hidrogel com oleato de colina 1:2 e partículas bacteriofágicas com entalpia de fusão associada de $2276,0\text{ J/g}$. Estas temperaturas são pertinentes à temperatura de fusão do alginato ($187,56\text{ }^{\circ}\text{C}$) e estão relacionadas com a degradação do hidrogel (PEREIRA et al., 2013).

Como se pode se observar, todos os hidrogéis exibem altas temperaturas de fusão e, portanto, são estáveis para a aplicação pretendida.

Figura 21. Termogramas calorimetria diferencial de varredura (DSC) do hidrogel sem oleato de colina e sem fagos (curva lilás); do hidrogel com oleato de colina (1:2) (curva roxa) e do hidrogel com oleato de colina (1:2) e coquetel de fagos (curva azul)

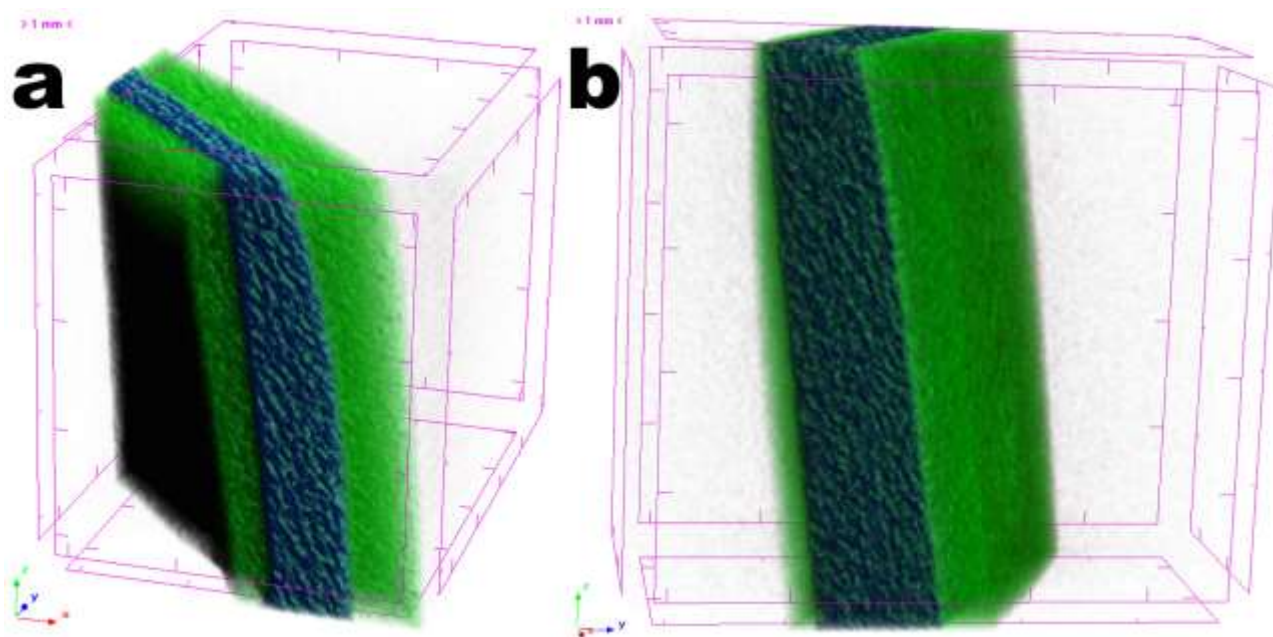


Fonte: Elaboração própria

Tomografia por transmissão de raios X (XRT)

Nas imagens obtidas por análise de XRT apresentadas na Figura 22, pode-se observar uma densidade atômica maior nas superfícies (em verde), possivelmente esta área é mais propensa a absorver radiação. No centro, em azul, pode-se ver os espaços vazios característicos de um hidrogel para aplicações tópicas, cujo objetivo central é servir como transportador/liberador de ativos (SILNA et al., 2016). Assim, os aspectos observados nas imagens eram esperados, em função da estrutura tridimensional dos hidrogéis (SUBRAMANIAN; VIJAYAKUMAR, 2015).

Figura 22. Tomografia computadorizada de raios X de **a**-hidrogel sem partículas fágicas e **b**-hidrogel com partículas fágicas



Fonte: Elaboração própria

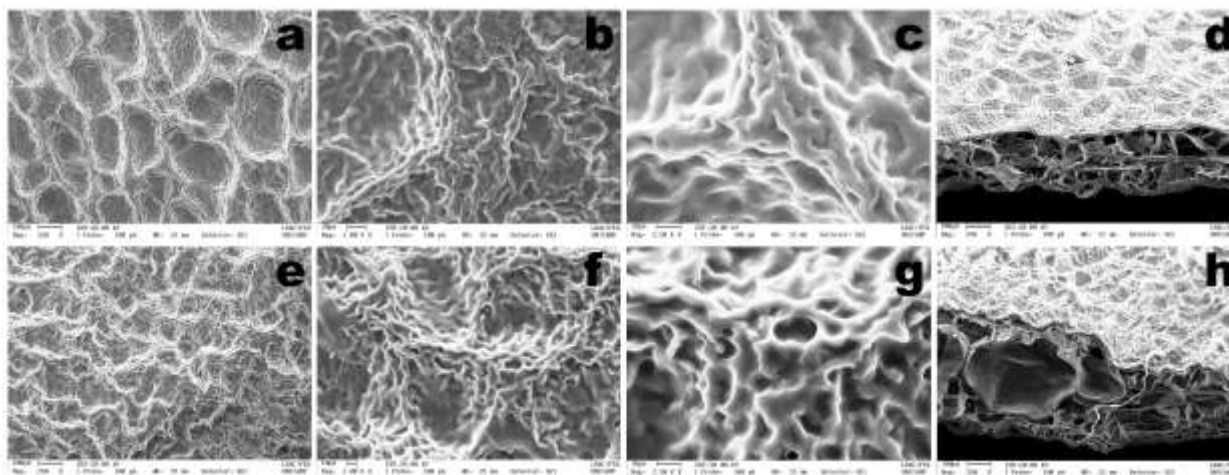
Análises de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva

