

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Desenvolvimento e caracterização de uma nova
formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas
Múltiplas**

Pedro Miguel Gomes Guiomar

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas**

2020

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Desenvolvimento e caracterização de uma nova
formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas
Múltiplas**

Pedro Miguel Gomes Guiomar

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação da Doutora Cláudia Nunes, Professora
Doutora Salette Reis e Professora Doutora Ana Grenha

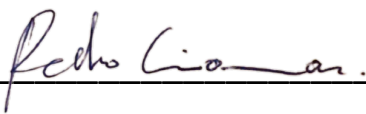
2020

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas.

Declaração de Autoria do Trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



Faro, 03 de Julho de 2020

©2020 Pedro Guiomar

A Universidade do Algarve tem o direito, perpetuo e sem limites geograficos, de arquivar e publicitar este trabalho, atraves de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar atraves de repositorios cientificos e de admitir a sua copia e distribuicao com objetos educacionais ou de investigacao, nao comerciais, desde que seja dado credito ao autor e editor.

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Agradecimentos

Quando ingressei no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas aprendi desde cedo que “o curso não se faz sozinho”. Ao longo destes anos, muitas foram as pessoas que se cruzaram no meu caminho e que de certa forma contribuíram para o meu sucesso. Não há palavras suficientes para expressar o meu apreço.

Começo por agradecer aos meus pais e às minhas duas irmãs por estarem sempre presentes, pelo apoio e motivação e porque sem eles nada seria possível!

Um especial agradecimento à doutora Cláudia Nunes, por ser incansável ao longo deste projeto, pela orientação, pelas críticas, pela paciência, pela motivação, pelo à-vontade com que me deixou, pelo tempo despendido, por acreditar em mim e acima de tudo, pela amizade.

À doutora Salette Reis, por toda a ajuda prestada, todas as opiniões e todos os desafios e por me ter demonstrado ser uma referência no mundo da nanotecnologia. Ficarei eternamente grato por me ter permitido o desenvolver deste projeto no seu grupo de investigação, Biofísica Molecular e Biotecnologia (MB²), na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À doutora Ana Grenha, por todas as ajudas e por sempre mostrar disponível a transmitir todos os ensinamentos necessários.

A todos os membros que integram o MB², em especial à Andreia Marinho e Ana Isabel, por toda a disponibilidade, pelo positivismo e alegria. Obrigado por me receberem de braços abertos. Foi bom regressar à Invicta!

À Versus Tuna – Tuna Académica da Universidade do Algarve, por todos os momentos hilariantes, por todas as aventuras e por me dar a conhecer Portugal de sul a norte.

À cidade de cetim e aos novos amigos, que tornaram esta meia década nos melhores anos da minha vida. Em especial à Carolina, por me ter acompanhado e incentivado ao longo desta etapa da minha vida com muita paciência, amor e carinho.

Aos amigos de sempre, Carlos, Zé e Mariana, que após esta ausência de 5 anos, continuam a meu lado.

A todos, o meu obrigado!

Pedro Miguel Gomes Guiomar

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Resumo

O número de infecções bacterianas nos últimos anos tem vindo a aumentar acentuadamente devido a uma subida brusca na quantidade de bactérias multirresistentes. Todos os anos, um número estimado de dois milhões de pessoas sofre de infecções provenientes de agentes bacterianos. Entre estas, cerca de vinte e três mil morrem devido a complicações resultantes da resistência bacteriana.

Deste modo, a procura e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos tem vindo a tornar-se uma prioridade. No contexto desta busca, a bacitracina surge como uma alternativa. Um antibiótico esquecido e com enorme potencial no combate a infecções bacterianas resistentes a outros antibióticos, a bacitracina é um fármaco hidrofílico polipeptídico com ação antibiótica, principalmente em bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*. É utilizada na forma de pomada no tratamento de infecções oculares e de infecções localizadas na pele.

Por outro lado, a bacitracina é um antibiótico com um elevado nível de nefrotoxicidade, tendo vindo a ser substituída por outros antibióticos menos tóxicos.

Desta forma, as nanopartículas lipídicas múltiplas (MLN) surgem como forma de contornar esta situação. Estas permitem criar sistemas de libertação controlada de fármacos, tornando possível ultrapassar alguns dos problemas que se encontram nos fármacos usados de modo dito convencional.

Assim, a presente dissertação tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma nova formulação de bacitracina baseada em nanopartículas lipídicas do tipo MLN, para administração tópica.

Palavras – chave: bacitracina, libertação controlada de fármacos, nanopartículas lipídicas múltiplas: MLN.

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Abstract

In recent years, the number of bacterial infections has increased due to a sharp rise in the amount of multi-resistant bacteria. Last year, approximately two million people were infected with bacterial agents. Among these, about twenty-three thousand died due to complications caused by bacterial resistance.

Therefore, the research and development of new antibacterial agents has become a priority. In the context of this search, bacitracin comes in as an alternative. A long-forgotten antibiotic with enormous potential to fight antibiotic-resistant bacterial infections, bacitracin is a hydrophilic polypeptidic drug with antibiotic action, mainly in Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*. It is used in the form of ointment to treat eye and localized skin infections.

On the other hand, bacitracin is a highly nephrotoxic antibiotic, which has often been replaced by other less toxic antibiotics.

Multiple lipid nanoparticles (MLN) appear as a way to get around this situation. These allow the creation of controlled drug delivery systems, which allow to overcome some of the problems that can occur with usage of drugs in a so-called conventional fashion.

Thus, this dissertation has as its main goal the development of a new application of bacitracin applied in multiple lipid nanoparticles, for topical administration.

Keywords: bacitracin, controlled drug delivery systems, multiple lipid nanoparticles: MLN.

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Índice

1	Introdução Teórica	1
1.1	A PELE	2
1.1.1	DEFINIÇÃO	2
1.1.2	HISTOLOGIA	2
1.1.3	PRINCIPAIS FUNÇÕES	3
1.1.4	ABSORÇÃO NA PELE	4
1.1.5	INFEÇÕES DA PELE	6
1.2	FÁRMACO: BACITRACINA	7
1.2.1	ESTRUTURA E METABOLISMO DE AÇÃO	8
1.2.2	TERAPÊUTICA	9
1.3	NANOTECNOLOGIA	9
1.3.1	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	10
1.3.2	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	11
1.3.3	TRANSPORTADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	13
1.3.4	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MÚLTIPLAS	14
2	Motivação	16
3	Objetivo	19
4	Parte Experimental e Métodos	21
4.1	REAGENTES E SOLVENTES	22
4.2	MATERIAIS	22
4.3	EQUIPAMENTOS	23
4.4	PRODUÇÃO	24
4.4.1	PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MÚLTIPLAS	24

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

4.5	MÉTODOS.....	25
4.5.1	ESTUDOS PRELIMINARES DE FORMULAÇÃO	25
4.5.2	DESENHO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX – BEHNKEN.....	25
4.5.3	TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.....	28
4.5.4	POTENCIAL ZETA.....	29
4.5.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	30
4.5.6	CAPACIDADE DE CARGA	30
4.5.7	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	31
4.5.8	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	32
4.5.9	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO	33
5	Resultados e Discussão	35
5.1	ESTUDOS PRELIMINARES DE FORMULAÇÃO	36
5.2	OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO.....	38
5.2.1	DESENHO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX – BEHNKEN.....	38
5.3	ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	44
5.4	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO	46
5.5	ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	47
5.5.1	LINHA CELULAR L929	47
5.5.2	LINHA CELULAR HACAT.....	49
6	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	50
7	Referências Bibliográficas	54
8	Anexos.....	60
8.1	RETA DE CALIBRAÇÃO DA BACITRACINA.....	61
8.1.1	TAXA DE ENCAPSULAÇÃO	61
8.1.2	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO E PERMEAÇÃO A PH 7.4	61

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

8.1.3	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO A PH 5.5	62
-------	--------------------------------------	----

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Vias de absorção percutânea. Adaptado [9]	5
Figura 1.2 – Estrutura química da Bacitracina [15,16]	8
Figura 1.3 – Modelos teóricos de possíveis estruturas de SLN. Os quadrados pretos representam as moléculas de fármaco. [30]	12
Figura 1.4 – Representação esquemática das diferenças entre a) estrutura da matriz cristalina perfeita das SLN, b) estrutura da matriz imperfeita das NLC. [20]	13
Figura 1.5 – a) imagem obtida por TEM da estrutura da MLN, amplificado: 100,000 X; b) imagem ilustrativa da estrutura da MLN. Adaptado [31]	14
Figura 4.1 – Diagrama da produção de Nanopartículas Lipídicas Múltiplas (MLN).	24
Figura 4.2 – Arranjo do desenho experimental do tipo Box-Behnken para 3 fatores [40]	26
Figura 4.3 – Diagrama de montagem de uma Célula de Difusão de Franz [22].	33
Figura 5.1 – Influência dos lípidos sólidos no diâmetro médio das partículas, polidispersão, capacidade de carga (CC) e eficiência de encapsulação (EE). (média \pm SD; n = 3). As barras de cor, cinzento-claro correspondem à polidispersão e CC. As barras de cor, cinzento-escuro correspondem ao tamanho e EE.	37
Figura 5.2 – Gráficos de superfície e resposta apresentando duas variáveis dependentes e o efeito do fator a) tamanho (nm); b) polidispersão; c) potencial zeta (mV); d) eficiência de encapsulação (%); e) capacidade de carga (%).	41
Figura 5.3 – Representação gráfica dos estudos de libertação <i>in vitro</i> da bacitracina encapsulada (MLN – Bac) utilizando como meio PBS a pH 7.4 e tampão acetato a pH 5.5. (média \pm SD; n = 3)	45
Figura 5.4 – Representação gráfica dos resultados obtidos através dos estudos de permeação <i>in vitro</i> . Como barreira de permeação foi utilizado pele da orelha de porco, pH 7.4 e uma temperatura de 37 °C.	47
Figura 5.5 – Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efectuados com a linha celular L929, usando diferentes concentrações de MLN – Placebo, MLN – Bac e	

Bac – livre. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável de viabilidade celular recomendando pela ISO. (média \pm SD; n = 3)..... 48

Figura 5.6 – Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efectuados com a linha celular HaCaT, usando diferentes concentrações de MLN – Placebo, MLN – Bac e Bac – livre. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável de viabilidade celular recomendando pela ISO. (média \pm SD; n = 3)..... 49

Figura 8.1 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação de Bacitracina nas NP. 61

Figura 8.2 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação a pH 7.4, *in vitro*, para a Bacitracina nas NP e para a Bac – livre. 62

Figura 8.3 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação a pH 5.5, *in vitro*, para a Bacitracina nas NP e para a Bac – livre. 63

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Infecções cutâneas e o respetivo agente patogénico envolvido.	7
Tabela 4.1 – Designação do grau de pureza e marca dos reagentes utilizados.	22
Tabela 4.2 – Registo do modelo e marca dos materiais utilizados.	22
Tabela 4.3 – Registo do modelo e marca dos equipamentos utilizados.	23
Tabela 4.4 – Valor real pesado para cada variável independente, em cada formulação de MLN – Bac, após a aplicação do modelo matemático.	27
Tabela 5.1 – Resultados obtidos nas diversas formulações, através da correlação das variáveis independentes.	39
Tabela 5.2 – Valor previsto para cada variável independente e dependente e intervalos de confiança previstos pelo modelo experimental do tipo Box – Behnken.	42
Tabela 5.3 – Valor de cada constituinte da formulação otimizada de MLN – Bac.	42
Tabela 5.4 – Dados obtidos na caracterização das nanopartículas lipídicas múltiplas adquiridos, através da técnica de DLS. (média ± SD; n = 6)	43
Tabela 5.5 – Valores de eficiência de encapsulação e de capacidade de carga por medição indirecta de UV – Vis da formulação de nanopartículas. (média ± SD; n = 6).	44
Tabela 6.1 – Formulações baseadas na nanotecnologia, de Bacitracina, descritas na literatura.	51

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Abreviaturas e símbolos

Abs	Absorvância
Bac	Bacitracina
CC	Capacidade de Carga
DLS	Dispersão dinâmica da luz, do inglês “dynamic light scattering”
EE	Eficiência de encapsulação
ELS	Dispersão de luz eletroforética, do inglês “electrophoretic light scattering”
LNP	Nanopartículas lipídicas
MLN	Nanopartículas lipídicas múltiplas, do inglês “multiple lipid nanoparticles”
MTT	Brometo de azul de tiazolil tetrazólio
NLC	Transportadores lipídicos nanoestruturados, do inglês “nanostructured lipid carriers”
NP	Nanopartículas
PBS	Solução de tampão fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão, do inglês “polydispersity index”
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês “solid lipid nanoparticles”
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês “transmission electron microscopy”
UV	Ultravioleta
ZP	Potencial Zeta, do inglês “zeta potential”

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

1 Introdução Teórica

1.1 A PELE

1.1.1 DEFINIÇÃO

A pele é o maior e mais versátil órgão do nosso corpo, é uma membrana heterogênea: lipofílica na superfície e hidrofílica nas suas camadas mais profundas [1]. Cobre toda a superfície do corpo e está em contacto direto com o meio ambiente [1,2]. É um órgão muito complexo devido à sua histologia e isso é traduzido nas suas funções multifacetadas de extrema importância para a sobrevivência e o bem-estar humano [1].

Estas funcionalidades da pele levam a pensar na necessidade de estudar as suas características de forma a utilizá-la para fins terapêuticos. Neste sentido, as vias de entrada de fármacos na pele, bem como a penetração percutânea, a retenção na pele e a sua biodisponibilidade, são alguns aspetos importantes que precisam de ser estudados [1].

1.1.2 HISTOLOGIA

A pele divide-se em três camadas primárias: epiderme, derme e hipoderme [3]. A epiderme é a camada mais superficial, não vascular e composta por epitélio queratinizado estratificado escamoso com diferentes tipos de células e camadas celulares [4]. A porção mais externa da epiderme, o estrato córneo, é a principal barreira de penetração que protege o corpo da perda excessiva de água e danos causados por agentes tóxicos e microorganismos do meio ambiente [2,3]. Essa camada consiste em células achatadas e mortas, embebidas numa bicamada lipídica [2,5].

Sob a epiderme encontra-se a derme, caracterizada por tecido conjuntivo irregular denso e responsável pela força e flexibilidade da pele [4]. Esta camada contém terminações nervosas, glândulas sudoríparas, folículos capilares e vasos sanguíneos.

