

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Sistemas poliméricos avançados para veiculação  
de fármacos: Aplicação no tratamento de  
biofilmes**

**Catarina Sofia Ramos Marques**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Francisca de Campos Simão  
Bettencourt, Categoria Professora Auxiliar com Agregação.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**



**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Sistemas poliméricos avançados para veiculação de fármacos: Aplicação no tratamento de biofilmes**

**Catarina Sofia Ramos Marques**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Francisca de Campos Simão Bettencourt, Categoria Professora Auxiliar com Agregação.

**2022**

## Resumo

Os biofilmes são comunidades complexas de microrganismos que residem dentro de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, produzida pelos próprios, e aderem a superfícies bióticas ou abióticas. Os biofilmes são altamente tolerantes a agentes antimicrobianos e são uma das principais causas de infecções persistentes e recorrentes por agentes patogênicos clinicamente importantes, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Recentemente, a nanotecnologia surgiu como um método promissor para erradicar infecções bacterianas associadas a biofilmes. Existem diferentes tipos de nanopartículas e nesta revisão são abordadas as nanopartículas poliméricas que têm sido amplamente estudadas como sistemas de entrega de agentes antimicrobianos e mostraram várias vantagens, incluindo elevada biocompatibilidade, liberação sustentada, *targeting*, elevada concentração de fármaco no local da infecção, veiculação de fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos e melhoria da biodisponibilidade do fármaco.

A presente monografia tem como objetivo efetuar uma revisão da literatura sobre a utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas de veiculação de fármacos para o tratamento de biofilmes. Primeiramente, é apresentada a definição de biofilme, a sua composição e o processo de formação de biofilmes bacterianos. De seguida, são referidos exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes nomeadamente periodontite, fibrose quística e infecções por biofilme associadas a cateteres urinários. É discutido o interesse terapêutico da nanotecnologia nesta área e são abordados diferentes tipos de nanopartículas poliméricas, métodos de preparação e tipos de polímeros utilizados. Posteriormente são discutidos vários estudos *in vitro* e *in vivo* que revelam o interesse deste tipo de nanopartículas, incluindo parâmetros importantes para o tratamento de biofilmes, como a eficiência de encapsulação, capacidade de carga, controlo da liberação de fármacos, influência do tamanho das partículas e a sua mobilidade em biofilmes. Por fim são descritos alguns exemplos de nanopartículas poliméricas contendo antibiótico para tratamento de biofilmes associados a Fibrose Quística.

**Palavras-chave:** Biofilmes; Infecções associadas aos biofilmes; Nanopartículas poliméricas; Antibióticos.

# Abstract

Biofilms are complex communities of microorganisms that reside within a matrix of extracellular polymeric substances, produced by themselves, and adhere to biotic or abiotic surfaces. Biofilms are highly tolerant to antimicrobial agents and a major cause of persistent and recurrent infections by clinically important pathogens, for example, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*.

Recently, nanotechnology has emerged as a promising method to eradicate bacterial infections associated with biofilms. There are different types of nanoparticles and this review addresses polymeric nanoparticles that have been widely studied as delivery systems for antimicrobial agents and have shown several advantages, including high biocompatibility, sustained release, targeting, high drug concentration at the site of infection, delivery of both lipophilic and hydrophilic drugs and improved drug bioavailability.

The present work aims to review the literature on the use of polymeric nanoparticles as drug delivery systems for the treatment of biofilms. First, it is presented the definition of biofilm, its composition and the process of bacterial biofilm formation. Next, it is mentioned examples of human infections associated with biofilms, namely periodontitis, cystic fibrosis and biofilm infections associated with urinary catheters. The therapeutic interest of nanotechnology in this area is discussed and different types of polymeric nanoparticles, preparation methods and types of polymers used addressed. Subsequently, several in vitro and in vivo studies are discussed, studies that reveal the interest of this type of nanoparticles, including important parameters for the treatment of biofilms, such as encapsulation efficiency, drug loading, drug release control, influence of particle size and their mobility in biofilms. Finally, some examples of polymeric nanoparticles containing antibiotics for the treatment of biofilms associated with Cystic Fibrosis are described.

**Keywords:** Biofilms; Biofilm-associated infections; Polymeric Nanoparticles; Antibiotics.

# **Agradecimentos**

À minha orientadora Professora Doutora Ana Bettencourt por toda a disponibilidade, reuniões, esclarecimento de dúvidas e orientações.

Obrigada aos meus amigos por todo o apoio e carinho ao longo destes anos.

Ao Igor pelo apoio incondicional durante estes 5 anos e à Susana e ao Telmo por estarem sempre presentes e prontos para me ajudar.

Por fim, o meu maior agradecimento vai para a minha família por serem incríveis e estarem sempre aqui para mim, especialmente à minha mãe, pai e mano, sem vocês não seria possível.