A topografia da superfície e a estrutura da secção transversal das amostras liofilizadas de hidrogéis foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva e os resultados obtidos estão disponibilizados na Figura 23.

As superfícies do hidrogel com oleato de colina (1:2) (Figuras 23a, b, c e d) e do hidrogel com oleato de colina (1:2) e partículas fágicas (Figuras 23 e, f, g e h) são relativamente uniformes com ausência de rachaduras. As estruturas internas observadas na seção transversal fraturada do hidrogel com oleato de colina 1:2 (Figura 23d, x250) e do hidrogel com oleato de colina 1:2 e partículas de bacteriófago (Figura 23h, x250) mostraram um núcleo de matriz altamente poroso, indicando a formação de uma rede tridimensional característica dos hidrogéis (SUBRAMANIAN; VIJAYAKUMAR, 2015).

Segundo Narayanaswamy e Torchilin (2019), a formação dos poros é de extrema importância, pois a alta porosidade permite veiculação de ativos na matriz do hidrogel. Além disso, os poros são preenchidos por água que possibilitam uma liberação controlada do ativo por difusão. Portanto, o hidrogel obtido possui as características desejadas para atuar como transportador das partículas fágicas.

Figura 23. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura por energia dispersiva (DESEM) da superfície do hidrogel com oleato de colina (1:2) (a: x250; b: x1000; c: x2500) e do hidrogel com oleato de colina (1:2) e com partículas fágicas (e: x250; f: x1000, e g:x2500). Estruturas internas da seção transversal fraturada do hidrogel com oleato de colina 1:2 (d: x250) e do hidrogel com oleato de colina 1:2 e partículas fágicas (h: x250)



Fonte: Elaboração própria

6.7 Avaliação da atividade lítica das partículas fágicas em hidrogel pelo método de disco-difusão

Um parâmetro importante a ser observado é a verificação da manutenção da atividade lítica das partículas fágicas que foram incorporadas ao hidrogel.

Os bacteriófagos são estruturas proteicas suscetíveis a desnaturação proteica devido às altas temperaturas, pH, força iônica, efeitos interfaciais e a exposição a solventes orgânicos. As tensões mecânicas durante a formulação, incluindo tensões de cisalhamento durante a mistura e agitação precisam ser consideradas a fim de preservar as partículas fágicas (MALIK et al., 2017). Fatores químicos e físicos externos podem inativar um fago através de danos a seus elementos estruturais (cabeça e cauda), perda de lipídeos e/ou alterações estruturais do material genético (DNA ou RNA) (JONCZK et al., 2011).

Os resultados apresentados na Figura 24 comprovam que a presença do líquido iônico oleato de colina e o procedimento para preparação do hidrogel não inativaram os bacteriófagos, mantendo a capacidade lítica dos mesmos contra a cepa de *Acinetobacter baumannii*.

Figura 24. Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos em hidrogel pelo método de disco-difusão



Fonte: elaboração própria

Desenvolver uma formulação capaz de incorporar os bacteriófagos sem que haja interferência na sua capacidade de infectar a bactéria e que permita a liberação das partículas fágicas é de suma importância, visto que é necessário que os fagos permaneçam ativos e livres para realizar o tratamento cutâneo desejado.

6.8 Avaliação da capacidade de permeação cutânea do coquetel de bacteriófagos incorporados no hidrogel

Para o ensaio de permeação transdérmica dos fagos, dois hidrogéis foram preparados, um com líquido iônico e outro sem líquido iônico, para verificar se a presença do oleato de colina facilitaria, ou não a permeação dos fagos através da pele.