Por fim, localizada abaixo da derme encontra-se a hipoderme ou camada subcutânea de tecido conjuntivo frouxo, que faz a ligação da derme aos órgãos subjacentes [4,5]. Esta zona é composta por duas camadas separadas por uma fáscia superficial: a camada areolar (mais próxima da derme) que é formada por adipócitos

globulares dispostos verticalmente e a camada lamelar (camada mais profunda), onde as células são de menor tamanho e dispostas horizontalmente e os vasos sanguíneos são maiores. Estas camadas de tecido adiposo que modelam o corpo de forma variável servem como fonte de energia e na regulação da temperatura protegendo contra o frio [4].

1.1.3 PRINCIPAIS FUNÇÕES

A pele é um órgão essencial para a sobrevivência humana já que atua como barreira protectora contra agentes do meio ambiente como bactérias e vírus, sendo também responsável por várias funções essenciais, como as seguintes:

- **Proteção:** o epitélio estratificado queratinizado da epiderme é a primeira linha de defesa contra agentes abrasivos externos ao organismo, esta também forma uma barreira protectora a microrganismos estranhos. Para além disso, a epiderme apresenta uma estrutura hidrofóbica que permite minimizar as perdas de fluídos corporais por desidratação. Devido à exposição diária a raios ultravioleta (UV), a pele, de forma a proteger-se aumenta a síntese de melanina.

- **Percepção sensorial:** as numerosas terminações nervosas encapsuladas e livres na pele respondem a estímulos de temperatura (calor e frio), toque, dor e pressão.

- **Termorregulação:** a pele transpira para arrefecer o organismo e contrai o sistema vascular na derme para conservar o calor. Por exemplo, devido ao exercício físico ou ambiente quente há um aumento da temperatura corporal. De forma a regular este aumento, para além da transpiração, ocorre uma maior dilatação dos vasos sanguíneos para facilitar a perda de calor. Por outro lado, em temperaturas baixas, o calor é conservado pela constrição dos vasos sanguíneos e pela diminuição do fluxo sanguíneo para a pele; esta constrição é feita pelas glândulas sudoríparas em conjunto com os vasos sanguíneos e tecido adiposo.

- **Síntese de vitamina D:** a vitamina D é essencial para que ocorra absorção de cálcio e fósforo na mucosa intestinal e para a formação e mineralização óssea. A síntese de vitamina D é realizada na epiderme durante a exposição da pele aos raios UV do sol.

- **Excreção:** a pele atua como um órgão excretor de substâncias não essenciais ao organismo, como por exemplo alguns resíduos catabólicos de azoto e água.

- **Armazenamento:** ocorre na hipoderme, na camada mais interna da pele, nesta existe um depósito de calorias, glicogénio e colesterol.

- **Absorção:** através da pele é possível absorver certas substâncias lipossolúveis, bem como fármacos com finalidade terapêutica.

1.1.4 ABSORÇÃO NA PELE

A importância da pele é indiscutível como via de administração de fármacos, devido à sua grande superfície e fácil acesso. A principal vantagem da terapêutica tópica, relativamente à terapêutica sistémica, reside no facto de estar indicada para situações localizadas, permitindo maior concentração local e menores efeitos sistémicos. O principal obstáculo das formulações para uso tópico é a limitação da absorção de substâncias através da pele [5,6]. Esta absorção percutânea depende não só das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também do veículo e integridade deste órgão.

O estrato córneo é o maior responsável pela limitação da absorção de fármacos; este constitui uma verdadeira barreira à passagem das substâncias para o interior do organismo [5]. A absorção percutânea de fármacos é definida como a forma como as substâncias atravessam as camadas da pele até à corrente sanguínea e linfática [7]. A difusão do fármaco até à superfície cutânea pode ser dividida em 3 etapas: penetração - consiste na passagem de uma substância pela camada córnea até ao interior do organismo; permeação - a passagem de uma substância com determinadas características e estruturas nas diversas camadas da pele (epiderme e derme); absorção - a entrada da substância para a corrente sanguínea [7,8].

Existem duas principais vias de absorção percutânea:

1. Via Transepidérmica

Via transcelular - através das células do estrato córneo; ocorre geralmente para fármacos apolares;

Via intercelular - entre as células do estrato córneo; é comum para fármacos polares e de baixo peso molecular;

2. Via Anexial

Via transfolicular - através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas.

É importante reter que variáveis como as características físico-químicas do fármaco, do veículo, as condições de aplicação, as condições da pele, e o metabolismo cutâneo influenciam a absorção percutânea [9]. Na figura 1.1 é possível observar as diversas vias de absorção na pele.

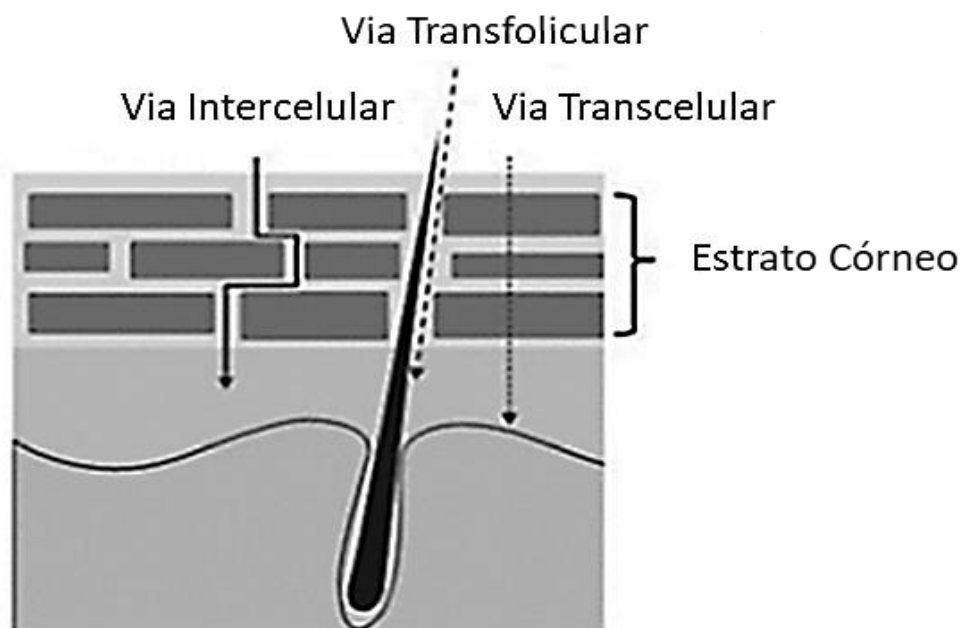


Figura 1.1 – Vias de absorção percutânea. Adaptado [9]

1.1.5 INFEÇÕES DA PELE

As infecções cutâneas são muitas vezes provocadas por uma perturbação na flora bacteriana da pele. Esta flora bacteriana é constituída essencialmente por *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes* [10]. Estes procariontes apresentam uma baixa virulência e raramente originam doenças.

Atualmente sabe-se que o pH desempenha um papel fisiológico importante no controlo microbiano, uma vez que a pH ácido existe uma inibição da colonização de agentes patogénicos, como por exemplo *Staphylococcus Aureus* [11]. Para além disso, o pH também influencia as funções da barreira cutânea, como por exemplo: na síntese, na diferenciação e renovação das células epiteliais [11].

Numa pele sã o pH “normal” é ácido e varia entre 4.1 – 5.8, embora apresente algumas variações ligeiras na face, tronco e extremidades [11]. No caso de uma pele debilitada, ou seja, que apresenta uma barreira cutânea perturbada, o pH está aumentado, promovendo a colonização de agentes patogénicos e sendo, portanto, zonas propensas a infeções [11,12].

Os principais causadores de infeções são os microrganismos que colonizam ocasional e transitoriamente a pele como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, bactérias entéricas gram-negativas e *Cândida albicans* [11,12]. Posto isto, estudos demonstraram que um pH de 7.5 na superfície da pele leva a uma melhor adesão e multiplicação de *Staphylococcus aureus* e outros agentes patogénicos promovendo assim, a sua colonização e posterior infeção cutânea [11,12].

A Tabela 1.1 mostra algumas infeções cutâneas existentes e o agente patogénico envolvido.

Tabela 1.1 – Infecções cutâneas e o respetivo agente patogénico envolvido.

Diagnóstico	Agente(s) mais provável(eis)
Impetigo não bolhoso; Ectima	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>
Impetigo bolhoso; Escarlatina estafilocócica	<i>Staphylococcus aureus</i>
Síndrome da pele escaldada	<i>Staphylococcus aureus</i>
Foliculite, Furúnculo e Antraz	<i>Staphylococcus aureus</i>
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Celulite localizada sem sinais sistémicos	<i>Staphylococcus aureus</i> ;
Piomiosite	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>

Em muitos estudos da literatura científica, é possível verificar que o *Staphylococcus aureus* é o agente bacteriano mais frequente em infeções na pele. A infeção pode ser uni ou polimicrobiana, pode ficar confinada às camadas mais superficiais da pele ou estender-se aos tecidos mais profundos, chegando mesmo à corrente sanguínea [12].

1.2 FÁRMACO: BACITRACINA

A bacitracina foi descoberta em 1945 após o isolamento dos restos de uma ferida de uma menina, Margaret Tracey. Posteriormente, os seus detritos isolados cresceram, dando origem a uma mistura de polipéptidos cíclicos relacionados, produzidos pelos microorganismos *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* [13,14].

Mais tarde, estes polipéptidos deram origem ao nome de bacitracina, e em 1948 foi aprovado o seu uso nos Estados Unidos da América, na prevenção e tratamento de infeções cutâneas localizadas, agudas e crónicas [14].

1.2.1 ESTRUTURA E METABOLISMO DE AÇÃO

A bacitracina é um fármaco hidrofílico polipeptídico com ação antibiótica [15]. Na Figura 1.2 é possível analisar a sua estrutura.

Fórmula Molecular: $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$

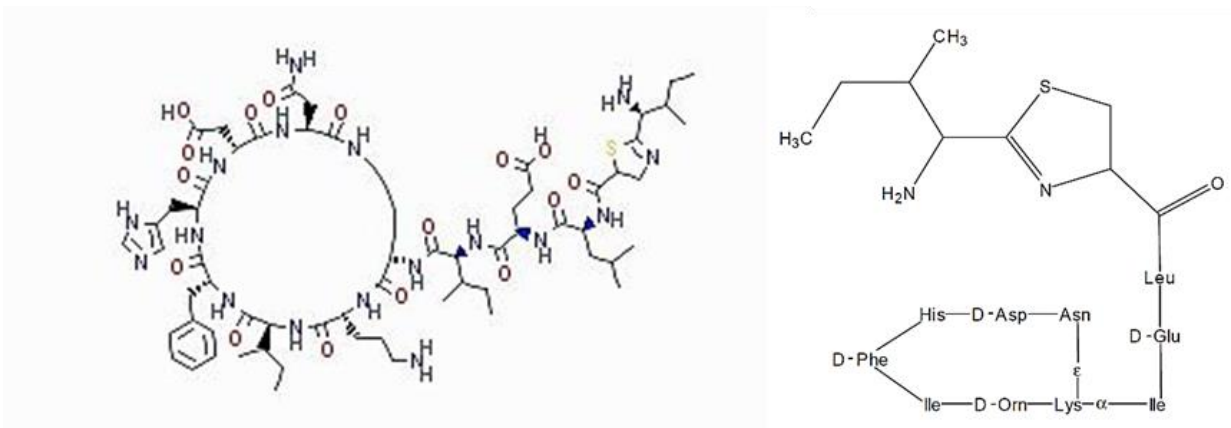


Figura 1.2 – Estrutura química da Bacitracina [15,16]

A bacitracina é absorvida maioritariamente em pele desnudada e queimada, de forma a impedir a transferência de peptidoglicano, presente na parede celular de seres procariontes, para a parede celular das células da pele [14,16]. Subsequentemente a bacitracina promove o aumento da permeabilidade da parede celular e inibe a síntese proteica, o metabolismo de ácidos nucleicos e outros processos metabólicos como a síntese de ácido fólico levando assim, à apoptose celular bacteriana [14,17].

1.2.2 TERAPÊUTICA

Este antibiótico pertence ao grupo farmacoterapêutico de medicamentos usados em afeções cutâneas, anti-infeciosos de aplicação na pele, antibacterianos [18]. Apresenta uma ação antimicrobiana contra várias bactérias gram-positivas, como *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacterium*, *Clostridium* e *Actinomyces* [14]. Alguns organismos gram-negativos, como *Gonococos* e *Meningococos* também exibem suscetibilidade [14]. Está indicada no tratamento de feridas superficiais provocadas por organismos suscetíveis. É utilizada principalmente na forma de pomada no tratamento de uma variedade de infecções oculares e localizadas da pele, assim como na prevenção de infecções de feridas em monoterapia ou numa terapêutica combinada com outros antibióticos [19,20].

1.3 NANOTECNOLOGIA

No final da década de 50, o físico Richard Feynman dirigiu-se à assembleia da sociedade americana de física, a destacar o seu mais recente projeto intitulado “Há muito espaço lá em baixo”, mostrando assim pela primeira vez, a possibilidade de manipular átomos de forma a formular novos materiais [21]. Esta palestra é por muitos considerada como sendo o ponto de partida para a nanotecnologia.

A nanotecnologia é definida como uma ciência capaz de manipular átomos e moléculas, criando novas matérias e posteriormente novos produtos à escala nanométrica [21,22].

O que torna a nanotecnologia tão interessante, e quais são as estratégias atuais na preparação de formulações com fármacos?

Uma estratégia bem conhecida é o desenvolvimento de nanopartículas para aplicações biomédicas e biotecnológicas [23]. No que respeita a área das ciências farmacêuticas, e em particular o encapsulamento de fármacos, nas últimas décadas são vários os estudos realizados em todo o mundo com o objetivo de desenvolver sistemas que permitam direcionar e controlar a libertação de fármacos [21].

O desenvolvimento de sistemas de nanoencapsulação teve um marco importante nos anos 60 na área das ciências farmacêuticas e cosmética, uma vez que possibilitou, através da utilização de nanopartículas uma libertação controlada de princípios ativos, contribuindo assim para uma melhor biodisponibilidade de alguns fármacos bem como a diminuição da respetiva dose terapêutica e toxicidade [21,22]. Esta estratégia tem sido direcionada para o uso de novas terapêuticas em várias doenças, de forma a garantir um tratamento mais eficaz e seguro [21,24]. Neste momento existem vários tipos de nanopartículas, produzidas a partir de diferentes materiais, com diferentes formas, tamanhos e aplicações. Entre estas, as nanopartículas lipídicas têm ganho grande destaque como sistemas de entrega de fármacos, devido às suas numerosas vantagens e propriedades biocompatíveis.