# Abreviaturas

AB- Antibiótico

AmB- Anfotericina B

AHL- Lactonas N-acil-homoserinas

BAT- *Biofilm antibiotic tolerance*

CFU- Unidades de formadoras de colónias

CIP- Ciprofloxacina

DL- *Drug Loading*

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DNase I- Desoxirribonuclease I

DS- Sulfato de Dextrano

eDNA- DNA extracelular

EE- Eficiência de encapsulação

ESE- Evaporação do solvente da emulsão

EPS- Substâncias poliméricas extracelulares

FQ- Fibrose Quística

GD- Grau de desacetilação

HGT- Transferência horizontal de genes

IMP- Imipenem

LEV- Levofloxacina

LNC- Nanocápsulas de núcleo lipídido

MBC- Concentração mínima bactericida

MBEC- Concentração mínima de erradicação do biofilme

MBIC- Concentração mínima inibitória de biofilme

MIC- Concentração mínima inibitória

NIH- *National Institute of Health*

NPC- Nanoprecipitação

NPs - Nanopartículas

NPPs- Nanopartículas Poliméricas

Oxa- Oxacilina

PDI- Índice de polidispersão

PCL- Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PEG- Polietilenoglicol

PLA- Ácido Polilático

PLGA- Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PVA- Acetato de Polivinilo

PZ- Potencial Zeta

QS- Quitosano

Tb- Tobramicina

TPP- Trifosfato de sódio

UTI- Infecções do trato urinário

VCM- Vancomicina

# Índice

1. Introdução.....	12
2. Metodologia .....	14
3. Biofilmes .....	15
3.1 Definição e composição .....	15
3.2 Formação de biofilmes bacterianos.....	16
4. Exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes e espécies microbianas relevantes	18
4.1 Periodontite .....	19
4.2 Fibrose Quística.....	19
4.3 Infecções causadas por biofilmes associadas a cateteres urinários.....	21
5. Problema das infecções associadas a biofilmes – mecanismos de resistência.....	22
5.1 Matriz EPS .....	23
5.2 <i>Quorum sensing</i> .....	23
5.3 Células Persistentes .....	24
5.4 Transferência horizontal de genes (HGT).....	24
5.5 Papel do eDNA.....	25
5.6 Bombas de Efluxo .....	25
5.7 Papel das enzimas da matriz modificadoras de antibióticos .....	25
6. Nanopartículas poliméricas como sistemas de veiculação de antibióticos .....	26
6.1 Nanotecnologia.....	26
6.2 Nanopartículas.....	27
6.2.1 Propriedades das NPs .....	27
6.3 Nanopartículas poliméricas .....	28
6.4 Métodos de preparação de NPPs.....	29
6.4.1 Nanoprecipitação (NPC) .....	30
6.4.2 Evaporação do solvente.....	31
6.4.3 Emulsificação - Difusão solvente.....	31
6.5 Diferentes tipos de polímeros usados na preparação de NPPs.....	32
6.5.1 Polímeros Naturais .....	33
6.5.2 Polímeros Sintéticos.....	34
7. Atividade antibiofilme de nanopartículas poliméricas: estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	36
7.1 Influência do tamanho das NPs.....	36

7.2	Potencial Zeta.....	37
7.3	<i>Drug loading</i> e eficiência de encapsulação.....	37
7.4	Perfil de liberação das NPs e atividade antimicrobiana .....	38
7.5	NPPs contendo antibiótico para Tratamento de biofilmes associados a Fibrose Quística.....	42
8.	Conclusão e Perspetivas Futuras .....	47
9.	Referências.....	48

## Índice de Figuras

Figura 1 . Composição da matriz EPS e funções dos constituintes majoritários .....	15
Figura 2. Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme .....	16
Figura 3. Formação de biofilme bacteriano .....	17
Figura 4. Nanoesferas e Nanocápsulas.....	29
Figura 5. Métodos de preparação de NPPs .....	30
Figura 6. Ilustração sistemática do método Nanoprecipitação.....	31

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Infecções associadas a biofilmes humanos e principais espécies patogênicas causais .....	20
Tabela 2. Exemplos de infecções por biofilmes associadas a dispositivos médicos e espécies microbianas relevantes .....	22
Tabela 3. Classificação de polímeros baseada na sua origem.....	32
Tabela 4. Exemplos de NPPs contendo antibiótico para tratamento de biofilmes.....	40
Tabela 5. Exemplos de Nanopartículas poliméricas contendo antibiótico para Tratamento de biofilmes associados a Fibrose Quística.....	43

# 1. Introdução

As infecções microbianas associadas a biofilmes microbianos (bacterianos, fúngicos e mistos) são motivo de grande preocupação em vários setores, nomeadamente da saúde, alimentação e agricultura (1).

De acordo com o NIH (*National Institute of Health*), os biofilmes microbianos estão envolvidos na etiologia de 60-80% das infecções humanas (2,3). Estas infecções são caracterizadas por início lento, sintomas de média intensidade, evolução crónica e elevada resistência ao tratamento com antibióticos e ao sistema imunitário do hospedeiro, sendo importantes reservatórios para infecções crónicas e de difícil tratamento (2).

Os biofilmes apresentam maior resistência à osmose de agentes antimicrobianos do que os microrganismos na sua forma livre e, portanto, são mais prejudiciais porque podem causar graves problemas de saúde (como por exemplo endocardite, periodontite e fibrose quística) (4,5).

A comunicação intra e intercelular regulada pelo sistema *Quorum-sensing* (ver ponto 5.2) é necessária tanto para o desenvolvimento do biofilme quanto para a expressão de diferentes características de virulência. Devido à sua fisiologia modificada, as células do biofilme podem tornar-se até 1000 vezes mais resistentes a antibióticos e outros antimicrobianos, sendo muito difícil de erradicar com a terapia antimicrobiana convencional (2,6).