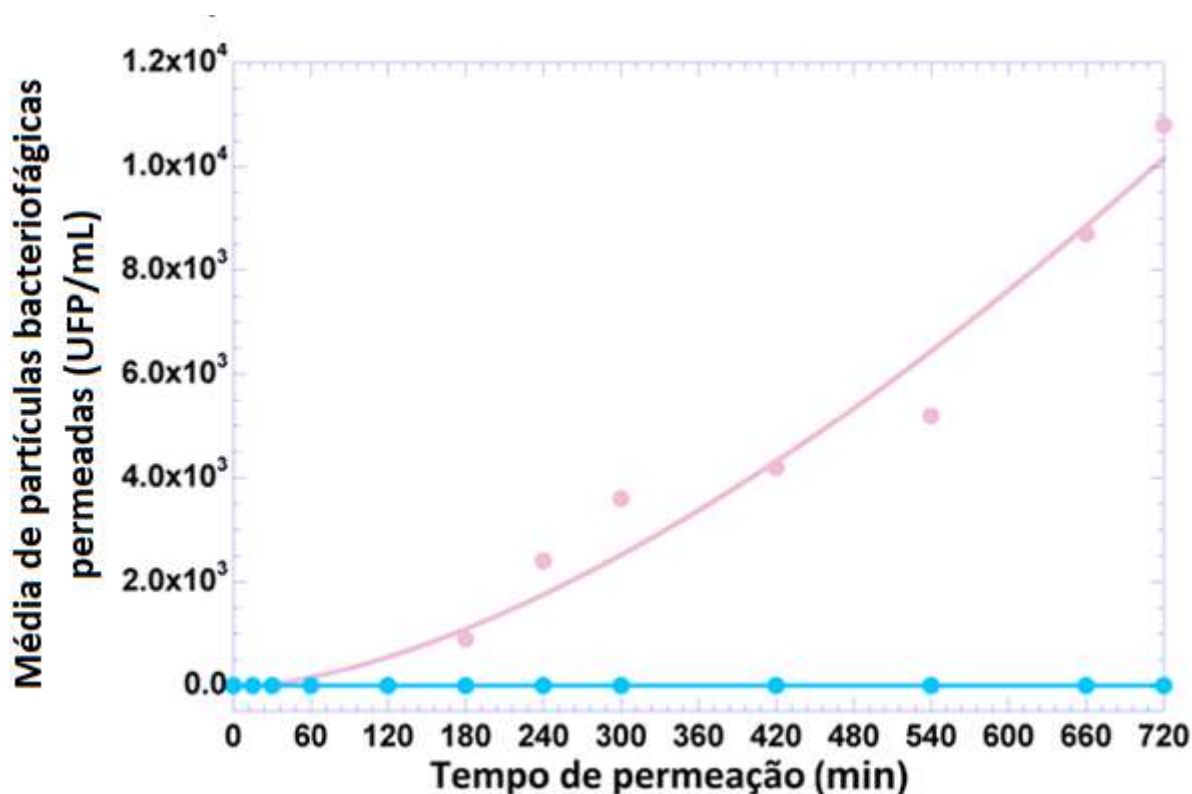
A avaliação da capacidade de permeação das partículas fágicas transportadas pelo hidrogel contendo oleato de colina, foi realizada através de um sistema denominado célula de difusão de Franz. Este aparato é usualmente empregado para avaliar a liberação e permeação

cutânea de ativos incorporados em sistemas de liberação de drogas tópicas e transdérmicas (RUELA et al., 2016). A pele da orelha suína foi escolhida como membrana de permeação devido à permeabilidade e morfologia semelhantes a da pele humana e também, devido à sua disponibilidade (DOBLER et al., 2016).

Ao analisar a Figura 25 é possível verificar que o hidrogel sem o líquido iônico não promoveu a permeação de partículas fágicas, no entanto, o hidrogel contendo o líquido iônico facilitou significativamente a permeação dos bacteriófagos pela pele de orelha de porco.

Os resultados comprovam que o líquido iônico permitiu a permeação das partículas fágicas, corroborando com as afirmações de Zakrewsky e colaboradores (2014) que indicaram o caráter facilitador de permeação cutânea do oleato de colina.

Figura 25. Avaliação da capacidade de permeação cutânea do coquetel de bacteriófagos líticos para *Acinetobacter baumannii*, em hidrogel com oleato de colina 1:2 (curva rosa) e em hidrogel sem oleato de colina (curva azul)



Fonte: Elaboração própria

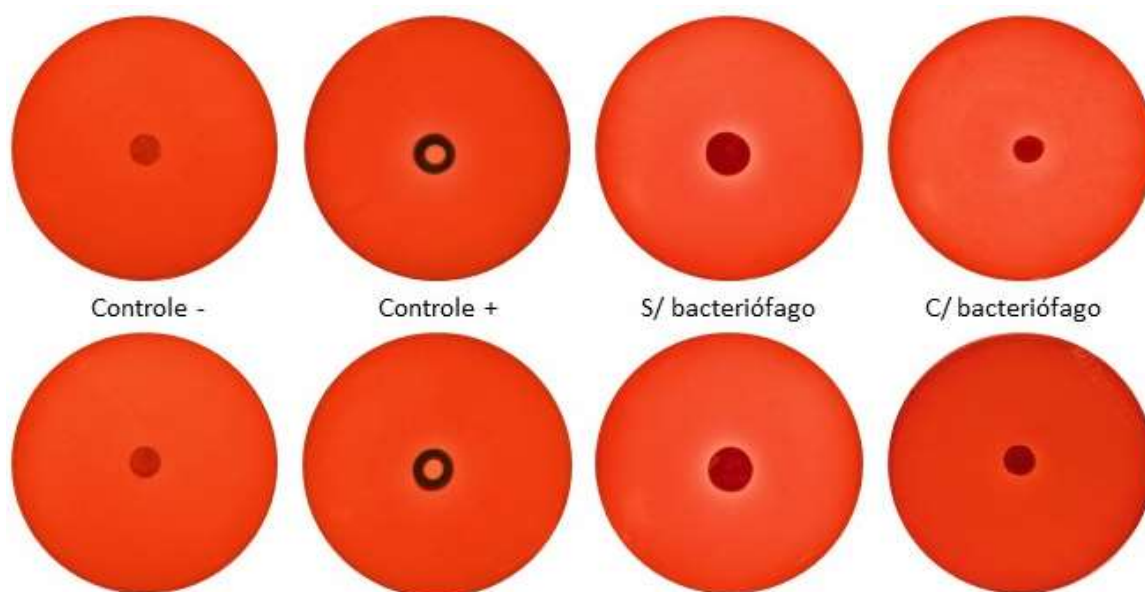
Realizando um ajuste não-linear de uma curva sigmoideal aos resultados obtidos a partir da permeação transdérmica das partículas bacteriofágicas (Figura 25, curva rosa claro), foi possível obter a concentração máxima de proteína permeada, $9,791 \times 10^5$ UFP mL⁻¹, por área de pele com um coeficiente de correlação igual a $r = 0,9867$.