1.3.1 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

As nanopartículas lipídicas são constituídas por lípidos estabilizados por um ou dois tensoativos (surfactantes) e apresentam tamanhos entre 1 a 1000 nm [25,26]. A primeira geração de nanopartículas surge como uma alternativa aos tradicionais transportadores coloidais, tais como lipossomas e nanoemulsões [5,23]. As nanoemulsões apresentam uma estrutura idêntica às nanopartículas lipídicas, com exceção do núcleo, que nestas é formado por uma matriz de óleos líquidos e nas nanopartículas lipídicas por lípidos sólidos [8,26]. Esta alteração faz toda a diferença no desempenho das nanopartículas lipídicas. O facto de possuir uma matriz sólida faz com que os fármacos encapsulados estejam protegidos da degradação química e enzimática e, por outro lado, aumenta a estabilidade do sistema a longo prazo [8]. Para além disso, as nanopartículas lipídicas são biodegradáveis, não tóxicas e capazes de armazenar/libertar o fármaco por períodos de tempo longos [22].

Posto isto, dentro das nanopartículas lipídicas, existem três tipos de sistemas: as nanopartículas lipídicas sólidas (*SLN do inglês, solid lipid nanoparticles*), os transportadores lipídicos nanoestruturados (*NLC do inglês, nanostructured lipid carriers*) e as nanopartículas lipídicas múltiplas (*MLN, do inglês multiple lipid nanoparticles*). Os três tipos de nanopartículas lipídicas são classificados tendo em conta a sua estrutura interna.

No âmbito do projeto desenvolvido e descrito nesta memória, as nanopartículas de interesse são as nanopartículas lipídicas múltiplas, pelo que essas serão abordadas com mais detalhe.

1.3.2 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

As SLN são a primeira geração de nanopartículas lipídicas, sendo constituídas por uma matriz homogênea, na qual se pode localizar o fármaco ou substância bioativa. Esta característica faz com que haja um aumento do controlo da cinética de libertação dos fármacos encapsulados, levando assim a uma retardação da reação de degradação do fármaco [21,26].

Como vantagem deste tipo de nanopartículas, destaca-se a capacidade de proporcionar uma libertação controlada de fármaco encapsulado, uma boa tolerância por parte do organismo, estabilidade física e proteção do fármaco encapsulado [21,26,27].

Por outro lado, devido à sua composição e organização estrutural, estas nanopartículas apresentam uma baixa capacidade de encapsulamento de fármacos e dispersão do mesmo durante o período de armazenamento. É importante referir que estas desvantagens ocorrem num modelo de lípido sólido específico [27].

As SLN, devido à sua morfologia e metodologia aplicada na sua preparação podem dividir-se em três modelos estruturais (Figura 1.3), os quais diferem entre si na localização e distribuição do fármaco na matriz lipídica [28,29].

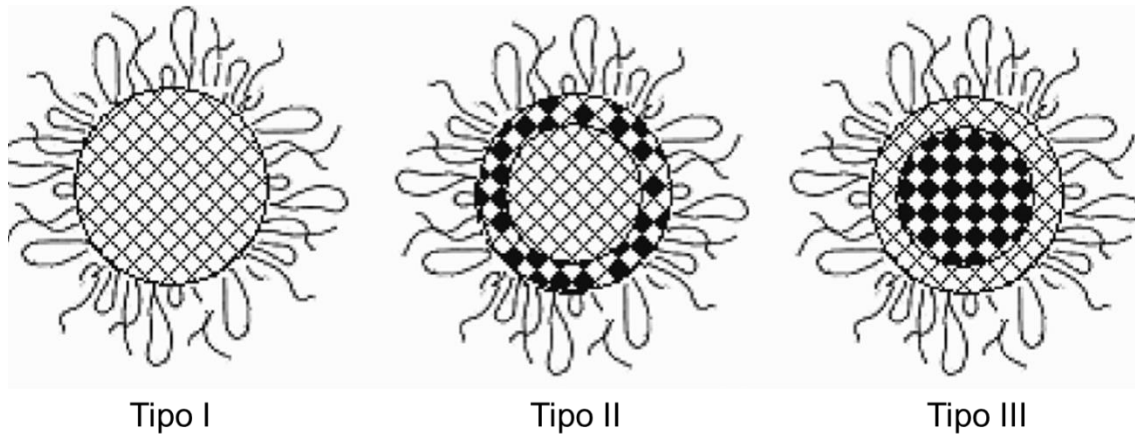


Figura 1.3 – Modelos teóricos de possíveis estruturas de SLN. Os quadrados pretos representam as moléculas de fármaco. [30]

Tipo I – *modelo de matriz homogênea*: neste modelo o fármaco encontra-se disperso no núcleo lipídico da partícula ou apresenta-se sob a forma de aglomerados amorfos. Isto acontece quando os valores do ponto de fusão do lípido e do fármaco são idênticos [29,30].

Tipo II – *modelo de parede de fármaco*: neste modelo o fármaco apresenta-se na membrana externa, cobrindo o núcleo. Isto deve-se ao facto do ponto de fusão do fármaco ser inferior ao do lípido. No processo de preparação da formulação o lípido solidifica primeiro, levando ao deslocamento do fármaco para a membrana externa. O resultado final apresenta um núcleo desprovido de fármaco envolvido por uma membrana rica em fármaco [29,30]. Este não é um modelo apropriado quando pretendemos uma libertação controlada de fármaco encapsulado, embora possa ser utilizado para obter uma libertação rápida do mesmo [28,29].

Tipo III – *modelo de núcleo de fármaco*: estas SLN são formadas quando o ponto de fusão do fármaco é superior ao ponto de fusão do lípido. No período de arrefecimento da formulação a solubilidade de fármaco no lípido vai diminuindo, desta forma,

quando o ponto de saturação é ultrapassado sucede a precipitação do fármaco, posteriormente em torno do núcleo ocorre a formação da membrana lipídica [28–30]. Este modelo é útil para quando se pretende uma libertação controlada e prolongada de fármaco.

Posto isto, é importante referir que os três modelos apresentados anteriormente são teóricos e ideais. Em paralelo, podem existir modelos mistos que são considerados como o quarto modelo [28,29]. A síntese da formulação, deste tipo de nanopartículas, está diretamente relacionada com as características físico-químicas do fármaco e dos excipientes e a sua interação [28].

1.3.3 TRANSPORTADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

As SLN são compostas apenas por um lípido sólido. De forma a melhorar alguns problemas, surgiram as NLC, chamadas de nanopartículas de segunda geração, e compostas por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos, embora os lípidos sólidos existam numa maior quantidade para formar a nanopartículas [26,28]. Estas alterações dos compostos usados nas nanopartículas fazem com que a matriz seja menos ordenada, mas por outro lado são estas alterações que promovem a encapsulação de maiores quantidades de fármaco, que podem localizar-se não apenas entre as cadeias de ácidos gordos e camadas lipídicas mas também nas imperfeições da matriz lipídica [26,28].

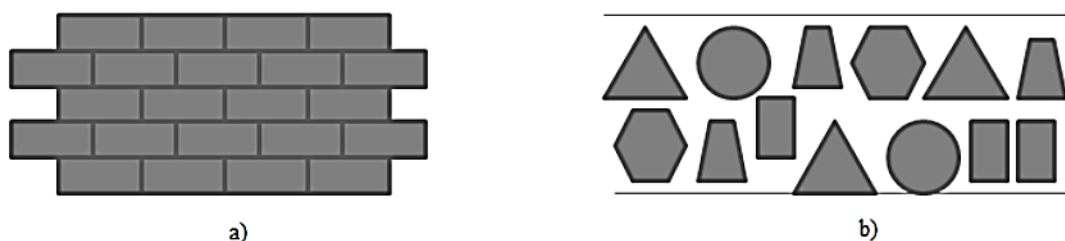


Figura 1.4 – Representação esquemática das diferenças entre a) estrutura da matriz cristalina perfeita das SLN, b) estrutura da matriz imperfeita das NLC. [20]

1.3.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MÚLTIPLAS

As nanopartículas lipídicas múltiplas (MLN) são uma nova geração de nanopartículas lipídicas para sistemas de libertação de fármacos. As MLN, a terceira geração de nanopartículas, são constituídas por uma fase lipídica e uma fase aquosa. A fase lipídica é constituída por lípidos sólidos e lípidos líquidos, que confere uma estrutura semissólida às nanopartículas à temperatura ambiente [31,32]. Devido à sua estrutura faz com que não sejam necessárias etapas adicionais de evaporação ou separação de água, etapas essas que são necessárias na maioria das formulações, o que simplifica o processo de formulação destas nanopartículas [31].

A Figura 1.5 mostra no lado esquerdo, a estrutura de MLN obtida por microscopia eletrónica de transmissão (TEM), onde é possível observar a presença dos vacúolos aquosos e a matriz lipídica, constituída por lípidos sólidos e líquidos. No lado direito, é possível observar, de forma ilustrativa, a estrutura da MLN.

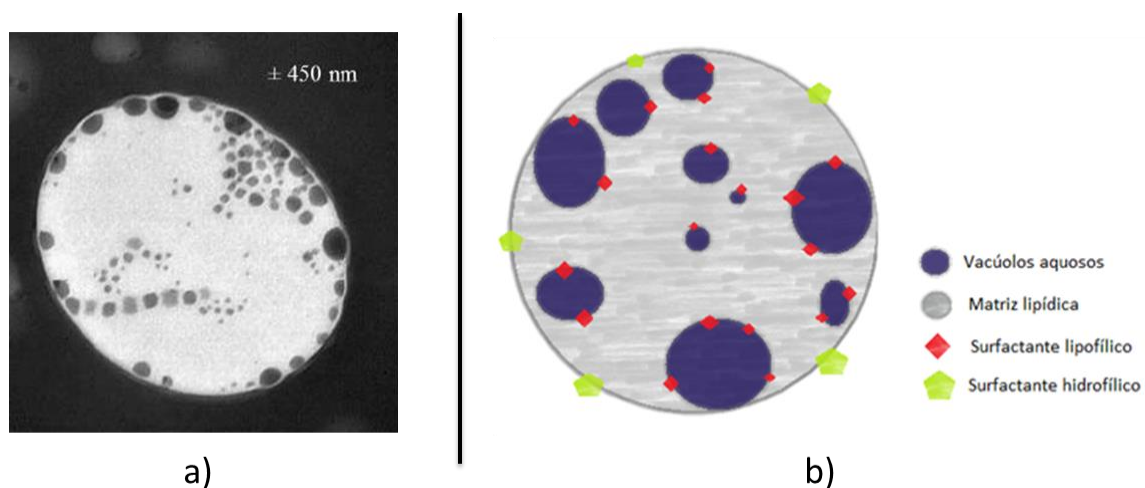


Figura 1.5 – a) imagem obtida por TEM da estrutura da MLN, amplificado: 100,000 X; b) imagem ilustrativa da estrutura da MLN. Adaptado [31]

As MLN apresentam diversas vantagens comparativamente a outras nanopartículas lipídicas, tais como: aumento da absorção e da biodisponibilidade do fármaco, libertação controlada de fármaco, proteção do fármaco contra a degradação química e enzimática e por fim, aumento de tempo no trato gastrointestinal [31].

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Adicionalmente, estas características das MLN são bastante interessantes para aplicação de uma terapêutica tópica. Estas conseguem incorporar tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Fármacos hidrofílicos ficam localizados nos vacúolos aquosos, enquanto os fármacos hidrofóbicos se reúnem na matriz lipídica. Outra possibilidade é incorporar em simultâneo fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma estrutura da MLN, uma vez que cada um se localizará no local com mais afinidade na estrutura da MLN, como referido anteriormente [31].

2 Motivação

O número de infecções bacterianas nos últimos anos tem vindo a aumentar acentuadamente devido a uma subida brusca na quantidade de bactérias multirresistentes [33]. Este problema crescente da resistência bacteriana deve-se ao consumo de antibióticos sem prescrição médica e ao uso excessivo dos mesmos em sociedades modernas ocidentais. Estudos recentes mostram que 95% das bactérias *Staphylococcus Aureus* são resistentes à penicilina, e 60% à meticilina [34]. Estas condições levam a que, todos os anos, um número estimado de dois milhões de pessoas sofra de infeções provenientes de agentes bacterianos. Entre estas, cerca de vinte e três mil morrem devido a complicações resultantes da resistência bacteriana [33,34].

Desta forma, a procura e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos tem vindo a tornar-se uma prioridade. No contexto desta busca, a bacitracina surge como uma das alternativas com enorme potencial no combate a infeções bacterianas resistentes a antibióticos, uma vez que, possui uma forte atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, sem desencadear resistência bacteriana [35,36]. Por outro lado, a bacitracina apresenta uma baixa atividade contra bactérias gram-negativas e uma elevada nefrotoxicidade, o que levou à sua substituição por outros antibióticos menos tóxicos [17,18,35].

Existe ainda um segundo problema, correspondente a uma das principais limitações derivadas da administração convencional de fármacos, que é a sua baixa biodisponibilidade. De facto, sendo a bacitracina um fármaco hidrófilico, a sua permeação e posterior libertação através da pele está dificultada.

Deste modo, a nanotecnologia surge como uma das formas de contornar estes problemas. É uma área em ascensão, proporciona alguns nanomateriais eficientes capazes de atuar no seu alvo mantendo a composição da pele inalterada. Os sistemas constituídos por uma abordagem “nano” para transporte de agentes terapêuticos permitem facilitar a libertação controlada e direcionada de fármacos, tendo assim um elevado potencial para contornar alguns dos problemas atuais nos fármacos convencionais, como por exemplo aumentar a biodistribuição do fármaco, reduzir a

sua toxicidade, de forma a direcioná-lo seletivamente para os tecidos alvo, entre outras limitações encontradas em abordagens mais convencionais [22]. Para além disso, o seu tamanho nanométrico exibe uma relação superfície-volume bastante vantajosa para integrar fármacos na sua constituição, o que facilita a interação com o organismo [13].

Desenvolvimentos recentes de nanopartículas em combinação com antibióticos demonstraram ser uma nova alternativa para diminuir a resistência bacteriana [35]. Vários estudos demonstraram que as nanopartículas são capazes de alterar a atividade da bomba de efluxo bacteriano, atividade anti-biofilme, aumentar a penetração através de estruturas de biofilmes, proteger contra a degradação enzimática e, por fim, levar à apoptose celular bacteriana [35,37]. Desta forma, juntamente com o agente farmacoterapêutico que transportam, as nanopartículas conseguem também ter uma ação benéfica para o organismo, de defesa contra agentes infecciosos [35].

A estrutura simples da bacitracina facilita a sua incorporação em nanomateriais [13]. O encapsulamento em nanopartículas ou a associação de antibióticos com “nanotransportadores” pode efetivamente melhorar as interações entre o antibiótico e o microrganismo alvo. Geralmente estas modificações traduzem-se num aumento do espectro de atividade antimicrobiana e uma diminuição da toxicidade. Ao contrário de muitos antibióticos convencionais utilizados atualmente no mercado, os sistemas de entrega de antibiótico, podem diminuir os efeitos adversos diretos e agudos [38].