Os antibióticos bloqueiam processos celulares essenciais para a proliferação bacteriana e são classificados de acordo com seu principal mecanismo de ação. Alguns exemplos são os  $\beta$ -lactâmicos que interferem com a síntese da parede celular; macrólidos, aminoglicosídeos e tetraciclina inibem a síntese de proteínas; fluoroquinolonas interferem com a síntese de ácidos nucleicos; sulfonamidas inibem as vias metabólicas e polimixinas que provocam rutura da estrutura da membrana bacteriana (7).

Atualmente são utilizadas quatro classes principais de antimicóticos para tratar infecções fúngicas. Os polienos, como a anfotericina B (AmB), são o grupo mais antigo de fármacos antifúngicos. A AmB caracteriza-se por uma ação fungicida, liga-se aos esteróis da membrana para formar poros transmembranas, alterando assim a permeabilidade da membrana e causando fugas de componentes essenciais para fora da célula, e ainda induz danos oxidativos. A segunda classe antifúngica são os azóis que inibem uma enzima importante para a biossíntese do ergosterol, a enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase. Outra classe são as equinocandinas (por exemplo, caspofungina) inibem  $\beta$ -1,3-D-glucano sintase,

uma enzima crucial na síntese de  $\beta$ -1,3-glucano que é um dos principais constituintes da parede das células fúngicas. Por último, as alilaminas (por exemplo, terbinafina) interferem com a biossíntese do ergosterol ao inibir a enzima esqualeno epoxidase (8).

A administração de antibióticos na sua forma livre resulta num efeito rápido com necessidade de administração de várias doses por dia têm vindo a ser exploradas outras estratégias, designadamente, com recurso a ferramentas de nanotecnologia. Atualmente, nanopartículas (NPs) com distintas composições tem vindo a ser exploradas devido ao seu potencial para erradicar infeções associadas aos biofilmes (9).

O objetivo é que as NPs possam ser adaptadas para controlar a taxa e a duração da entrega do fármaco. O conceito de libertação sustentada das partículas é um aspeto crucial na entrega de antibióticos, uma vez que manter uma concentração adequada de fármacos por mais tempo reduz a frequência de dosagem. Uma terapia antimicrobiana bem sucedida contra infeções por biofilmes requer uma combinação de uma libertação rápida e sustentada de antibióticos (libertação bifásica) das partículas. A libertação de fármacos numa fase inicial do tratamento garante uma elevada concentração antimicrobiana para a erradicação do biofilme e, conseqüentemente, um menor risco de desenvolvimento de resistência, seguido de uma libertação sustentada capaz de minimizar qualquer crescimento adicional do biofilme. Para isso, é vantajoso utilizar NPs, uma vez que podem atuar como depósito para uma parte da dose de antibiótico, proporcionando uma libertação sustentada acima da concentração mínima inibitória (MIC) (7,10).

Embora muitos trabalhos de pesquisa proponham diferentes estratégias para controlar o desenvolvimento de biofilmes, ainda muito poucos se encontram em ensaios clínicos (2).

## 2. Metodologia

Este trabalho consiste numa revisão da literatura sobre a utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas de veiculação de fármacos para o tratamento de biofilmes.

Os critérios de seleção dos artigos científicos basearam-se na relevância do seu conteúdo e data de publicação dos mesmos.

A pesquisa foi realizada desde Janeiro a Agosto de 2022 através de quatro bases de dados principais - PubMed, Science Direct e Google Académico, utilizando palavras-chave como “nanoparticles”, “biofilms”, “polymeric nanoparticles”, “antibiotics” e dependendo de cada capítulo alguns desses termos foram combinados com palavras mais específicas de cada um, por exemplo, “biofilm formation”, “Biofilm-associated infections”; “Natural polymers”, “Synthetic polymers”, “Nanosphere and nanocapsule” e “methods for the production of polymeric nanoparticles”.

Após a recolha e análise de toda a informação, esquematizaram-se os pontos mais pertinentes, utilizando-os na elaboração dos capítulos e subcapítulos.