Segundo Monti *et al.* (2017), alguns líquidos iônicos são capazes de interatuar com os componentes da pele, inserindo-se na bicamada lipídica. Os surfactantes catiônicos, como oleato de colina, são capazes de interagir com as fibrilas de queratina das células cornificadas, favorecendo a ruptura momentânea da matriz celular-lipídica, possibilitando a passagem cutânea das entidades proteicas. Portanto, os resultados obtidos mostram que possivelmente ocorreu uma desestabilidade do estrato córneo, permitindo a permeação dos bacteriófagos. Os resultados comprovaram, novamente que os fagos mativeram a sua capacidade lítica e que o hidrogel não aprisionou as partículas fágicas, garantindo que os fagos permaneram livres para permear pela pele.

6.9 Análise da citotoxicidade do hidrogel pelo método de difusão em ágar

Os resultados do teste de citotoxicidade, pelo método de difusão em ágar, mostraram haver morte celular causada pelo contato do material após 24h. A realização de análise microscópica confirmou a morte das células, o que gerou a formação do halo em torno do material (visualizado a olho nu) (Figura 26).

Figura 26. Análises de difusão em ágar com células HaCaT. Controle negativo (-); controle positivo (+); membranas de hidrogel sem bacteriófagos (S/bacteriófago); membranas de hidrogel contendo um coquetel de bacteriófagos líticos para *A. baumannii*



Fonte: Elaboração própria

Com base nos dados fornecidos pela Norma ISO 10993-5:2009 que avalia os graus de reatividade para o teste de difusão em ágar (Tabela 1), é possível verificar uma reatividade branda, de nível 2, onde se observou zona de lise limitada a área sob a amostra.

Tabela 2. Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar de acordo com a Norma ISO 10993-5/2009

Grau	Reatividade	Aparência da zona de reatividade	Efeito citotóxico
0	Nenhuma	Zona não detectável sob ou ao redor da amostra.	Negativo
1	Leve	Algumas células malformadas ou degeneradas sob a amostra.	Negativo
2	Branda	Zona limitada a área sob a amostra.	Negativo
3	Moderada	Zona estendendo-se até 1 cm da amostra.	Positivo
4	Grave	Zona estendendo-se por mais de 1 cm da amostra.	Positivo

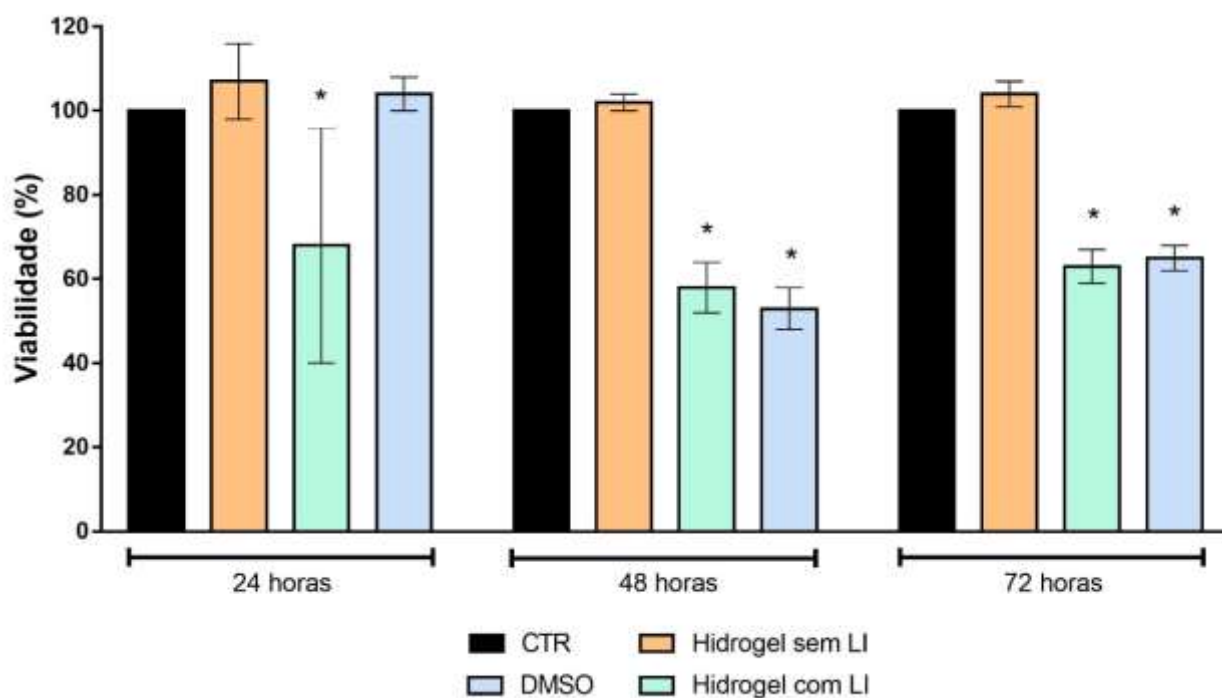
Fonte: Norma ISO 10993-5/2009

O método de difusão em ágar mostrou, portanto, um efeito citotóxico negativo para o hidrogel com líquido iônico oleato de colina 1:2. Todavia, outro teste de citotoxicidade foi realizado a fim de se verificar a segurança da utilização do hidrogel.