Assim, a presente dissertação tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma nova formulação de bacitracina baseada em nanopartículas lipídicas do tipo MLN, para administração tópica.

3 Objetivo

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Como referido anteriormente, a presente dissertação tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma nova formulação de bacitracina baseada em nanopartículas lipídicas do tipo MLN para administração tópica.

De forma a atingir com sucesso este objetivo principal foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Otimização das nanopartículas através do desenho experimental do tipo Box-Benkhen;
- Caracterização das nanopartículas quanto à sua capacidade de carga, eficácia de encapsulação, tamanho das partículas, distribuição de tamanho, polidispersão e morfologia;
- Avaliação do perfil de libertação da bacitracina das nanopartículas em fluidos biológicos simulando o pH da pele (5.5) e do sangue (7.4);
- Avaliação da citotoxicidade e viabilidade em linhas celulares de queratinócitos e fibroblastos;
- Avaliação da permeabilidade através da pele usando células de Franz com membranas da orelha de porco.

4 Parte Experimental e Métodos

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Na Tabela 4.1 encontram-se representados todos os reagentes usados na execução deste trabalho experimental, assim como, o respectivo grau de pureza e marca.

Tabela 4.1 – Designação do grau de pureza e marca dos reagentes utilizados.

Nome	Grau de Pureza	Marca
Ácido Láurico	≥ 98%	Sigma – Aldrich
Bacitracina	–	Sigma – Aldrich
Cetil Palmitato	–	Gattefossé SAS
Compritol® 888	–	Gattefossé SAS
Miglyol®	99,2 %	Caelo
PBS	–	Sigma – Aldrich
Precirol® Ato5	–	Gattefossé SAS
Span® 80	–	Acofarma
Tween® 80	–	Sigma – Aldrich

4.2 MATERIAIS

Na Tabela 4.2 apresentam-se todos os materiais usados na execução deste trabalho, assim como, o respetivo modelo (se aplicável) e marca.

Tabela 4.2 – Registo do modelo e marca dos materiais utilizados.

Nome	Modelo	Marca
Amicon	Amicon Ultra – 4	MERK Milipore
Membrana de diálise com cut-off de 6000 a 8000 de peso molecular	Cellu.Sep T2	Frilabo
Placas de 96 poços UV	–	Corning

4.3 EQUIPAMENTOS

Na Tabela 4.3 encontra-se uma listagem de todos os equipamentos usados na realização deste trabalho experimental, assim como, o respectivo modelo e marca.

Tabela 4.3 – Registo do modelo e marca dos equipamentos utilizados.

Nome	Modelo	Marca
Placa de agitação/aquecimento	RT 15power	IKA – WERKE
Sonicador	Vibra-cell™ VCX 130	SONICS
Balança	ABT-5DM	KERN
DLS	ZetaPALS	Brookhaven
Espectrofotómetro	V-600 Spectrophotometer	JASCO
Leitor de placas	Synergy HT	BioTeck
Centrifuga	Allegra X-15R Centrifuge	BECKMAN COULTER
Centrifuga (Cultura Celular)	Heraeus Multifuge X1R	Thermo SCIENTIFIC
Câmara de Fluxo Laminar	Bio II Advance	Telstar
FTIR – ATR	FT – IR Spectrometer Frontier	PerkinElmer
Estufa (Cultura Celular)	UniEquip	Unitherm 3503-2-IR
Sistema água ultra-pura	Aruim pro	Sartorius

4.4 PRODUÇÃO

4.4.1 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MÚLTIPLAS

As MLN foram preparadas por um método de homogeneização a quente combinado com ultrasonicação. A figura 4.1 mostra de forma esquemática, o método de síntese das MLN.

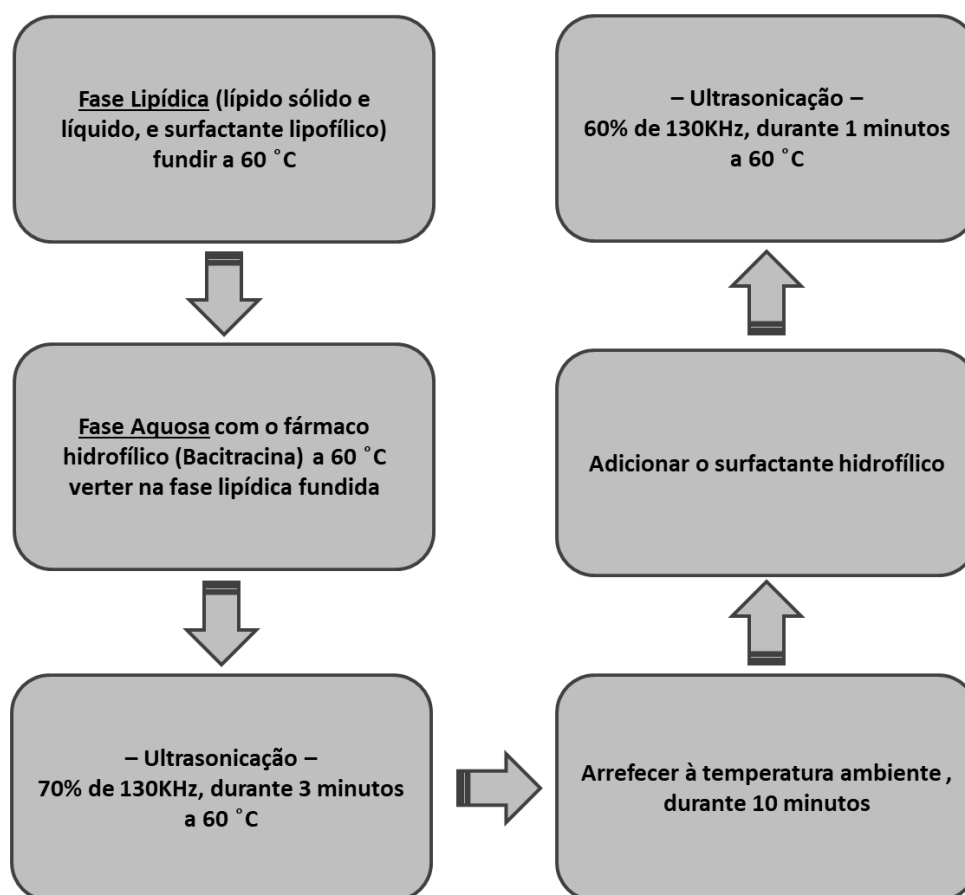


Figura 4.1 – Diagrama da produção de Nanopartículas Lipídicas Múltiplas (MLN).

A fase lipídica é constituída por um lípido sólido, um lípido líquido, o Miglyol®, um tensoativo lipofílico, o Span® 80 e por fim um excipiente, o Ácido Láurico, com atividade antibacteriana [37]. Estes compostos foram fundidos a 60 °C, esta temperatura foi escolhida de forma a garantir que todos os constituintes fiquem no estado líquido, num banho de água. A fase aquosa (água ultrapura) previamente aquecida contendo o fármaco hidrofílico bacitracina (235 mg) é vertida na fase lipídica fundida.

Depois da junção das duas fases, a mistura é sujeita a um processo de homogeneização a quente através da sonicação do tipo sonda com frequência de amplitude de 70%, 130KHz, durante 3 minutos. Após este processo, a emulsão primária deve repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após este passo, adiciona-se o surfactante hidrofílico: Tween® 80 e aquece-se novamente a formulação à temperatura de 60 °C sob o processo de sonicação do tipo sonda com frequência de amplitude de 60%, 130KHz, durante 1 minutos.

Por fim, a formulação deve repousar à temperatura ambiente até obter um aspecto semissólido (creme).

4.5 MÉTODOS

4.5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE FORMULAÇÃO

Nesta seção, tentou-se perceber o efeito do lípido sólido nas características das nanopartículas, nomeadamente no diâmetro médio das partículas, no índice de polidispersão (PI), na eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC). Portanto, de modo a avaliar a influência do lípido sólido testaram-se três lípidos sólidos diferentes: Compritol® 888, Cetil Palmitato e Precirol® Ato5. Cada formulação de MLN continha: 237,5 mg de lípido sólido e 750 mg de lípido líquido (Miglyol®). Após o processo de produção da formulação, descrito na Figura 4.1, as nanopartículas foram analisadas no dia seguinte à sua preparação.

4.5.2 DESENHO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX – BEHNKEN

A otimização desta formulação foi feita através do desenho experimental multivariado do tipo Box-Behnken. Um arranjo do tipo Box-Behnken é um modelo quadrático independente que não contém fatoriais completos ou fracionários embutidos [39,40]. A utilização deste modelo visa otimizar uma formulação, de forma multivariada, e de acordo com os parâmetros pretendidos (variáveis dependentes).

[Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas]

Para isso, este modelo utiliza a combinação de 3 fatores para cada variável independente, designados por ótimo, máximo e mínimo. A Figura 4.2 mostra um exemplo de um arranjo do tipo Box-Behnken.

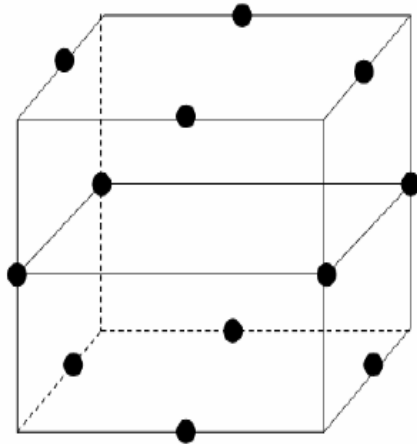


Figura 4.2 – Arranjo do desenho experimental do tipo Box-Behnken para 3 fatores [40].

Para esta otimização do tipo Box-Behnken os fatores escolhidos como variáveis independentes foram os seguintes:

- Massa de Bacitracina (mg): 100, 175, 250
- Massa de Tween® 80 (mg): 100, 175, 250
- Massa de Span® 80 (mg): 350, 400, 450

Estes fatores foram selecionados com base nos testes preliminares anteriores. Demonstraram ser os fatores críticos para obter a formulação com as características pretendidas.

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Na Tabela 4.4 é possível observar o valor real pesado para cada variável independente, em cada formulação de MLN – Bac, após a aplicação do modelo matemático.

Tabela 4.4 – Valor real pesado para cada variável independente, em cada formulação de MLN – Bac, após a aplicação do modelo matemático.

MLN	Bacitracina (mg)	Tween 80 (mg)	Span 80 (mg)
1	100	114	415
2	250	98	412
3	101	258	398
4	250	254	406
5	100	184	358
6	251	181	349
7	100	179	460
8	250	179	461
9	175	116	361
10	175	254	355
11	175	101	458
12	175	260	461
13	176	183	403
14	175	190	411
15	175	180	410

Através destes fatores pretendemos obter os melhores resultados das seguintes características (variáveis dependentes) de forma a otimizar a formulação. Definiram-se como critérios para a formulação otimizada, os seguintes parâmetros:

- **Tamanho:** deve estar dentro do intervalo de [100 – 500 nm] de forma a facilitar a permeação na pele [25];
- **Índice de Polidispersão:** o menor possível, de forma a possibilitar uma formulação o mais monodispersa possível;

- **Potencial Zeta:** o maior em módulo. Para valores acima de $|30|$ mV, considera-se que a formulação tem menor tendência de agregar, devido a repulsões electrostáticas [41];
- **Eficiência de Encapsulação:** máxima. Uma percentagem de encapsulação elevada possibilita um maior rendimento, minimizando o desperdício do fármaco a encapsular;
- **Capacidade de carga:** máxima. Maximizar a capacidade de carga, diminui a quantidade de excipientes usados, diminuindo assim também eventuais efeitos tóxicos por parte dos mesmos.

A correlação para todas as variáveis foi obtida por ajustes do tipo: “2 - way interactions (linear - quadrático)”, uma vez que apresentou o melhor R^2 comparativamente aos restantes ajustes permitidos por este tipo de desenho experimental: “no interactions”; “2 - way interactions (linear – linear)”.

4.5.3 TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

A dispersão dinâmica da luz (*DLS*, do inglês “*Dynamic Light Scattering*”) é uma técnica utilizada para medir o tamanho e a distribuição das partículas. Esta técnica é baseada na capacidade das partículas suspensas num fluido, neste caso água destilada, se difundirem aleatoriamente em todas as direções e consequentemente colidirem entre si (movimento Browniano). Este movimento faz com que a luz que incide nas partículas seja espalhada com diferentes intensidades. O princípio do método consiste em relacionar a velocidade de difusão das partículas provocada pelo seu movimento Browniano com o tamanho das mesmas. A intensidade de dispersão da luz detetada está diretamente relacionada com a velocidade de difusão das partículas e consequentemente com o tamanho destas. Assim, partículas mais pequenas apresentam uma maior velocidade.

Recorreu-se a esta técnica durante o processo de desenvolvimento das MLN, pois através desta técnica é possível determinar o tamanho e o valor da polidispersão das diversas partículas. O índice de polidispersão é um parâmetro calculado pela análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão da luz.

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas pelo seu diâmetro médio e pela sua distribuição de tamanhos. Para tal utilizou-se um analisador de tamanho de partículas (brookhaven instruments corporation; software: particle sizing v.5 brookhaven instruments; holtsville, NY, EUA), operando com um ângulo de espalhamento de 90°, a 25 °C, e índice de refração das partículas ajustado para 1.33. As medições foram efectuadas em 6 ciclos de 2 minutos cada, obtendo-se assim o tamanho médio das formulações e o índice de polidispersão. As formulações analisadas foram previamente diluídas (1:100).

4.5.4 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária do fluido à volta da partícula dispersada [41].

A carga superficial modifica a distribuição de iões envolventes, resultando assim num aumento da concentração de iões à volta da partícula, conferindo-lhe assim uma camada eléctrica dupla.

Para calcular o potencial zeta pela dispersão de luz utiliza-se o método de dispersão de luz eletroforética (*ELS, do inglês Electrophoretic Light Scattering*). Para tal, um eléctrodo é inserido na formulação criando um potencial eléctrico que atrai as partículas de carga oposta. O movimento criado por esta migração é analisado e a velocidade das partículas é medida pelo desvio da luz, possibilitando o cálculo do potencial zeta das partículas.

O potencial zeta está directamente relacionado com a estabilidade de dispersões coloidais indicando o grau de repulsão entre partículas adjacentes e similarmente carregadas em uma dispersão. Em partículas de baixo tamanho (pequenas), um potencial zeta alto confere uma maior estabilidade, o que significa que a solução ou dispersão apresenta uma baixa agregação. Por outro lado, quando o potencial é baixo, a atração excede a repulsão e desta forma, existe maior probabilidade que ocorra agregação da formulação.