# 3. Biofilmes

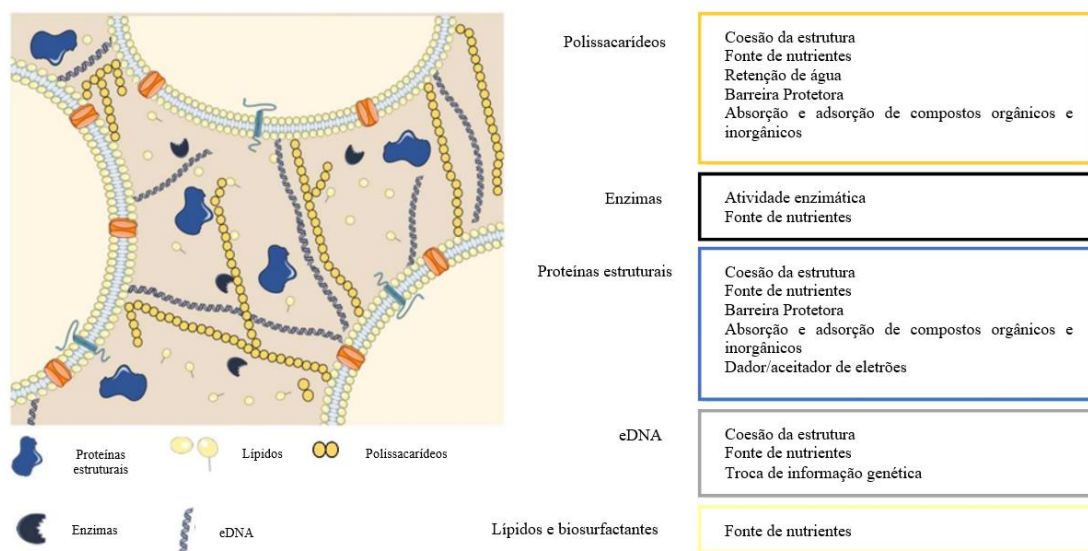
## 3.1 Definição e composição

A definição de biofilme tem evoluído de acordo com os desenvolvimentos das técnicas de visualização microscópica, permitindo assim a vários investigadores observar agregados de microrganismos e propor diferentes definições.

Os biofilmes são comunidades complexas e dinâmicas compostas por microrganismos como por exemplo fungos, vírus, protozoários e bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, que estão fixas a superfícies bióticas ou abióticas e incorporadas numa matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas pelas próprias, e que exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (1–3,7,9,11–13).

Normalmente, 5 a 35% do volume do biofilme é constituído pelos microrganismos e o restante volume pela matriz EPS (4).

A matriz EPS de origem microbiana é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme e contém diferentes componentes (Figura 1), sendo o principal a água (97%), proteínas (>2%), polissacarídeos (1 a 2%), moléculas de DNA e RNA (< 1-2%) e iões (4,14).



**Figura 1 . Composição da matriz EPS e funções dos constituintes maioritários. Adaptado de referência (15)**

A estrutura de um biofilme é influenciada por vários parâmetros que estão associados a três componentes, o microrganismo, o tipo de superfície e o microambiente em que os microrganismos se encontram (Figura 2) (16).

Microambiente	Microrganismo	Superfície
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH</li> <li>• Tempo de exposição</li> <li>• Filme condicionante</li> <li>• Disponibilidade condicional</li> <li>• Hidrodinâmica</li> <li>• Inóculo bacteriano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espécie e estirpe</li> <li>• Composição da superfície</li> <li>• Hidrofobicidade e carga</li> <li>• Energia livre de superfície</li> <li>• Adesinas (pili e fimbrias)</li> <li>• Sistema <i>Quorum sensing</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga</li> <li>• Rugosidade</li> <li>• Hidrofobicidade</li> <li>• Energia livre de superfície</li> <li>• Química e grupos funcionais</li> </ul>

**Figura 2. Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme. Adaptado de referência (16)**

### **3.2 Formação de biofilmes bacterianos**

As espécies bacterianas são as maiores produtoras de biofilme. A maioria das espécies demonstra elevada taxa de crescimento, grande adaptabilidade e competência para a produção de substâncias e estruturas extracelulares, que protegem os microrganismos (17).

Após a invasão de um novo hospedeiro, as bactérias apresentam dois estados de sobrevivência, a forma planctônica (células individuais/livres) e os agregados populacionais que são as bactérias em estado sésil (biofilmes) (17).

A formação de biofilmes bacterianos é um processo complexo, composto por 5 principais etapas sequenciais (Figura 3) (3,15,17–20).

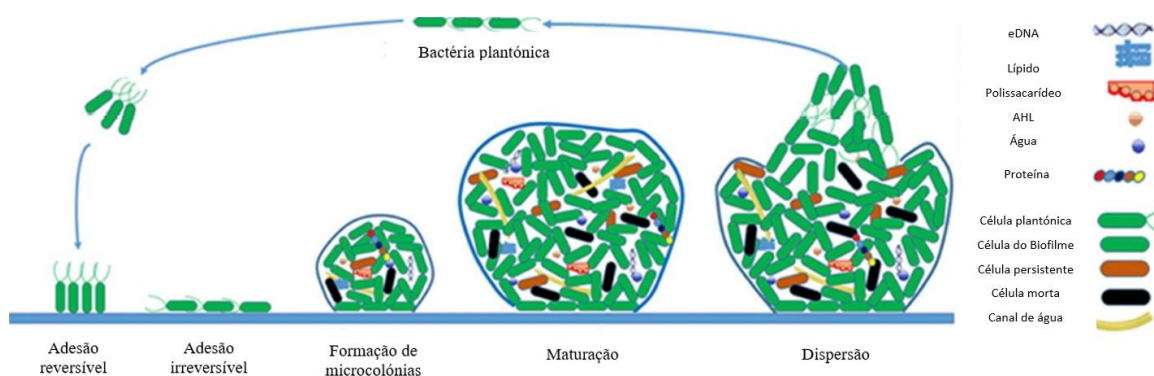
Os microrganismos na forma planctônica são condicionados por interações físico-químicas não específicas, migram e fixam-se a uma superfície (9,21). A deposição de bactérias é principalmente mediada pela sedimentação, movimento browniano e forças hidrodinâmicas, enquanto a adesão ao substrato é mediada por forças de Van der Waals, ácido-base, hidrofóbicas e eletrostáticas (22). As fimbrias ou pili e flagelos dão força à interação entre as bactérias e a superfície de fixação. A hidrofobicidade da superfície também pode ser responsável pelo fortalecimento da fixação dos micróbios, pois reduz a força de repulsão entre as bactérias e a superfície (9,23).