6.10 Análise da citotoxicidade do hidrogel pelo ensaio de MTS

A Figura 27 apresenta o gráfico comparativo da viabilidade celular das populações celulares de fibroblastos de 3T3 em contato direto com as amostras de hidrogel sem líquido iônico (salmão) e de hidrogel com líquido iônico (azul claro), em relação aos controles, utilizando a técnica MTS.

Figura 27. Porcentagem de viabilidade celular das amostras de hidrogel sem líquido iônico (LI) (salmão) e hidrogel com líquido iônico (LI) (azul esverdeado) em relação ao controle negativo (preto) e ao controle positivo DMSO (azul), obtidos no ensaio de MTS durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Elaboração própria

Ao analisar o gráfico, pode-se verificar que as células, quando em contato com a amostra de hidrogel sem líquido iônico, não apresentaram diferença percentual significativa de viabilidade quando comparadas com o controle negativo, mantendo uma alta taxa de viabilidade celular mesmo após 72 horas em contato com a amostra. Todavia, o hidrogel contendo líquido iônico apresentou uma diferença percentual significativa, com uma redução da viabilidade celular, aproximando-se aos valores do controle positivo, revelando assim moderado grau de toxicidade quando comparado ao protocolo ISO 10993-5 (ISO, 2009).

De acordo com a ISO 10993-5, porcentagens de viabilidade celular acima de 80% são consideradas sem citotoxicidade; dentro de 80% a 60%, apresentam fraca citotoxicidade; de 60% a 40% apresentam moderada citotoxicidade e abaixo de 40% apresentam alta citotoxicidade (AKBAR et al., 2019).

Os resultados do ensaio de MTS mostraram uma diminuição da viabilidade celular, quando em contato com o hidrogel contendo o oleato de colina, mantendo-se perto dos 60%, apresentando, portanto, uma citotoxicidade moderada.

Essa moderada toxicidade poderá estar relacionada com a concentração utilizada na preparação do hidrogel contendo 1% de oleato de colina. Alguns estudos demonstraram que muitos LIs apresentam toxicidade em concentrações acima de 1% (HAJFARAJOLLAH, 2014), portanto, a concentração do oleato de colina pode ter influenciado na citotoxicidade, deste modo, visando reduzi-la, será necessário averiguar em qual concentração mínima de oleato de colina será possível garantir a permeação dos bacteriófagos, reduzindo assim a citotoxicidade do hidrogel.

Estudos toxicológicos sobre os líquidos iônicos, revelaram que muitos apresentam um certo nível de toxicidade (GOUVEIA, 2014). A complexidade das características estruturais, a concentração e o biosistema podem interferir na toxicidade dos líquidos iônicos. Portanto, é necessário haver um controle racional desses parâmetros para mitigar essa toxicidade, tornando possível projetar LIs biocompatíveis (AGATEMOR, 2018).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho de pesquisa, buscou-se o desenvolvimento de um hidrogel empregando alginato de sódio, como meio de transporte para um coquetel de partículas de bacteriófagos líticos visando o tratamento de infecções profundas da pele, causadas por *Acinetobacter baumannii*.

Os bacteriófagos isolados foram nomeados PhL_UNISO_AB-ATC_ph0041 (isolado da água de esgoto hospitalar) e PhL_UNISO_AB-ATC_ph0035 (isolado a partir da água de esgoto doméstico) e caracterizados bio-fisicamente.

O líquido iônico e o seu respectivo solvente eutético foram sintetizados e verificou-se que a microemulsão contendo oleato de colina 1:2 apresentou menor tamanho de partícula, menor índice de polidispersão e maior potencial zeta, portanto utilizou-se a microemulsão contendo o solvente eutético para a produção do hidrogel. Deste modo, a microemulsão mostrou-se estável e adequada para o preparo do hidrogel.

Os bacteriófagos foram incorporados no hidrogel, contendo o oleato de colina 1:2 em sua formulação. A caracterização físico-química do hidrogel mostrou um hidrogel com aparência homogênea, maleabilidade adequada, ausência de fraturas ou trincas, características físicas e químicas e estruturais adequadas.

A avaliação da atividade lítica contra *A. baumannii* mostrou que, após a incorporação dos bacteriófagos ao hidrogel na base de alginato de sódio contendo o líquido iônico oleato de colina (1:2), os fagos permaneceram capazes de lisar o agente patogênico.

Os resultados da permeação transdérmica indicaram que a incorporação do líquido iônico foi fundamental para a permeação dos fagos, visto que o hidrogel sem líquido iônico em sua formulação não auxiliou a permeação das partículas fágicas.

Os ensaios de citotoxicidade realizados no hidrogel com oleato de colina indicaram que o produto apresentou uma toxicidade moderada, sendo portanto necessário averiguar a concentração mínima de oleato de colina que possibilitaria a permeação dos bacteriófagos, reduzindo assim a citotoxicidade do hidrogel.