Resumindo, segundo a literatura uma suspensão é reconhecida como estável se tiver um valor superior a 30 mV em módulo, assim partículas com potencial dentro deste intervalo (- 30 a + 30 mV) são consideradas como tendo maior instabilidade [41].

4.5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação (EE) da bacitracina foi obtida através de um método indireto, calculando a diferença entre a quantidade total de bacitracina usada na preparação da formulação e a quantidade de bacitracina livre que permanece na solução.

As formulações foram diluídas com água bidestilada e centrifugadas em tubos Amicom® Ultra (50,000 MWCO, MERK Milipore) (45 minutos, 4000 rpm, temperatura ambiente). Posteriormente, a bacitracina livre presente no sobrenadante foi quantificada por espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotômetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager v.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA), utilizando-se um intervalo de comprimentos de onda de 200 – 500 nm.

A fórmula para o cálculo da eficiência de encapsulação encontra-se representada abaixo:

$$EE (\%) = \frac{Bac(total) - Bac(livre)}{Bac(total)} \times 100$$

4.5.6 CAPACIDADE DE CARGA

A capacidade de carga (CC) é calculada tendo por base a eficiência de encapsulação da bacitracina, a fórmula para o cálculo encontra-se representada abaixo:

$$CC = \frac{EE \times Bac(total)}{massa\ total\ de\ formulação}$$

4.5.7 ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de libertação *in vitro* foram realizados com uma formulação de MLN-Bac e uma solução aquosa de bacitracina, usando um método de diálise com uma membrana T2. As duas amostras foram colocadas em membranas de diálise, que se deixam a hidratar de um dia para o outro. Estas membranas foram depois colocadas em contacto com um meio (que é escolhido de acordo com o meio fisiológico que se pretende estudar – PBS, para simular o pH fisiológico e tampão acetato a pH 5.5 para simular o pH normal da pele).

Durante a primeira hora, foram recolhidas alíquotas de 15 em 15 minutos, após esse tempo recolheram-se alíquotas de hora em hora. A cada alíquota recolhida repôs-se o mesmo volume com o meio que se está a usar. Devido à possível degradação dos compostos pela luz, o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

De modo a traçar o perfil de libertação, as alíquotas recolhidas são analisadas por espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotómetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager v.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA) utilizando-se uma faixa de comprimentos de onda entre os 200-500 nm, determinando-se posteriormente a taxa de libertação. De forma a perceber a absorvância máxima de bacitracina para os solventes PBS e tampão acetato, determinou-se através de estudos analíticos, o comprimento de onda de 254 nm. As retas de calibração que sustentam o respetivo resultado encontram-se nos anexos 8.1.2 e 8.1.3.

4.5.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Os estudos de viabilidade foram realizados em dois tipos de células: fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT. Estas células, L929 e HaCaT, são importantes nos mecanismos de reparação do tecido epitelial, principalmente no processo de cicatrização: inflamação, reparação e renovação [42]. Para além disso, a linha celular L929 escolhida é uma linha de referência, usualmente utilizada para testes de citotoxicidade *in vitro*. Deste modo, foram realizados estudos *in vitro* em linhas celulares L929 e HaCaT para avaliar a toxicidade das formulações, MLN – Bac. Em ambos os estudo, utilizaram-se três réplicas e todas as formulações foram produzidas na véspera do dia do ensaio.

O ensaio MTT permite determinar a viabilidade e proliferação celular através da atividade mitocondrial das células, uma vez que há conversão da solução MTT (brometo 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio) em cristais insolúveis de cor roxa (formazan) pelas enzimas oxidoredutases dependentes do NAD(P)H. Dado que para a maioria das populações celulares, a atividade mitocondrial está relacionada com o número de células viáveis, podemos assim determinar a citotoxicidade de diversos compostos [43].

As linhas celulares L929 e HaCaT foram cultivadas em meio Modified Eagle da Dulbecco (DMEM, Gibco, Lifetecnologies Corporation, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% de uma mistura de antibióticos penicilina/streptomina. As células cresceram a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de humidade, até atingir 80 – 90 % de confluência celular. Foram colocadas em placas de 96 poços 6,0 x 10⁴ células/poço. Esta concentração é determinada recorrendo à contagem das células na câmara de Neubauer.

A citotoxicidade *in vitro* de Bac – livre, MLN – Placebo e MLN – Bac foi avaliada nas linhas celulares supracitadas utilizando os ensaios MTT. Resumidamente, as células foram colocadas em placas de 96 poços a uma densidade de $6,0 \times 10^4$ célula por poço e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de amostras: MLN – Bac; MLN – Placebo e Bac – livre e deixadas a incubar durante 24h. Os poços de controlo foram tratados com volumes equivalentes de DMEM e uma solução de 2% de Triton X-100 [44]. Após este período de tempo, a densidade ótica foi lida a uma absorvância de 570 nm e 630 nm, utilizando um espectrofotómetro de microplacas (Synergy™ HT, Biotek, VT, EUA).

4.5.9 ESTUDOS DE PERMEACÃO

O método mais utilizado para a realização destes estudos de permeação é a célula de difusão de Franz. Nestes estudos, a formulação em estudo é colocada no compartimento recetor, que é mantido aproximadamente a 37 °C. A membrana é colocada sobre a abertura de célula de difusão de Franz. A formulação é aplicada sobre a membrana, no compartimento apical. As células de difusão de Franz são agitadas com um agitador magnético e as amostras são recolhidas em intervalos de tempo regulares, tipicamente ao longo de 6 – 8h. A seleção do meio recetor depende da solubilidade do fármaco. Deve evitar-se a formação de bolhas de ar entre a interface da membrana com o meio recetor.

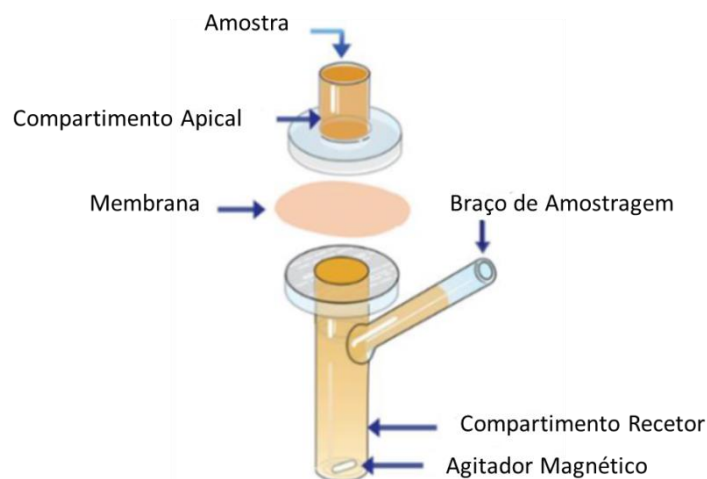


Figura 4.3 – Diagrama de montagem de uma Célula de Difusão de Franz [22].

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Nos estudos realizados, cujo esquema está representado de forma ilustrativa na figura 4.3, testaram-se formulações de bacitracina encapsuladas em NP (MLN – Bac) e soluções de bacitracina livre (Bac – livre). No compartimento apical colocaram-se 350 mg de MLN – Bac ou 274 µL de solução aquosa de bacitracina (Bac – livre). Em ambos os casos realizaram-se três réplicas. Como solução recetora utilizou-se PBS a pH 7.4 e como membrana utilizou-se pele da orelha de porco devido às semelhanças com a pele humana [45]. Os ensaios foram realizados mantendo o compartimento recetor à temperatura de 37 °C, de forma a mimetizar a temperatura corporal. Foram recolhidas amostras (1 mL) de hora a hora, durante 8 h. A taxa de permeação foi determinada recorrendo à espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotómetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager V.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA). Foram obtidos espectros na faixa de comprimentos de onda entre os 500-200 nm. O comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância de bacitracina é 254 nm. De forma a quantificar a bacitracina que permeou a membrana, foi realizada uma reta de calibração, cuja absorvância foi registada para o comprimento de onda de 254 nm em função de concentrações crescentes da mesma.

5 Resultados e Discussão

Nesta secção são apresentados e discutidos todos os resultados obtidos ao longo do projeto desenvolvido.

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE FORMULAÇÃO

No processo de seleção dos lípidos a utilizar na matriz lipídica deve-se ter em conta vários parâmetros, como: a capacidade de carga, a utilidade da nanopartícula, a miscibilidade, solubilidade do fármaco, estrutura física e química da matriz lipídica, pureza dos lípidos e o ponto de fusão [41].

Por outro lado, a escolha do tensoativo também não deve ser desvalorizada, uma vez que estes são utilizados para estabilizar a formulação. Estes podem atuar como intensificadores de permeação, desta forma prejudicando a integridade da pele e promovendo a penetração do fármaco através do estado córneo [5,41].

Deste modo, estudos demonstram que o uso de diferentes lípidos na matriz, e de diferentes concentrações de tensoativos pode alterar as propriedades das nanopartículas, em particular o seu diâmetro, morfologia e capacidade de encapsulação [41].

De modo a avaliar a influência do tipo de lípido sólido sobre o diâmetro médio das partículas, o índice de polidispersão (PI) e a EE, foram preparadas formulações contendo 750 mg de Miglyol®, utilizando diferentes combinações de lípidos sólidos. Todos os lípidos sólidos utilizados, ou seja, Compritol®888, Cetil Palmitato e Precirol® Ato5 são normalmente usados na preparação de nanopartículas utilizando técnicas baseadas em emulsão.

A percentagem de ácido láurico foi mantida constante em todas as formulações, devido a este ter propriedades antibacterianas, tendo sido por isso considerado essencial, de forma que a própria formulação tivesse por si atividade. De facto, o ácido láurico inibe o crescimento de *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* [46], podendo, portanto, ter um efeito sinérgico com o fármaco encapsulado, a bacitracina.

O ácido láurico é pouco solúvel em água o que é uma clara desvantagem para o uso deste agente antimicrobiano. Assim, fazendo parte da nanoformulação, a baixa solubilidade não constitui mais um impedimento.

A seleção de agentes emulsionantes para uma matriz lipídica, em particular, é baseada nas propriedades físico-químicas pois estes constituintes são essenciais para uma boa estabilidade das MLN, uma vez que afetam as características das nanopartículas, como por exemplo o potencial zeta e a hidrofobicidade.

A Figura 5.1 mostra os resultados obtidos relativamente ao diâmetro médio das partículas, polidispersão, CC e EE das MLN preparadas no presente estudo. É importante referir que a massa de bacitracina para as três formulações é de 100 mg.

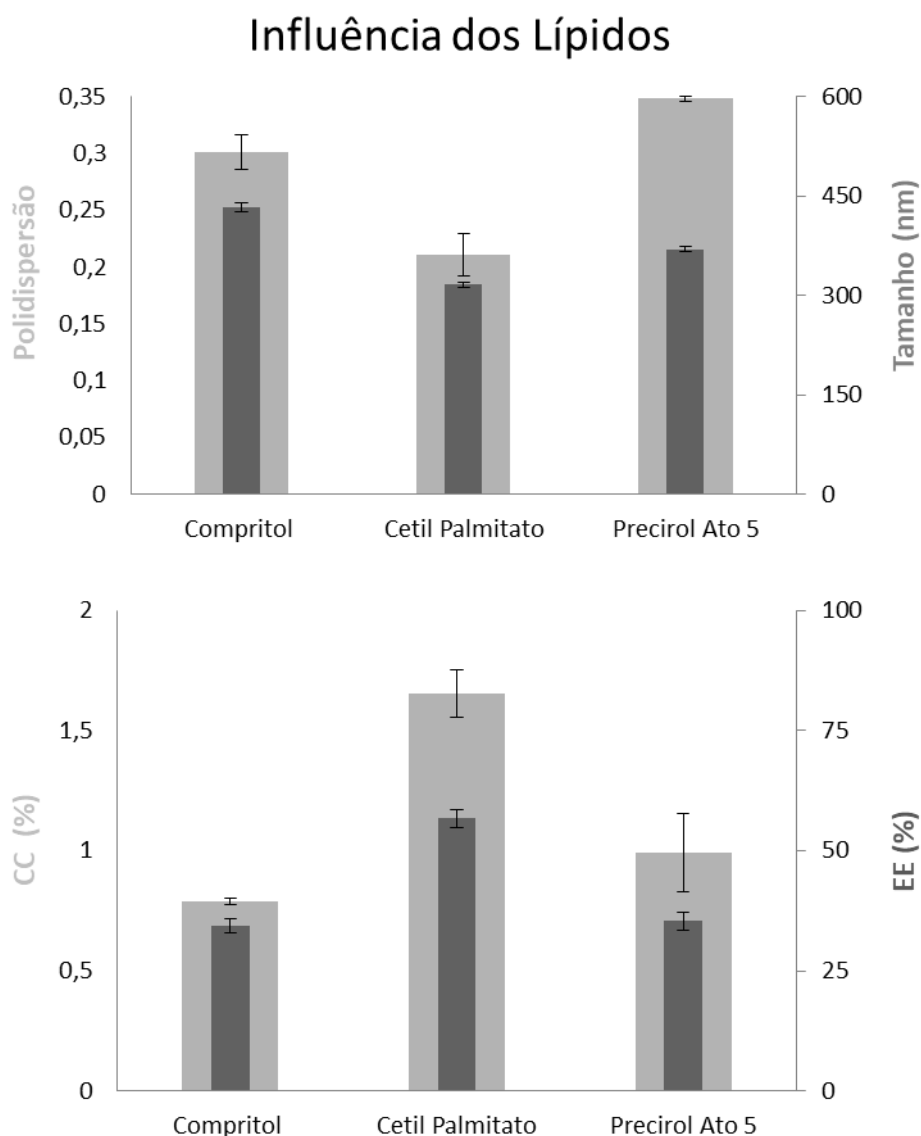


Figura 5.1 – Influência dos lípidos sólidos no diâmetro médio das partículas, polidispersão, capacidade de carga (CC) e eficiência de encapsulação (EE). (média \pm SD; n = 3). As barras de cor, cinzento-claro correspondem à polidispersão e CC. As barras de cor, cinzento-escuro correspondem ao tamanho e EE.

Após uma análise cuidada dos gráficos, apresentados anteriormente, é possível concluir que a influência dos lípidos é uma realidade. Nas formulações apresentadas anteriormente a massa do lípido sólido foi igual em todas para garantir que a concentração não tinha efeito. Através da literatura sabe-se que uma elevada concentração de lípidos resultam em partículas maiores, principalmente quando há uma baixa concentração de agentes emulsificantes [42].