A adesão pode ser reversível (primária) ou irreversível (secundária) (23). Na forma reversível o agente patogénico pode reverter à forma planctónica. No estado irreversível, os microrganismos que estavam fracamente ligados multiplicam-se, diferenciam a sua expressão genética e aderem firmemente à superfície através de interações moleculares mais específicas entre estruturas bacterianas (flagelos e fimbrias IV) e moléculas do hospedeiro que funcionam como recetores. As células aderentes produzem as substâncias poliméricas extracelulares (EPS), o que resulta em agregação celular e formação da matriz, e é assim iniciada a formação do biofilme (14,23).

O biofilme começa a amadurecer desenvolvendo microcolónias e canais de água, enquanto se torna significativamente maior. O fluxo de nutrientes essenciais dentro de um biofilme é atribuído ao seu conteúdo de água, pois a troca de nutrientes e metabolitos é facilitada por esses canais que fornecem meios efetivos e permitem que as comunidades do biofilme desenvolvam uma complexidade e espessura considerável, mantendo as células individuais num estado nutricional ótimo em diversas zonas dentro do biofilme. Além disso, nesta etapa, outros microrganismos também podem ligar-se para formar um biofilme multiespécies (4,12,24,25).

O biofilme totalmente maduro atinge a sua densidade celular máxima e é considerado uma comunidade tridimensional (15).

Por fim, o biofilme maduro liberta microcolónias de células da comunidade principal, esta etapa constitui um fator importante na disseminação de uma infeção (12,23).



**Figura 3. Formação de biofilme bacteriano. Adaptado de referência (3)**

## **4. Exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes e espécies microbianas relevantes**

Dentro do biofilme, os microrganismos adaptam-se à anoxia ambiental e à limitação de nutrientes, exibindo um metabolismo, expressão génica e produção de proteínas alterados, o que pode levar a uma menor taxa metabólica e redução da taxa de divisão celular. Além disso, essas adaptações tornam os microrganismos mais resistentes à terapêutica antimicrobiana, inativando os alvos antimicrobianos ou reduzindo os requisitos para a função celular com a qual os antimicrobianos interferem. Durante uma infecção por biofilme, pode ocorrer ativação simultânea das respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro, no entanto, nenhum é capaz de eliminar o biofilme, e em vez disso, aceleram o dano tecidual colateral. Consequentemente, as doenças associadas aos biofilmes são tipicamente infecções persistentes que se desenvolvem lentamente, raramente são resolvidas pelo sistema imunitário e respondem de forma inconsistente aos tratamentos antimicrobianos (26).

Aproximadamente 80% das infecções microbianas crónicas e recorrentes no corpo humano são devidas a biofilmes bacterianos (27).

As comunidades sésseis de bactérias aderem a uma grande variedade de superfícies biológicas, como ouvidos, cavidade oral, sistema urinário, feridas e queimaduras, tratos gastrointestinal e respiratório. Algumas das infecções relacionadas com o tecido causadas por biofilmes microbianos incluem periodontite, osteomielite, infecção pulmonar na fibrose quística, endocardite, amigdalite crónica, laringite crónica, feridas crónicas e infecções biliares e urinárias. São exemplos dispositivos cujas superfícies abióticas estão associadas a infecções (tabela 2), os cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, implantes ortopédicos e da mama, pacemakers, válvulas cardíacas mecânicas, lentes de contato e diferentes tipos de próteses como as ortopédicas e as das cordas vocais, etc (4,14,23).

As infecções por biofilmes, apesar de existirem por diferentes etiologias, exibem características próprias e comuns entre si, tais como (16):

- Desenvolvimento preferencial em superfícies abióticas ou tecidos mortos;
- Taxa de crescimento lenta;
- Produção e libertação de antigénios, formação específica de complexos imunes que levam à lesão de tecidos adjacentes;
- Agravamento da condição infecciosa em indivíduos imunocomprometidos;

- Elevada resistência a antibióticos, podendo ser necessário recorrer a métodos mecânicos para remoção do biofilme;
- Desprendimento e migração de células bacterianas do biofilme que vão originar novas infecções agudas noutra local.

#### **4.1 Periodontite**

Em 1683, Antonie van Leeuwenhoek através de análises feitas à sua placa dentária observou e descreveu biofilmes pela primeira vez, usando o seu microscópio primitivo (26).

A periodontite é uma doença inflamatória que envolve a totalidade dos tecidos de suporte dos dentes, o chamado periodonto, que consiste no osso alveolar, gengiva e ligamento periodontal. Esta é causada, na maioria das vezes por uma inadequada higiene oral e é caracterizada por existir uma diminuição das gengivas, formação de bolsas e diminuição do osso. Muitas das vezes, a gengivite surge antes da periodontite, podendo não ocorrer em todos os pacientes e depende de três principais agentes: sensibilidade do hospedeiro, bactérias patogénicas e bactérias preventivas (14,28,29).