Pode-se concluir que o objetivo deste trabalho foi alcançado ao desenvolver um sistema de entrega transdérmica capaz de proteger e estabilizar (estrutural e funcionalmente) entidades proteicas bioativas e, ao mesmo tempo, promover uma melhoria no processo de permeação cutânea. Contudo, será necessário reavaliar a concentração de oleato de colina utilizado para reduzir os riscos de citotoxicidade.

8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como proposta de trabalhos futuros existem muitas linhas de desenvolvimento que podem ser seguidas, uma delas seria a determinação da sequência gênica dos fagos isolados. Esta etapa é importante para melhor caracterizar os bacteriófagos.

Em relação ao hidrogel produzido, será importante determinar a concentração mínima de oleato de colina que possibilite a permeação transdérmica dos bacteriófagos com menor toxicidade possível.

Estudos dos diferentes tipos de embalagens e formas de conservação, deverão ser realizados a fim de se verificar quais serão as mais adequadas para garantir a qualidade do produto final. Também se torna necessário avaliar a estabilidade do hidrogel desenvolvido para averiguar a sua viabilidade de comercialização.

A investigação da possibilidade de incorporação de antibióticos ao hidrogel, contendo o coquetel bacteriofágico, também é uma proposta interessante para se averiguar a presença de sinergismo antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

AGATEMOR, C. et al. Ionic liquids for addressing unmet needs in healthcare. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 3, p. 7-25, 2018.

AKBAR, N. et al. Gut bacteria of *Cuora amboinensis* (turtle) produce broad-spectrum antibacterial molecules. **Scientific Reports**, v. 9, artigo número 17012, 2019.

ALCÂNTARA, M. T. S. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações poliméricas**. Tese de Doutorado em Ciência na área de Tecnologia Nuclear – Materiais, IPEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALLEN, H. K. et al. Finding alternatives to antibiotics. **Annals of The New York Academy of Sciences**. DOI: 10.1111/nyas.12468. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/nyas.12468>. Acesso em 22 de março de 2019.

ALMAGHRABI, M. K., MARTIN R. P. J., MOHAMED E. H. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging health threat in Aseer region, Kingdom of Saudi Arabia. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2018, p.1-4, 2018.

ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.

ALMEIDA, T. S. et al. Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility and skin permeation studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 11, p. 1858-1865, 2017.

AMBROSIO, A. L. B; FRANCHINI, K. Z. Cristalografia macromolecular: A biologia sob a ótica dos raios- X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 29-36, 2017.

ANTUNES, L.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 3, p. 292–301, 2014.

ARAÚJO, E. A. et al. Rheological properties of brine/vegetable oil/polyethoxylated nonionic surfactants based microemulsion. **Holos**, v. 2, p. 16-25, 2018.

AZEREDO, J. O potencial biotecnológico dos bacteriófagos na detecção e controle de bactérias patogênicas. **Boletim de Biotecnologia**, 2013. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/32058>. Acesso em 16 de agosto de 2019.

BALCAZAR, J. L. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. **PLOS Pathogens** (Public Library of Science), v. 10, n. 7, p. 1-4, 2014.

BATALHA, L. S. **Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e avaliação do potencial para a fagoterapia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2017.

BECEIRO A.; TOMÁS M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A.; EDMISTON, C. E. *Acinetobacter* infections – Epidemiology and pathogenesis of a significant healthcare-associated pathogen. **Healthcare Infection**, v. 16, p. 6-17, 2011.

BONILLA, N. et al. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. **PeerJ**, v. 4, p. 1- 18, 2016.

CAPARICA, R. et al. Applicability of ionic liquids in topical drug delivery systems: A mini review. **Journal of Pharmacology & Clinical Research**, v. 4, n. 5, p. 1-6, 2018.

CARDOSO, H. J. et al. Tyrosine kinase inhibitor imatinib modulates the viability and apoptosis of castrate-resistant prostate cancer cells dependently on the glycolytic environment. **Life Sciences**, v. 218, p. 274-283, 2019.

CARVALHO, C. et al. Bacteriophage characterization. **3 rd International hands- on PHAGE**. Braga- Portugal, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR)**, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Acesso em: 17 de março de 2020.

CELESTINO, V. P et al. **Produção e caracterização de hidrogel de carboximetilcelulose para aplicação de curativos biomédicos**. 14º Congresso da Sociedade Brasileira Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos, 20 a 24 de agosto, 2017. Maresia, São Paulo, Brasil.

CHAHINE, E. B.; SUCHER, A. J. Skin and soft tissue infections. In: American College of Clinical Pharmacy, **Infection Disease**, 2015. Disponível em: <https://www.accp.com/docs/bookstore/psap/2015B1.SampleChapter.pdf>. Acesso em: 28 de março de 2019.

CHAI, Q.; JIAO, Y.; YU, X. Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them qinyuan. **Gels**, v. 3, n.1, p. 1-15, 2017.

CHELLAT M.F; RAGUZ L.; RIEDL R. Targeting antibiotic resistance. **Angewandte Chemie International**, v. 55, n. 23, p. 6600-6626, 2016.

CHEN, L. et al. Clinical antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* strains with higher susceptibility to environmental phages than antibiotic-sensitive strains. **Scientific Reports**, v. 7, artigo 6319, 2017.

CHENG, G. et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, artigo 217, 2014.

CHOI, W. et al. Efficient skin permeation of soluble proteins via flexible and functional nano-carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 272-278, 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition**. NCCLS document.