É possível concluir que o lípido que mostrou melhores características foi o Cetil Palmitato, uma vez que, apresenta uma taxa de encapsulação superior, e consequentemente uma melhor capacidade de carga comparativamente às restantes formulações. Para além disto, apresentou uma polidispersão inferior, relativamente aos restantes formulações, e um tamanho de partículas na ordem dos 300 nm. Isto deve-se a uma maior afinidade dos tensoactivos a este lípido sólido relativamente aos restantes. Partiu-se então, desta constituição base, para se otimizar a formulação de MLN – Bac.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

5.2.1 DESENHO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX – BEHNKEN

Neste ponto, pretende-se expor os resultados obtidos através do modelo experimental do tipo Box – Behnken. Numa primeira fase foram elaboradas quinze formulações (tabela 4.4), de forma a perceber o impacto que teriam as variáveis independentes, nas variáveis dependentes. Os resultados encontram-se na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resultados obtidos nas diversas formulações, através da correlação das variáveis independentes.

MLN	Tamanho (nm)	População Maioritária (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)	Capacidade de Carga (%)
1	179	[145 - 212]	0,326	-40,8	42	1,53
2	191	[160 - 256]	0,352	-41,2	59	5,41
3	309	[240 - 360]	0,377	-37,3	54	1,49
4	332	[239 - 396]	0,376	-34,8	62	5,79
5	279	[217 - 341]	0,343	-34,3	49	1,86
6	248	[188 - 310]	0,357	-33,2	54	5,15
7	168	[132 - 208]	0,357	-30,5	49	1,82
8	298	[233 - 325]	0,334	-33,0	65	6,02
9	267	[202 - 342]	0,416	-34,4	57	3,90
10	288	[218 - 344]	0,358	-38,8	66	4,30
11	239	[175 - 318]	0,418	-37,5	59	4,04
12	342	[138 - 221]	0,343	-33,9	66	4,16
13	316	[197 - 355]	0,407	-46,2	66	4,37
14	233	[210 - 381]	0,408	-42,3	57	3,12
15	298	[217 - 332]	0,404	-46,7	70	4,66

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Após uma análise cuidada, dos resultados obtidos na Tabela 5.1, é possível perceber o impacto das variáveis independentes, nas variáveis dependentes.

Na Figura 5.2, numa formulação de bacitracina onde foi fixado o valor de Span[®] 80 (440 mg), é possível analisar a correlação entre as variáveis independentes e dependentes. Assim, é possível perceber o diferente impacto da quantidade de tween[®] 80 e bacitracina nas diferentes características das MLN. Dada esta variabilidade, torna-se crucial fazer uma análise multivariada baseada em modelos matemáticos. Sem estes, as correlações necessárias de forma a otimizar as características finais da formulação seriam dificilmente efetuadas.

[Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas]

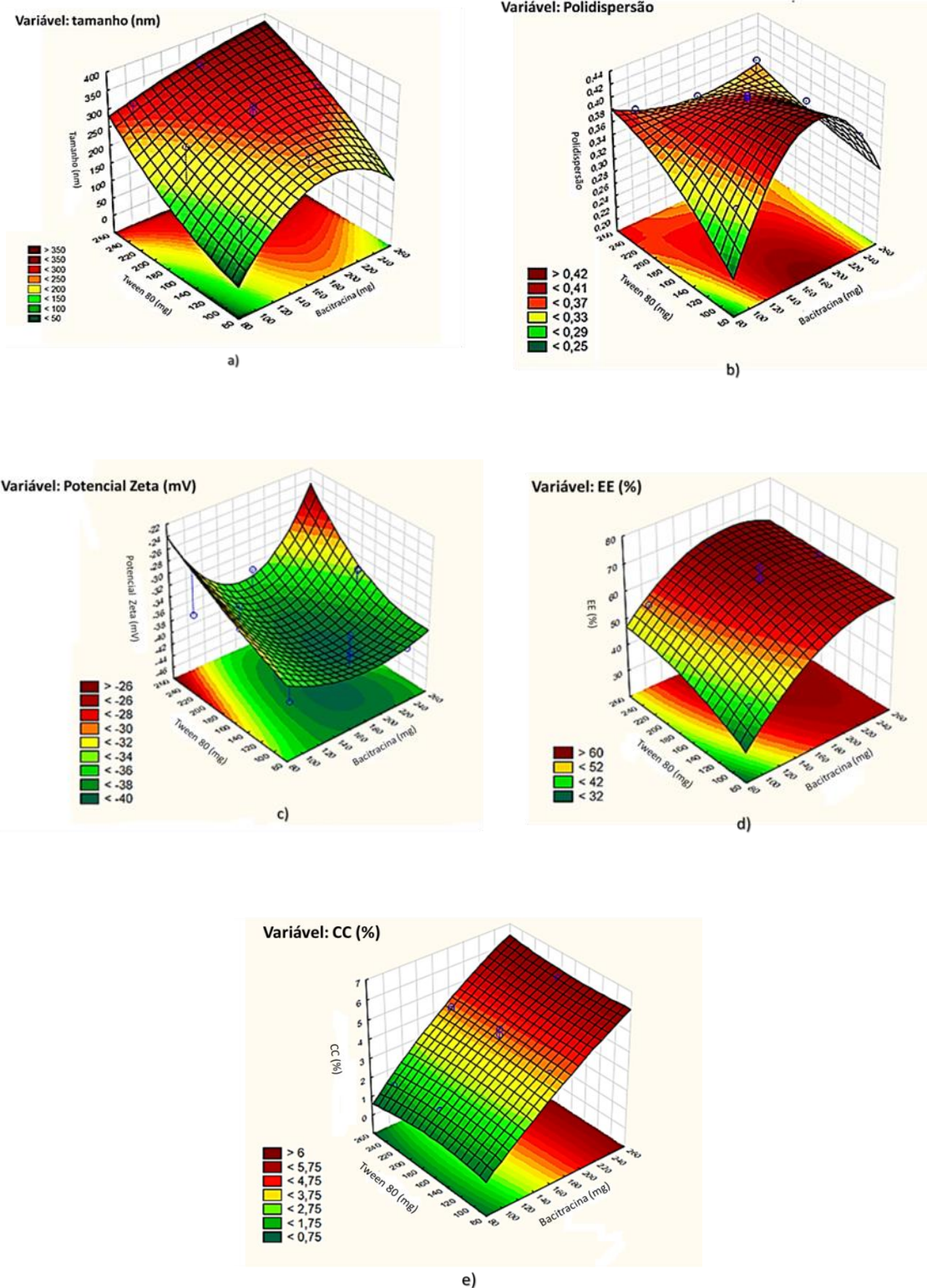


Figura 5.2 – Gráficos de superfície e resposta apresentando duas variáveis dependentes e o efeito do fator a) tamanho (nm); b) polidispersão; c) potencial zeta (mV); d) eficiência de encapsulação (%); e) capacidade de carga (%).

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Depois de aplicada a correlação “2 - way interactions (linear - quadrático) ” a todos os dados, os resultados previstos para as variáveis dependentes (tamanho, polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e capacidade de carga) e independentes (Bacitracina, Tween® 80 e Span® 80), encontram-se apresentados na Tabela 5.2. A previsão do modelo, assenta nos parâmetros de otimização apresentados na secção dos métodos.

Tabela 5.2 – Valor previsto para cada variável independente e dependente e intervalos de confiança previstos pelo modelo experimental do tipo Box – Behnken.

Variáveis independentes previstas pelo modelo					
Parâmetros	Bacitracina (mg)	Tween® 80 (mg)	Span® 80 (mg)		
	235,0	148,0	440,0		
Resposta para cada variável					
Parâmetros	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	EE* (%)	CC* (%)
	272,7	0,362	-38,44	65	5,6
Intervalos de Confiança	[140,9; 404,5]	[0,356; 0,368]	[-45,61; -31,27]	[44; 84]	[3,1; 8,0]

*Eficiência de encapsulação (EE); Capacidade de carga (CC)

Após uma análise cuidada de todos os dados adquiridos pelo desenho experimental do tipo Box-Behnken, obteve-se a formulação ideal.

Na tabela 5.3 é possível observar os valores de cada constituinte da formulação otimizada de MLN contendo bacitracina.

Tabela 5.3 – Valor de cada constituinte da formulação otimizada de MLN – Bac.

Constituintes	Especificações
Cetil Palmitato	238 mg
Ácido Láurico	50 mg
Miglyol®	750 mg
Span® 80	440 mg
Tween® 80	148 mg
Bacitracina	235 mg
Água Ultrapura	1,3 mL

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

De forma a validar a previsão do modelo, seis formulações independentes foram preparadas de acordo com o previsto pelo desenho experimental e caracterizadas.

5.2.1.1 CARATERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

De forma a validar o modelo teórico procedeu-se à caracterização de todas as variáveis dependentes.

A caracterização das nanopartículas em termos de tamanho, polidispersão e potencial zeta requer a ressuspensão e diluição da formulação. Assim, uma porção de MLN (20 mg) foi dispersa em 5 ml e seguidamente diluída em água (1:100). Após este processo, as formulações foram então analisadas por DLS e ELS.

Tabela 5.4 – Dados obtidos na caracterização das nanopartículas lipídicas múltiplas adquiridos, através da técnica de DLS. (média \pm SD; n = 6)

	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
MLN – Bac*	298 \pm 61	0,337 \pm 0,017	- 37,09 \pm 1,72

*resultados obtidos no dia seguinte à preparação da formulação.

Analisando os dados da Tabela 5.4, acima apresentada, é possível observar que quer o tamanho, quer o potencial zeta se encontram dentro dos valores previstos pelo modelo teórico. No entanto, observa-se um ligeiro desvio negativo do índice de polidispersão, quando comparado com os resultados da formulação ideal, obtida pelo Box – Behnken. Contudo, é um valor ligeiramente mais favorável que o previsto pelo modelo. De facto, a formulação tem um valor de polidispersão relativamente elevado e que decorre da existente de duas populações predominantes: população 1: 289 nm (99%) e população 2: 1265 nm (1%). No entanto, para a aplicação em causa esta é na verdade uma característica favorável, uma vez, que as partículas maiores não irão permear a pele e terão assim, um efeito nas bactérias alojadas à superfície.

Os resultados da taxa de encapsulação e de capacidade de carga da bacitracina estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Valores de eficiência de encapsulação e de capacidade de carga por medição indirecta de UV – Vis da formulação de nanopartículas. (média \pm SD; n = 6)

	EE* (%)	CC* (%)
MLN – Bac*	53 \pm 3	4,4 \pm 0,4

*resultados obtidos no dia seguinte à preparação da formulação. Eficiência de encapsulação (EE); Capacidade de carga (CC)

Analisando os resultados da tabela 5.5, ambos os parâmetros se encontram dentro das previsões apresentadas pelo modelo experimental do tipo Box – Behnken. Para além disso, é importante realçar que o cálculo utilizado para obter a CC é obtido com a massa total de formulação. Muitas vezes na literatura, este cálculo é baseado na percentagem de bacitracina relativamente à percentagem de lípidos usados, não traduzindo assim, o verdadeiro valor da CC. Ainda assim, 4,4 % de CC em nanopartículas lipídicas é um valor dentro da média. É ainda importante realçar que se trata de um fármaco hidrofílico encapsulado em nanopartículas lipídicas.

5.3 ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de libertação *in vitro* foram utilizados com o objetivo de traçar um perfil de libertação dos compostos usados, neste caso a bacitracina, para perceber se a utilização das nanopartículas está ou não a ter o efeito pretendido - perceber se a libertação do fármaco ocorre de forma controlada. Para tal, fez-se uma comparação entre a solução de composto livre e o composto nas nanopartículas. As retas de calibração que sustentam os respectivos resultados destes estudos encontram-se nos anexos 8.1.2 e 8.1.3.

Os resultados do estudo da libertação, apresentados na figura 5.3, foram normalizados com os valores obtidos para o fármaco livre, em cada um dos pHs. Esta análise permite retirar a contribuição da resistência da passagem da bacitracina na membrana, tendo-se assim em conta apenas a libertação da bacitracina das MLN.

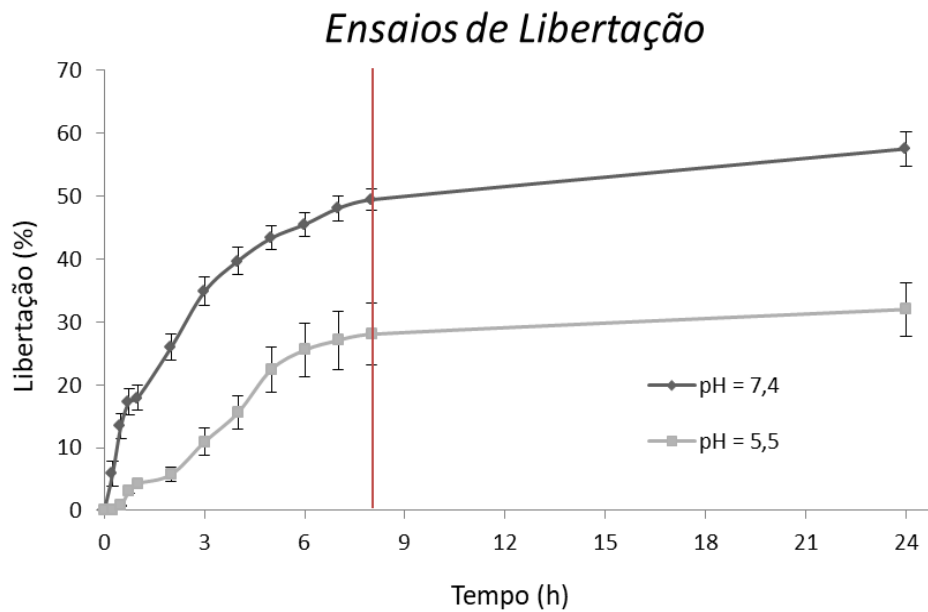


Figura 5.3 – Representação gráfica dos estudos de liberação *in vitro* da bacitracina encapsulada (MLN – Bac) utilizando como meio PBS a pH 7.4 e tampão acetato a pH 5.5. (média \pm SD; n = 3)

Como se pode verificar na figura 5.3 a taxa de liberação de bacitracina nas MLN é superior a pH 7.4, comparativamente a pH 5.5. Este resultado vai de encontro com a literatura, uma vez que, uma maior liberação de bacitracina a pH 7.4 trará benefícios no impedimento da proliferação de *Staphylococcus aureus* em infecções bacterianas tópicas [11].