Os microrganismos patogénicos mais importantes associados à periodontite estão descritos na tabela 1.

A colonização microbiana da superfície dos dentes permite que os microrganismos invadam as células da mucosa e alterem o fluxo de cálcio nas células epiteliais, bem como a libertação de toxinas, conduzindo à cárie dentária e doença periodontal. Uma placa (designação comum para biofilmes dentários) pode desenvolver-se dentro de duas e três semanas, podendo mineralizar com iões cálcio e fosfato, formando assim o chamado tártaro ou cálculo (4,29–31).

#### **4.2 Fibrose Quística**




No início da década de 1970, Niels Højby observou, pela primeira vez, uma ligação entre a etiologia de uma infeção persistente e agregados de bactérias, em pacientes com Fibrose Quística (FQ) (26).

A FQ é uma doença genética que afeta principalmente o sistema respiratório e digestivo. É caracterizada pela disfunção das glândulas exócrinas que produzem secreções anómalas (produção de muco viscoso) e infeções crónicas. As glândulas normalmente produzem secreções fluídas que fluem facilmente pelos canais das glândulas até ao exterior, o que não acontece na FQ onde as secreções são mais espessas. Estas secreções vão provocar fenómenos de obstrução a vários níveis do organismo produzindo assim as diferentes

manifestações da doença. Este espessamento do muco é responsável por aumentar a incidência de infecções pulmonares bacterianas. A infecção pulmonar é uma das principais causas de morbidade e mortalidade. As principais bactérias que colonizam as vias respiratórias em jovens são a *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, sendo que em estadios mais avançados a *Pseudomonas aeruginosa* é a principal bactéria presente, embora outras espécies bacterianas também tenham sido identificadas como formadoras de biofilmes (14,26).


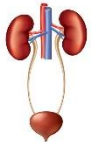

A infecção por *P. aeruginosa* muitas vezes começa com a colonização de biofilmes nos seios paranasais, que servem como reservatório para infecções pulmonares repetidas que se tornam crônicas. Análises microscópicas mostraram que a *P. aeruginosa* cresce em microcolônias aderentes aos componentes da expetoração. Em resposta à presença do biofilme, um grande número de leucócitos polimorfonucleares infiltram-se nessa área, produzindo uma inflamação crônica com subsequente dano tecidual, perda da função pulmonar e obstrução das vias aéreas. A atividade metabólica de bactérias e células consome o oxigênio disponível e produz condições anaeróbicas, o que parece favorecer o ainda mais o desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa* (14,26).

**Tabela 1. Infecções associadas a biofilmes humanos e principais espécies patogênicas causais. Adaptado de referências (7,15)**

<b>Exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes e espécies microbianas relevantes</b>	
	<b>Aparelho auditivo</b>   Otite média <i>Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa</i>
	<b>Cavidade oral</b>   Cáries dentárias, Gingivite, Periodontite <i>Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Tannerella forsythia, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Treponema denticola, Peptostreptococcus micros, Eubacterium timidum, Eubacterium Brachy</i>
	<b>Trato respiratório</b>   Fibrose Quística, Pneumonia <i>Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae</i>

**Tabela 1. Cont.**

## Exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes e espécies microbianas relevantes

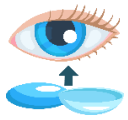





	<b>Trato gastrointestinal</b>   Gastroenterite <i>Escherichia coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>
	<b>Sistema urinário</b>   Infecções do trato urinário <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i>
	<b>Pele</b>   Queimaduras, Feridas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>

### **4.3 Infecções causadas por biofilmes associadas a cateteres urinários**

Os cateteres urinários são dispositivos médicos introduzidos através da uretra para a bexiga e podem ser de látex ou silicone. Podem ser sistemas fechados ou abertos. Num sistema aberto, a urina é drenada para um centro de recolha aberto, e, neste tipo de sistema as hipóteses de contaminação são maiores, o que pode levar a infecções do trato urinário (UTI) num curto espaço de dias. Já nos sistemas fechados, a urina acumula-se num saco próprio de colheita de urina, pelo que este tipo de sistema proporciona menos hipóteses de UTIs (4).

Os microrganismos mais comuns de serem encontrados neste dispositivo médico são *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e outras bactérias gram-negativas. Estes microrganismos entram nas vias urinárias por via extraluminal (pela migração de microrganismos ao longo da face externa do cateter urinário), através do meato ao longo da uretra, ou por via intraluminal (através da superfície interna do cateter vesical), quer pela utilização de equipamento contaminado ou pela perda da esterilização nas zonas de conexão. Posteriormente o mecanismo inicia-se com a deposição de componentes da urina sobre o cateter, formando assim um filme de proteínas. Este filme potencia a adesão de microrganismos, formando, por isso, o biofilme (4,26).