M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Versão traduzida. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso em 18 de março de 2019.

CONEAC, G. et al. Development and evaluation of new microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of fluconazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 889-904, 2015.

DAEMI, H.; BARKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 2023-2028, 2012.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 57, p. 1-17, 2018.

DAS, R.; ALI, M. E.; HAMID, S. B. A. Current applications of X-Ray power diffraction: a review. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 38, p. 95-109, 2014.

DOBLER, D. et al. Hydrophilic Ionic Liquids as Ingredients of Gel-Based Dermal Formulations. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 923-931, 2016.

DOSS, J. et al. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**, v. 9, n. 50, p. 1-10, 2017.

DRYDEN, M. S. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, S2-S7, 2009.

ELHOSSEINY, N.; ATTIA, A. S. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 33, p. 1-15, 2018.

ELIOPOULOS, G. M.; MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. T. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254 -1263, 2018.

EUROPEAN COMMISSION WEBSITE. **Commission Recommendation on the definition of nanomaterial**, 2011. Disponível em:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm.

Acesso em: 26 de setembro de 2018.

- ESPOSITO, S. et al. Diagnosis and management of skin and soft-tissue infections (SSTI). A literature review and consensus statement: an update. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 4, p. 1-18, 2017.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Agência de Vigilância Sanitária, 5 ed., v. 1, Brasília, 2010.
- FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. P. Review approaches to dispersing medical biofilms. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 1-16, 2017.
- FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.
- FUKUSHIMA, K. et al. Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 1, p. 7-21, 2011.
- GALLET, R.; KANNOLY, S.; WANG, I. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 181-197, 2011.
- GHANEM, O. B. et al. Study of the antimicrobial activity of cyclic cation-based ionic liquids via experimental and group contribution QSAR model. **Chemosphere**, v. 195, p. 21-28, 2018.
- GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D.G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 129-136, 2014.
- GOUVEIA, W. et al. Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. **Chemosphere**, v. 104, p. 51-56, 2014.
- GRANJA, A. et al. EGCG intestinal absorption and oral bioavailability enhancement using folic acid-functionalized nanostructured lipid carriers. **Heliyon**, v. 5, p. 1–6, 2019.
- GREWAL U.S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of non-fermenting gram-negative Bacilli at a Tertiary Care Hospital in Patiala, India. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**, v. 24, n. 2, p. 121-125, 2017.
- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 24-253, 2011.
- GROSS, M. Revived interest in bacteriophages. **Current Biology**, v. 21, n. 8, p. 267-270, 2011.
- GURIKOV, P.; SMIRNOVA, I. Non-conventional methods for gelation of alginate. **Gels**, v. 4, n.14, p. 1-14, 2018.
- HAJFARAJOLLAH, H. et al. Toxicity of various kinds of ionic liquids towards the cell growth and end product formation of the probiotic strain, *Propionibacterium freudenreichii*. **Royal Society of Chemistr**, v. 4, p. 13153-13160, 2014.

HAKKARAINEN, T. W. et al. Necrotizing soft tissue infections: Review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes. **Current Problems in Surgery**, v. 51, n. 8, p. 344-362, 2014.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018a.

HARADA, L. K. et al. Insights into protein-ionic liquid interactions aiming at macromolecule delivery systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 1983-1998 2018b.

HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.

HOWARD-VARONA, C. et al. Regulation of infection efficiency in a globally abundant marine Bacteriodes virus. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 11, p. 284-295, 2017.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods**. Geneva, 2009.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

JODAR, K. S. et al. Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 104, n. 7, p. 2241-2254, doi: 10.1002/jps.24475.

JORGE, L. R. R. **(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético à base de nanocelulose de origem microbiana e líquido iônico, para estabilização e entrega transdérmica de insulina**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2019.

JÚAREZ, P. C. et al. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 31-34, 2015.

KALLURI, H.; BANGA, A. K. Transdermal delivery of proteins. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 431- 441, 2011.

KEEN, E. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. **Bioessays**, v. 37, n. 1, p. 6-9, 2015.

KHAN, S. et al. Insight into hydrogels. **Journal Designed Monomers and Polymers**, v. 19, n. 5, p. 456-478, 2016.

KUREK, A. et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v. 6, artigo número 34338, 2016.

LEONG, H. N. et al. Management of complicated skin and soft tissue infections with a special focus on the role of newer antibiotics. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1959-1974, 2018.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, p. 34-44, 2019.

LI, J.; MOONEY. D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Material**, v. 1, artigo número 16071, 2016.

LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 3 p. 162-173.

LOUREIRO, R. J. et al. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOURENÇO, A. R. N. **Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios**. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, Portugal, 2013.

MALHEIRO, L. F et al. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 2, p. 195-205, 2017.

MALIK et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 100-133, 2017.

MANJULA, B. et al. Preparation and characterization of sodium alginate-based biohydrogels and their in vitro release studies. **Advances in Polymer Technology**, v. 32, n. 2, p. 1-12, 2013.

MAVER, T. et al. Advanced therapies of skin injuries. **Wien Klin Wochenschr**, v. 127, n. 5, p. 187-198, 2015.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C.M. Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 3180-3190, 2014.

MARTINS, M. F. R. M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-53, 2002.

MBONYIRYIVUZE, A. et al. Natural Dye Sensitizer for Grätzel Cells: Sepia Melanin. **Physics and Materials Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2015.

MCCONNELL, J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p.130-155, 2013.