Por outro lado, conseguimos perceber que a bacitracina em ambos os meios se liberta de forma controlada ao longo do tempo. Ao fim de 8h, tempo considerado máximo para uma formulação ficar retida na pele, verifica-se uma liberação de cerca de 50 % a pH 7.4 e 25 % a pH 5.5. Esta liberação possibilita, que para além de uma liberação no local, haja ainda uma percentagem elevada de bacitracina encapsulada e disponível nas MLN. Estas poderão ainda ter um efeito sistémico ou ser internalizadas pelas células alvo, de modo a aumentar o efeito do fármaco nas bactérias.

5.4 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO

A pele, o maior órgão do corpo humano, é a nossa primeira defesa contra agentes externos. A via tópica é usada como alternativa para a administração de fármacos, estes são incorporados em formulações galénicas semissólidas, como: cremes, pomadas e géis. Para que a sua terapêutica seja eficaz estes devem atravessar as várias camadas da pele e chegar ao local desejado, que varia em função do objetivo terapêutico, proporcionando assim o seu efeito. Atualmente, existem técnicas *in vitro* que permitem testar a taxa de permeação das formulações tópicas, onde a cinética da pele é simulada. Esta técnica inclui um dador, uma membrana e um meio recetor que é analisado par determinar a concentração do fármaco ao longo do ensaio.

Posteriormente ao estudo do perfil de libertação *in vitro* realizado, foram realizados estudos de permeação de modo a perceber a viabilidade da formulação desenvolvida numa terapêutica tópica.

Estes estudos mostraram que em MLN – Bac a permeação é mais rápida e controlada do que quando comparado com a solução de Bac – livre, como se encontra representado na figura 5.4. De acordo com os resultados obtidos é viável que as formulações desenvolvidas possam vir a ser utilizadas no tratamento para uma infeção cutânea. A forma galénica da formulação facilita a sua aplicação pelo doente. Para além disso, a formulação está associada a vários benefícios como: reconstituição da barreira cutânea e hidratação, uma vez que os constituintes maioritários são lípidos.

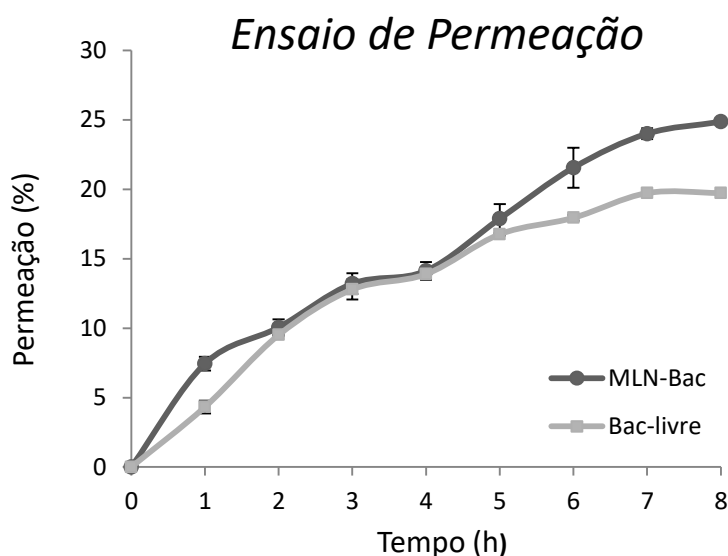


Figura 5.4 – Representação gráfica dos resultados obtidos através dos estudos de permeação in vitro. Como barreira de permeação foi utilizado pele da orelha de porco, pH 7.4 e uma temperatura de 37 °C.

É possível perceber que em alguns pontos do gráfico a permeação do fármaco livre é muito próxima da permeação da formulação. Embora a formulação continue a permear mais que o fármaco livre.

É possível que esta permeação se deva ao facto de estarmos a comparar uma formulação semi-sólida e uma solução aquosa de fármaco livre. A galénica das preparações é diferente e certamente terá efeito na permeação. Numa perspectiva futura, o ideal seria incorporar o fármaco livre num gel de carbopol. Desta forma garantíamos uma galénica mais idêntica entre amostras. É importante realçar que a concentração de fármaco (bacitracina) é idêntica em ambas as preparações.

5.5 ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

5.5.1 LINHA CELULAR L929

Numa primeira abordagem, foram testadas diferentes concentrações de formulações placebo (MLN sem Bac), de forma a determinar a concentração máxima de MLN não tóxicas para as células.

Posteriormente, numa segunda abordagem, foram testadas concentrações de formulação com bacitracina (MLN – Bac) e uma solução aquosa de fármaco (Bac – livre). O conceito deste ensaio é perceber a concentração máxima que não é tóxica para as células.

Na figura 5.5, através do gráfico de barras, é possível observar a dependência da taxa de viabilidade celular com concentrações crescentes das diversas amostras.

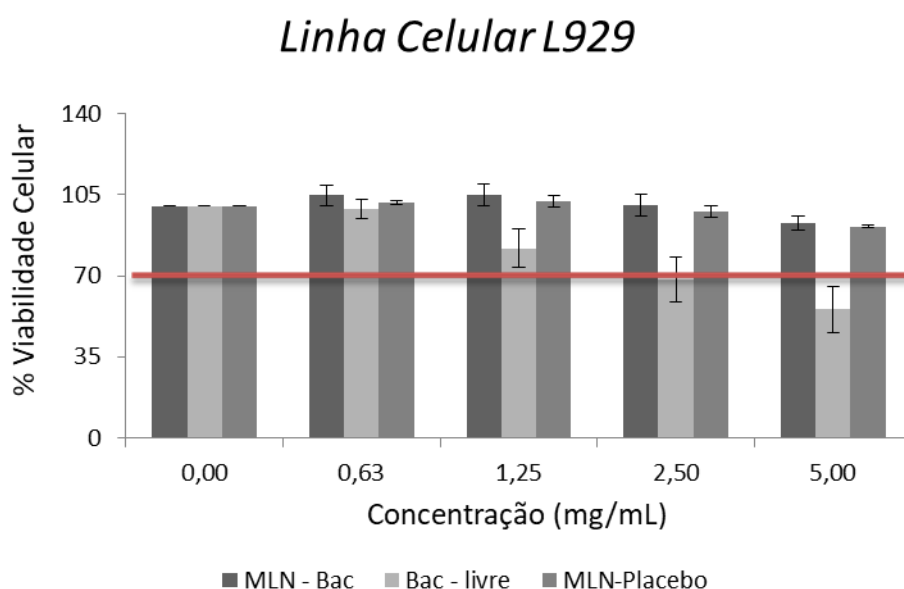


Figura 5.5 – Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efectuados com a linha celular L929, usando diferentes concentrações de MLN – Placebo, MLN – Bac e Bac – livre. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável de viabilidade celular recomendando pela ISO. (média \pm SD; n = 3)

Pela análise dos resultados obtidos, onde foram testadas concentrações de 0,63 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,50 mg/mL e 5,00 mg/mL é possível concluir que é seguro utilizar uma formulação de MLN – Bac, numa concentração \leq a 5,00 mg/mL, uma vez que, esta se traduz numa taxa de viabilidade celular de aproximadamente 90 %.

O contrário não se poderá dizer da Bac – livre, a uma concentração \geq 2,50 mg/mL, esta apresenta uma taxa de viabilidade celular de aproximadamente 70%, isto traduz-se numa toxicidade elevada para as células. É recomendado, por uma norma ISO (criada pela Organização Internacional de Padronização), que uma taxa de viabilidade abaixo de 70% seja considerado tóxico para as células [47].

5.5.2 LINHA CELULAR HACAT

À semelhança da linha celular L929, foram testadas diferentes concentrações de formulações placebo (MLN sem Bac), de forma a determinar a concentração máxima de MLN não tóxicas para as células. A metodologia usada foi a mesma.

Na figura 5.6, é possível observar a dependência da taxa de viabilidade com concentrações crescentes das diversas amostras.

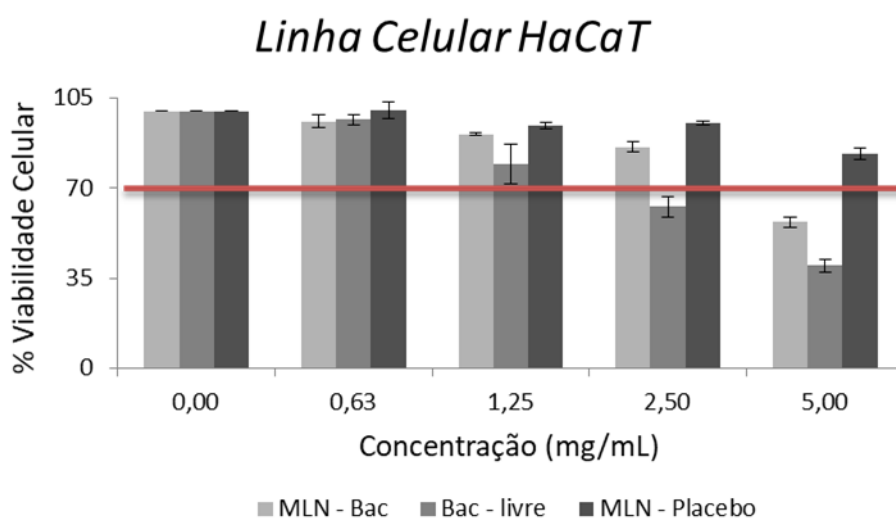


Figura 5.6 – Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efectuados com a linha celular HaCaT, usando diferentes concentrações de MLN – Placebo, MLN – Bac e Bac – livre. A linha vermelha representa o valor mínimo aceitável de viabilidade celular recomendando pela ISO. (média \pm SD; n = 3)

Relativamente aos resultados obtidos de Bac – livre é possível perceber que a uma concentração $\geq 1,25$ mg/mL leva a uma taxa de viabilidade celular abaixo do recomendando pela ISO, o que traduz numa toxicidade celular.

Analogamente às formulações de MLN, podemos concluir que a MLN – Bac numa concentração $\leq 2,50$ mg/mL é segura, uma vez que, esta se traduz numa taxa de viabilidade celular de aproximadamente 90 %. Assim, a concentração máxima a ser usada é determinada pela concentração segura na linha celular em que a toxicidade foi superior.

6 Conclusão e Perspetivas Futuras

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

A ciência procura todos os dias arranjar formas mais viáveis de combater as mais variáveis doenças. Muitas vezes, através de novas técnicas de análise que possibilitam a identificação precoce da patologia, ou até mesmo, pela procura de novos tratamentos farmacológicos que visam retardar o avançar da doença, e quiçá, retardar o aparecimento da mesma. Por outro lado, a procura em minimizar os efeitos colaterais associados aos tratamentos atuais. Toda esta procura serve para obtermos uma maior esperança de vida em prol de uma melhor qualidade de vida, é nisto que a ciência procura trabalhar todos os dias.

O desenvolvimento de uma formulação de bacitracina, um antibiótico esquecido, numa nova geração de nanopartículas foi o ponto de partida para o presente trabalho. O objetivo inicial, foi desenvolver uma nova formulação de bacitracina, como alternativa terapêutica, capaz de combater infeções bacterianas a nível tópico.

Atualmente existem já algumas formulações na literatura, com o intuito de uma administração tópica da bacitracina (Tabela 6.1). No entanto, devido a serem tipos de estudo diferentes, a comparação não é direta. Com os estudos efetuados até ao momento, podemos apenas dizer que a formulação desenvolvida e descrita neste trabalho apresenta grande potencial.

Tabela 6.1 – Formulações baseadas na nanotecnologia, de Bacitracina, descritas na literatura.

Tipo de Partículas	Tamanho (nm)	Polidispersão	PZ* (mV)	Referência
Bac – AuNP	[89 – 100]	–	14	[13]
Nano – Bac	[116 – 127]	< 0,1	4,0	[19]
Nano – Bac_{3K; 5K; 8K}	[80 – 130]	< 0,1	4,0	[38]
Bac – PtNP	≈ 50	–	–	[48]

*Potencial zeta (PZ)

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Neste trabalho, os estudos de libertação *in vitro* e de permeação *ex vivo* provaram que a formulação otimizada é capaz de libertar bacitracina de forma controlada. É evidente a importância das NP no comportamento observado, uma vez que a sua estrutura lipofílica permitiu a permeação do fármaco através da pele de forma controlada.

Deste modo, é importante destacar que o tamanho das nanopartículas de bacitracina é adequado para administração tópica. A MLN – Bac apresenta duas populações predominantes, em média: população 1: 289 nm (99%) e população 2: 1265 nm (1%). Estas populações apresentam diversas vantagens, uma vez que, tamanhos mais pequenos são facilmente permeados atingindo camadas mais profundas da pele e até mesmo a corrente sanguínea. No caso da população de maior tamanho, esta atua na superfície da pele. Através da literatura sabe-se que *S. aureus*, bacteria predominante em infeções cutâneas, pode ficar confinada às camadas mais superficiais da pele ou estender-se aos tecidos mais profundos, chegando mesmo à corrente sanguínea.

Nos estudos de libertação de bacitracina, na presença das NP, estes mostram que a bacitracina é libertada de forma controlada, a um valor de pH 7.4. Estes estudos, vem evidenciar que as NP promovem a libertação de bacitracina na superfície da pele infetada. Assim, podemos concluir que a sua administração tópica, mostra efeitos promissores no combate a infeções cutanêas.

Os estudos de permeação mostram ainda que, efetivamente se consegue uma permeação controlada em MLN – Bac quando se compara com a permeação de Bac – livre. Apresentando assim, uma taxa máxima de permeação de aproximadamente 25% ao fim de 8h, o que indica que a bacitracina chegará ao destino pretendido, as bactérias.

Por fim, com a realização dos estudos em linhas celulares: L929 e HaCaT, é possível perceber, que as formulações não apresentam toxicidade até uma concentração de 5,0 mg/mL em células L929 e até 2,5 mg/mL em células HaCaT.

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Embora muito tenha sido estudado neste projeto, ainda há muito para ser trabalhado, principalmente na comprovação da eficácia desta formulação. Como trabalho futuro, será do maior interesse a realização de estudos de estabilidade em prateleira e estudos de concentração inibitória mínima em bactérias do tipo *S. aureus*.