**Tabela 2. Exemplos de infecções por biofilmes associadas a dispositivos médicos e espécies microbianas relevantes. Adaptado de referência (14,15).**

<b>Exemplos de infecções por biofilmes associadas a dispositivos médicos e espécies microbianas relevantes</b>	
	<b>Lentes de contacto   Queratite</b> <i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Candida spp., Serratia spp. e Proteus spp.</i>
	<b>Prótese ortopédica</b> <i>Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, S. hominis, S. haemolyticus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis</i>
	<b>Prótese de válvula cardíaca</b> <i>Viridans, Streptococcus, Coagulase negative Staphylococci, Enterococci, Staphylococcus aureus</i>
	<b>Prótese das cordas vocais</b> <i>Candida albicans, Streptococcus mitis, Streptococcus Salivarius, Candida tropicalis, Streptococcus sobrinus, Staphylococcus epidermidis, Stomatococcus mucilaginous</i>
	<b>Cateter venoso Central</b> <i>Staphylococcus coagulase negativa, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Klebsiella pneumoniae</i>
	<b>Cateter urinário</b> <i>Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis</i>

## **5. Problema das infecções associadas a biofilmes – mecanismos de resistência**

De forma geral, a administração de antimicrobianos na forma livre apresenta algumas desvantagens tais como, a falta de seletividade para a localização dos biofilmes e risco de desagregação ou depuração do composto antes de atingir o alvo. Além disso, devido à elevada tolerância dos biofilmes, especialmente aos antibióticos, é geralmente necessária uma elevada dose terapêutica que leva a um risco aumentado de toxicidade sistêmica ao usar métodos convencionais de administração de fármacos (via oral, inalatória ou sistêmica). Através das vias de administração descritas são referidos muitos efeitos colaterais, como reações alérgicas, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, bem como danos à microbiota humana saudável (2,7,17).

## 5.1 Matriz EPS

A matriz EPS contribui principalmente para o aumento da tolerância aos antibióticos e da resistência dos biofilmes, em comparação com as células planctônicas. No entanto pouco se sabe sobre a matriz dos biofilmes, porque diferentes bactérias parecem produzir diferentes componentes da matriz (15).

Uma vez que a Matriz EPS do biofilme protege os microrganismos dos vários agentes antimicrobianos, a sua desorganização exporia tanto as células do biofilme libertadas quanto as residuais a esses agentes. Existem certas enzimas, como polissacarídeo-liases e DNases, que são capazes de romper os exopolissacarídeos, sendo que a DNase I e a Dispersina B são as principais enzimas que funcionam como potenciais agentes antibiofilme. A DNase I é capaz de digerir o DNA extracelular (eDNA) que está presente na estrutura do biofilme, enquanto a Dispersina B, uma hidrolase glicosídica, que quebra polímeros de  $\beta$  (1–6) N-acetilglucosamina (uma substância polissacarídea extracelular que facilita a agregação de bactérias) e pode dispersar camadas de EPS presentes em dispositivos médicos. Por sua vez, estas enzimas dispersoras de biofilme são mais eficientes quando administradas em combinação com agentes antimicrobianos de forma a matar as bactérias incorporadas na matriz (18,22).

## 5.2 Quorum sensing

Os biofilmes caracterizam-se por controlar a sua densidade populacional através de um mecanismo de comunicação célula a célula conhecido como *Quorum sensing*, um processo de regulação complexo que impede que a densidade celular do biofilme atinja um nível insustentável (18).

O *Quorum sensing* depende de moléculas sinalizadoras, os autoindutores. As lactonas N-acil-homoserinas (AHL) e diéster de borato-furanosil ou tetrahidroxi furano são exemplos de autoindutores. Os autoindutores são constantemente produzidos pelas células bacterianas, pelo que, à medida que a densidade celular aumenta, conseqüentemente, o nível de autoindutores também aumenta. Numa densidade celular específica, é alcançada uma concentração limite crítica de autoindutores, que é conhecida como nível de *quorum*. Durante esse tempo, a ligação recetor-autoindutor leva à repressão ou ativação de vários genes-alvo. Essa modulação do processo de *Quorum sensing* permite que as bactérias exibam uma resposta unificada que beneficie toda a comunidade bacteriana, mantendo o tamanho ideal do biofilme e coordenando os fenótipos de virulência. Essa resposta unificada permite que o

biofilme se comporte como um organismo multicelular, o que permite que a comunidade bacteriana se adapte às mudanças nas condições ambientais (18,25).

O benefício do *Quorum sensing* não se limita ao controle da densidade populacional, também demonstrou ajudar na disseminação de mutações benéficas por toda a colônia do biofilme, melhorar o acesso a nutrientes e contribuir para a tolerância a antibióticos (18).

### **5.3 Células Persistentes**

As células persistentes representam uma pequena subpopulação de células bacterianas que existem num estado dormente e exibem extrema tolerância antimicrobiana. Estas formam-se em condições de stress ambiental dentro do biofilme e apresentam características especiais: são metabolicamente inertes, de crescimento e replicação lentos, regulam o sistema de toxina-antitoxina, mostram inefetividade em relação aos antibióticos, regulam o metabolismo dos fosfatos e melhoram o sistema anti-oxidativo e de reparação do DNA (23).

Vários estudos já demonstraram que após o tratamento de um biofilme com antibióticos, uma pequena população de células persistentes permanecerá, independentemente da concentração de antibiótico utilizada. Quando o tratamento termina e a concentração de antibiótico diminui, essas células persistentes remanescentes atuam como um ponto de nucleação para repovoar o biofilme, produzindo uma infecção recorrente do biofilme. A maioria dessas células residentes no biofilme repovoado não exhibe tolerância ou resistência antimicrobiana adicional em comparação com as células originais que foram erradicadas, apoiando fortemente que o estado persistente é uma variante fenotípica e não uma mutação (3,18,23).