- MIRZAEI, M. K.; NILSSON, A. S. Isolation for phage therapy. A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PloS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-13, 2015.
- MONTI, D. et al. Ionic liquid as potential enhancers for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 516, p. 45-51, 2017.
- MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 539, p.1-24, 2019.
- NARAYANASWAMY, R.; TORCHILIN, V. P. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. **Molecules**, v. 24, n. 603, 2019.
- NÓBREGA, M. S.; CARMO FILHO, J. R.; PEREIRA, M. S. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n.3, p. 696-70, 2013.
- NOVAIS, C.S. **Caracterização estrutural por difusão de Raios-X e estudo de atividade citotóxica de complexo de platina**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- OTTO, M. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, n. 1, p. 175-188, 2013.
- PARASION, S. et al. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 137-145, 2014.
- PEREIRA, R. et al. Development of novel alginate based biohydrogel films for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 221-230, 2013.
- PETRI, V. **Dermatologia prática**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2009.
- PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-23, 2018.
- PIRES, D. C. et al. Bacteriophage isolation, production and titration. **3 rd International hands-on PHAGE. Braga- Portugal**, 2017.
- PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparation of new nanocomposites containing nanoemulsions of melaleuca, copaíba and lemon oil for application as biomaterial. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.
- POPA, O.; LANDAN, G.; DAGAN, T. Phylogenomic networks reveal limited phylogenetic range of lateral gene transfer by transduction. **The ISME Journal**, v. 11, p. 543-554, 2017.
- QADIR, M.I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2018.

RAGHEB, M. R. et al. Inhibiting the evolution of antibiotic resistance. **Molecular Cell**, v. 73, n. 1, p. 157-165, 2019.

RIOS, A. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: *State-of-the-art*. **Microbiological Research**, v. 191, p. 51-80, 2016.

RUELA, A. L. M. et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 527-544, 2016.

SALERNO, C.; CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 986-993, 2010.

SANTOS, S. B. et al. Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: implications of the host bacterial growth rate in modelling, **PLoS ONE** (Public Library of Science), v. 9, n. 7, p. 1-15, 2014.

SCHERRER, P. Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen, **Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften**, v. 2, p. 98-100, 1918.

SCHOELLHAMMER, C. M.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 3, p. 393-407, 2014.

SEBENY, P. J.; RIDDLE M. S.; PETERSEN K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 444-449, 2008.

SHAO, Y.; WANG, I. N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time, **Genetics**, v. 180, p. 471-482, 2008.

SHARMA, C. et al. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, artigo número 237, 2018.

SHEN, G. H. et al. Isolation and characterization of fkm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE** (Public Library of Science), v. 7, n. 10, p. 1-8, 2012.

SIDAT, Z. et al. Ionic liquids as potential and synergistic permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 96, p. 1-21, 2019.

SILNA, E. A. et al. Biohydrogels in topical drug delivery: A review. **International Journal of Innovative Drug Discovery**, v. 6, n. 2, p. 87-93, 2016.

SILVA, D. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 4, p. 240-245, 2017.

SJOVALL, P. et al. Imaging the distribution of skin lipids and topically applied compounds in human skin using mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 8, artigo número 16683, 2018.

SOUSA, A. M. **Bacteriófagos: Características gerais, utilidades e aplicação biotecnológica. Monografia para obtenção de título de Especialista.** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

STEPHENS, P. R. S. et al. **Virologia.** In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2013. 306 p. ISBN: 978-85-98768-41-0.

STEVENS, D. L.; BRYANT, A. E. Necrotizing soft-tissue infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 2253-2265, 2017.

SUBRAMANIAN, K. G.; VIJAYAKUMAR, V. Hidrogels: classification, synthesis, characterization and applications. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, p. 3879-3892, 2015. <http://dx.doi.org/10.1081/E-EBPP-120049894>

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-659, 2001.

TANGCHAROENSATHIEN, V.; CHANVATIK, S.; SOMMANUSTWEECHAI, A. Complex determinants of inappropriate use of antibiotics. **Bull World Health Organ**, v. 96, n. 2, p. 141-144, 2018.

WACLAW, B. Evolution of drug resistance in bacteria: Biophysics of infection. In: LEAKE, M. C. (Org.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer, v. 915, p. 49-67, 2016.

WANG, C. et al. Ionic liquid – microemulsions assisting in the transdermal delivery of Dencichine: Preparation, in-vitro and in-vivo evaluations, and investigation of the permeation mechanism. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1-2, p. 120-131, 2018.

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em 10/07/2019 às 15:50.

WILLIAMS, H. D. et al. Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: structure optimization and in vivo evidence of utility. **Chemical Communications**, v. 50, n. 14, p. 1688-1690, 2014.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131-139, 2018.

XU, F.; LU, T. J. Skin structure and skin blood flow. In: XU, F.; LU, T. J. (Org) **Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain**, ed. 2011, Springer, p. 7-19, 2011.

YANG, Y. et al. Characterization of the first double-stranded RNA bacteriophage infecting *Pseudomonas aeruginosa*, **Scientific Reports**, v. 6, n 38795, p. 1-17, 2016.

ZAKREWSKY, M. et al. Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 37, p. 13313-13318, 2014.

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611-2617, 2006.

ZHOU, G.; LUO, Z.; FU, X. Preparation of starch nanoparticles in a water-in-ionic liquid microemulsion system and their drug loading and releasing properties. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8214-8220, 2014.