7 Referências Bibliográficas

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

- 1 Gomes, M.J. (2012) , Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment. , MSc Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
- 2 Alves, A.C. (2011) , Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for cellulite treatment. , MSc Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
- 3 Scheuplein, R. and Blank, I. (1971) Permeability of the Skin. *Physiol. Rev.* 51, 702–741
- 4 Junqueira, Luiz C.; Carneiro, J. (2004) *Histologia Básica*, (10th edn)
- 5 Badenhorst, T. *et al.* (2014) Pharmaceutical strategies for the topical dermal delivery of peptides/proteins for cosmetic and therapeutic applications. *Austin J. Pharmacol. Ther.* 2, 1–10
- 6 Mancini, G. (2014) , Nanotecnologia Aplicada a Formulações Tópicas de Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteróides. , PhD Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
- 7 Santos, D. (1995) , Absorção Percutânea: geles de carbopol contendo fentiazac. , PhD Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
- 8 Viera, S. (2013) , Promoção da Absorção Cutânea de Fármacos. , MSc Thesis, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa
- 9 Rahimpour, Y. and Hamishehkar, H. (2012) Niosomes as carrier in dermal drug delivery. Recent advances in novel drug carrier. *Intech* 6, 142–164
- 10 Malley, J.T.O. *et al.* (2019) Skin inflammation in human health and disease. *J. Invest. Dermatol.* 139, 991–994
- 11 Proksch, E. (2018) pH in nature, humans and skin. *Dep. Dermatology* 7, 1–9
- 12 Rippke, F. *et al.* (2018) pH and microbial infections. *S. Karger AG, Basel* 54, 87–94

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

- 13 Li, X. *et al.* (2018) Self-assembly of bacitracin-gold nanoparticles and their toxicity analysis. *Mater. Sci. Eng. C* 82, 310–316
- 14 Nguyen, R. and Sun, Y. (2019) Bacitracin topical. *NCBI Bookshelf* 6, 1–4
- 15 Bacitracin | Sigma-Aldrich. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/bacitracin142269140587411?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 01-Jul-2020]
- 16 Saúde, I. e.-T. a (2019) , Bacitracina - Informação Geral. . [Online]. Available: <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/bacitracina/informacao-geral>. [Accessed: 09-Sep-2019]
- 17 Hong, W. *et al.* (2018) PEGylated self-assembled nano-bacitracin A : probing the antibacterial mechanism and real-time tracing of target delivery in vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 1–41
- 18 Infarmed (2015) Resumo das características do medicamento: Bacitracina Labesfal.
- 19 Hong, W. *et al.* (2018) Brain-targeted delivery of PEGylated nano- bacitracin A against penicillin-sensitive and - resistant pneumococcal meningitis : formulated with RVG 29 and pluronic P85 unimers. *Drug Deliv.* 25, 1–12
- 20 Allon, I. and Touitou, E. (2016) Scrolls : novel microparticulate systems for enhanced delivery to /across the skin. *CrossMark* 6, 24–37
- 21 Delgado, J. (2013) , Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. , MSc Thesis, Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança
- 22 Marinho, A. (2018) , Desenvolvimento e caracterização de nanoagentes para a artrite reumatoide desenvolvimento e caracterização de nanoagentes para a artrite reumatoide. , MSc Thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia da

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

Universidade Nova de Lisboa

- 23 Kayser, O. *et al.* (2016) The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6, 3–5
- 24 Naahidi, S. *et al.* (2013) Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* 166, 182–194
- 25 Oyarzun-Ampuero, F. *et al.* (2015) Nanoparticles for the Treatment of Wounds. *Curr. Pharm. Des.* 21, 4329–4341
- 26 Garcês, A. *et al.* (2018) Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *Eur. J. Pharm. Sci.* 112, 159–167
- 27 Coelho, S. *et al.* (2017) , Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico. , PhD Thesis, Universidade Federal de Pernambuco
- 28 Müller, R.H. *et al.* (2002) , Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. , in *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, pp. 131–155
- 29 Natarajan, J. V *et al.* (2014) Sustained-release from nanocarriers: a review. *J. Control. Release* 4, 1–38
- 30 Souto, E.B. *et al.* (2007) Lipid nanoparticles (SLN[®] , NLC[®]) for cutaneous drug delivery : structure, protection and skin effects. *J. Biomed. Nanotechnol.* 3, 317–331
- 31 Calvalcanti, S.M.T. *et al.* (2017) Multiple lipid nanoparticles (MLN), a new generation of lipid nanoparticles for drug delivery systems : Lamivudine-MLN experimental design. *Pharm Res* 34, 1204–1216
- 32 Rayhane, B.K. *et al.* (2019) Preparation of rosemary essential oil-loaded multiple lipid nanoparticles (RO- MLNs) and evaluation of their antibacterial activity.

NanoSpain Conf 2, 1–3

- 33 Plantinga, N.L. *et al.* (2015) Fighting antibiotic resistance in the intensive care unit using antibiotics. *Future Microbiol.* 10, 391–406
- 34 Al-thubiani, A.S.A. *et al.* (2018) Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. *Saudi Pharm. J.* 26, 1089–1097
- 35 Hong, W. and Liu, L. *et al.* (2018) Insights into the antibacterial mechanism of PEGylated nano-bacitracin A against *Streptococcus pneumoniae*: both penicillin-sensitive and penicillin-resistant strains. *Int. J. Nanomedicine* 13, 6297–6309
- 36 Infarmed (2015) Folheto Informativo: Bacitracina Labesfal.
- 37 Beyth, N. *et al.* Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. , *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. (2015) , 1–16
- 38 Hong, W. *et al.* (2017) Synthesis , construction , and evaluation of self-assembled nano-bacitracin A as an efficient antibacterial agent *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Nanomedicine* 12, 4691–4708
- 39 Soares, F. (2019) , Development of hybrid nanosystems based on membrane lipids as SPIONs nanocarriers for *Staphylococcus aureus* biofilms disruption. , MSc Thesis, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
- 40 Mondim, A.F. (2014) , Metodologias de superfície de resposta: uma investigação no âmbito da indústria cerâmica e do vidro. , MSc Thesis, Universidade Aberta
- 41 Costa, T. (2016) , O uso de nanopartículas lipídicas como veículo de fármacos. , MSc Thesis, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz
- 42 Freitas, C. and Mu, R.H. (1998) Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168, 221–229

| Desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de Bacitracina em
Nanopartículas Lipídicas Múltiplas |

- 43 Meerloo Van, J. *et al.* (2011) Cell sensitivity assays : the MTT assay. *Cancer Cell Cult.* 731, 237–245
- 44 Gouveia, V.M. *et al.* (2018) Hyaluronic acid-conjugated pH-sensitive liposomes for targeted delivery of prednisolone on rheumatoid arthritis therapy. *Nanomedicine* 13, 1037–1049
- 45 Dick, I.P. and Scott, R.C. (1992) Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 640–645
- 46 Yang, D. and Pornpattananankul, D. (2009) The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials* 30, 6035–6040
- 47 Standard, I. (2009) ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. *Int. Organ. Stand. Geneva, Switz.*
- 48 Yin, T. *et al.* (2017) Biologically inspired self-assembly of bacitracin-based platinum nanoparticles with anti-tumor effects. *New J. Chem.* 41, 2941–2948

8 Anexos

8.1 RETA DE CALIBRAÇÃO DA BACITRACINA

8.1.1 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO

A reta de calibração para a taxa de encapsulação efetuou-se utilizando uma solução *stock* de 10mg/mL de Bacitracina em água bidestilada. Para traçar a reta de calibração efetuaram-se diluições da solução *stock* e mediu-se a absorvância entre os 200-500 nm. A reta obtida encontra-se representada na figura 8.1

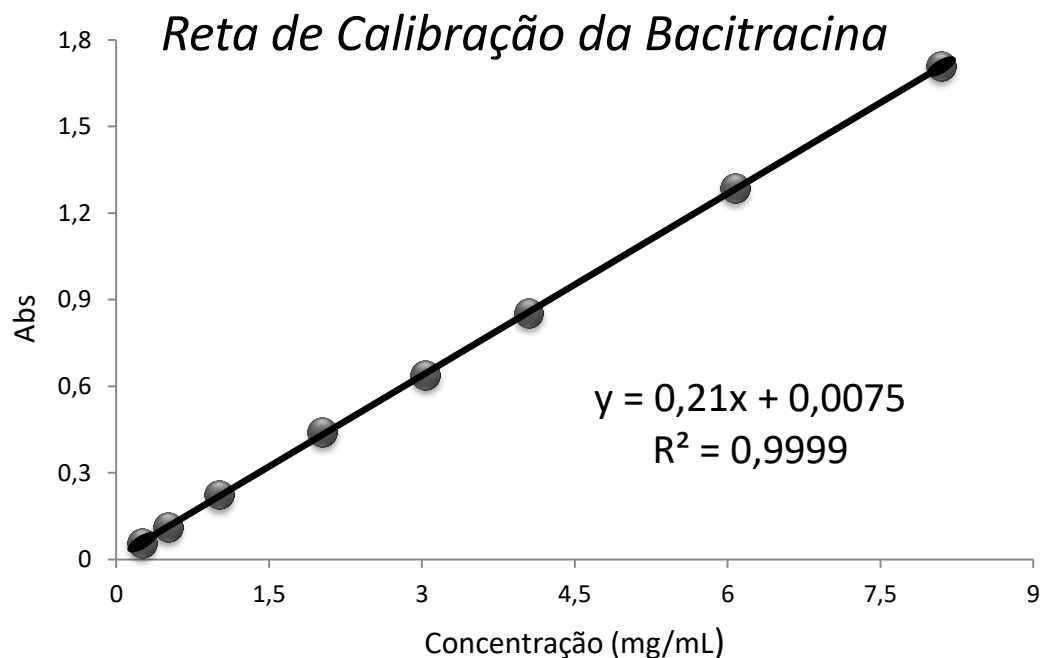


Figura 8.1 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação de Bacitracina nas NP.

8.1.2 ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO E PERMEAÇÃO A PH 7.4

A reta de calibração da Bacitracina para os estudos de libertação e permeação a pH 7.4 efetuou-se utilizando como solução mãe, posteriormente efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-500 nm, obtendo-se a reta representada na figura 8.2

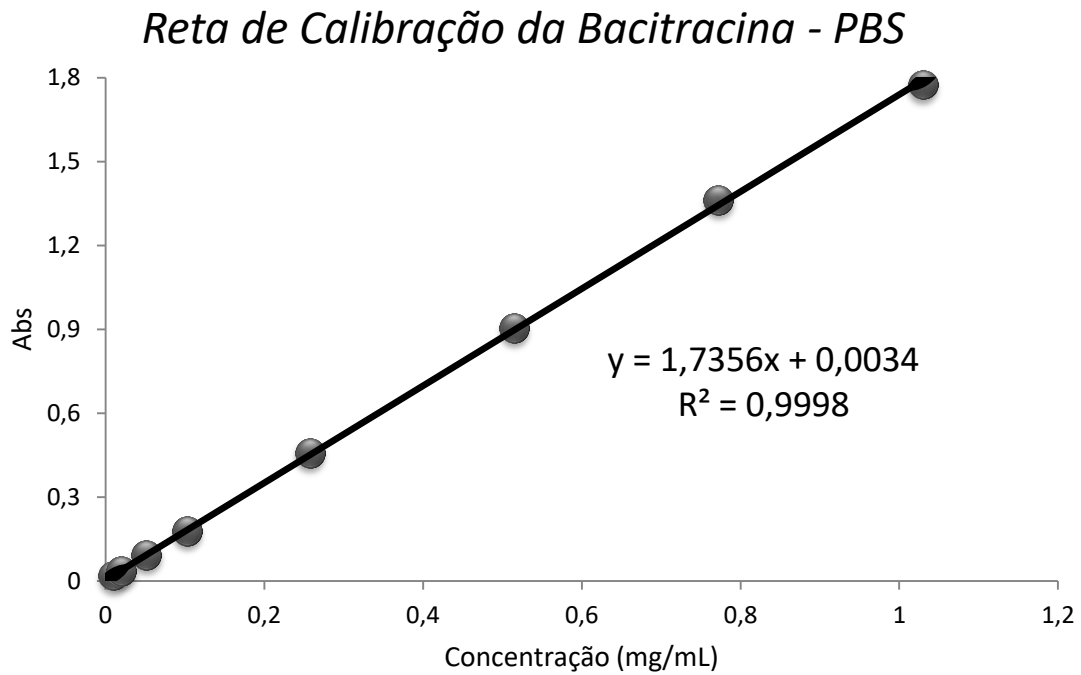


Figura 8.2 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação a pH 7.4, *in vitro*, para a Bacitracina nas NP e para a Bac – livre.

8.1.3 ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO A PH 5.5

A reta de calibração da Bacitracina para os estudos de libertação a pH 5.5 efetuou-se utilizando como solução mãe, posteriormente efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-500 nm, obtendo-se a reta representada na figura 8.3

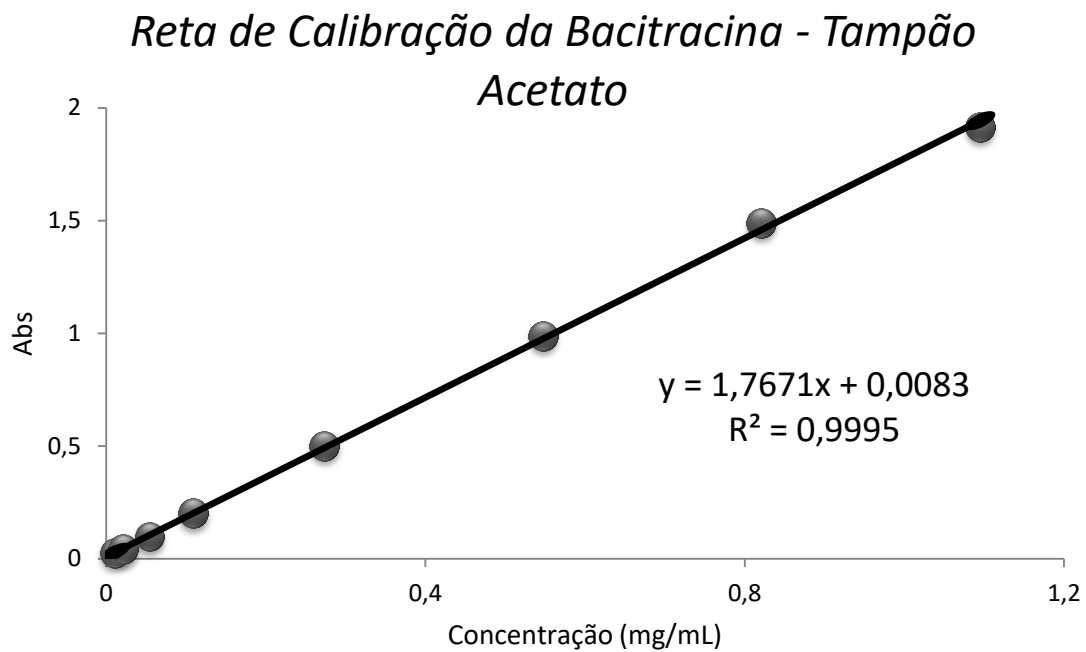


Figura 8.3 – Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação a pH 5.5, *in vitro*, para a Bacitracina nas NP e para a Bac – livre.