A presença de células persistentes dentro de biofilmes é talvez o mecanismo inato mais plausível de *Biofilm antibiotic tolerance* (BAT) descrito até agora (18).

### **5.4 Transferência horizontal de genes (HGT)**

O biofilme atua como um reservatório de genes de resistência antibiótica (ARGs, o resistome) que se considera ser responsável por fornecer resistência antibiótica a agentes patogênicos através da conjugação, transformação, e transdução de HGT. A HGT adapta as bactérias ao ambiente em mudança e favorece a formação de biofilmes e a resistência aos antibióticos. Fan et al. discutiram que a HGT mantém a estabilidade estrutural, integridade e robustez das comunidades microbianas (3).

## **5.5 Papel do eDNA**

A colonização de bactérias nas superfícies liberta proteínas, exopolissacarídeos e eDNA que conferem estabilidade e integridade estruturais e promovem a distribuição adequada de nutrientes ao biofilme. O eDNA é produzido por lise celular e secreções ativas. Um dos mecanismos relatados é que o eDNA anexa e complexa aminoglicosídeos e péptidos antimicrobianos carregados positivamente. Jakubovics e Burgess mostraram a importância do papel do eDNA na promoção da adesão bacteriana, mantendo a integridade estrutural, a evolução das bactérias através da recombinação genética e da HGT, protegendo contra os antimicrobianos, e servindo como fonte de fósforo (3).

## **5.6 Bombas de Efluxo**

As bombas efluxo são transportadores ativos proteicos incorporados nas membranas citoplasmáticas.

As famílias RND (*resistance-nodulation-division*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), SMR (*small multidrug resistance*), a superfamília MF (*major facilitator*) e a família de ligação ATP (ABC) são classes de bombas de efluxo de bactérias. As bombas efluxo induzem resistência antibiótica aos microrganismos expulsando toxinas intracelulares e também antibióticos para o meio extracelular. Vários genes da bomba de efluxo e a sua sobreexpressão no biofilme foram relatados como gene bomba efluxo PA1874-1877 em *P. aeruginosa*; as bombas efluxo RND exageradamente expressas como BCAL1672-1676 (RND-3) fornecem resistência contra tobramicina e ciprofloxacina enquanto que BCAM0925-0927 (RND-8) e BCAM1945-1947 (RND-9) protegem os biofilmes da tobramicina no complexo *Burkholderia cepacia* (3,25).

## **5.7 Papel das enzimas da matriz modificadoras de antibióticos**

Outro mecanismo importante para a resistência antibiótica é uma modificação enzimática de antibióticos para uma forma não tóxica dentro da matriz EPS. Essas enzimas, consideradas exotoxinas, aumentam a virulência e induzem resistência contra os antibióticos (3).

As enzimas Liases, Transferases de grupo, hidrolases e enzimas redox são as classes de enzimas modificadoras de antibióticos. Estas, modificam e, por conseguinte, inativam os antibióticos, quer através da quebra das ligações químicas necessárias ao funcionamento das enzimas, quer pela limitação da ligação dos antibióticos a locais específicos (3).

Temos assim o exemplo da  $\beta$ -Lactamase, que é secretada por biofilmes de *K. pneumoniae*, que destrói a ampicilina e inibe-a das células-alvo. No caso da fibrose quística, nota-se que uma síntese excessiva da AmpC cefalosporinase acaba por ter um papel importante no fornecimento de resistência antibiótica a *P. aeruginosa* (3).

## **6. Nanopartículas poliméricas como sistemas de veiculação de antibióticos**

### **6.1 Nanotecnologia**

A área da nanotecnologia tem crescido ao longo das últimas duas décadas (32). O termo nanotecnologia está relacionado com o desenvolvimento e uso de sistemas e materiais em nanoescala (1-1.000 nm) e com a aplicação dos conceitos de manipulação de materiais de níveis atômico, molecular e macromolecular (17).

As vantagens da nanotecnologia devem-se principalmente às características únicas dos materiais em nanoescala, que geralmente diferem das características dos materiais de nível macro (17).

As nanopartículas, surgiram como ferramentas promissoras com amplas aplicações nomeadamente na veiculação de fármacos, meios de diagnóstico, cosméticos e várias outras áreas biológicas e não biológicas (32).

A mudança nas propriedades dos materiais deve-se principalmente à relação superfície/massa, que faz com que sejam altamente reativos, afetando as suas propriedades mecânicas e elétricas. Devido à capacidade de controlar as propriedades mecânicas, magnéticas, óticas e catalíticas dos materiais, a nanotecnologia tem proporcionado inúmeros benefícios a todas as áreas da ciência. Quanto às desvantagens, o problema mais referido na área da nanotecnologia é o tamanho dos materiais, pois podem penetrar em qualquer sistema vivo incluindo no núcleo celular. Além disso, ainda não foram feitas investigações suficientes que permitam verificar o tempo de permanência desses materiais no meio ambiente ou as consequências a longo prazo, que podem acarretar a biopersistência desses materiais nos sistemas ecológicos e vivos. Portanto, os efeitos de curto, médio e longo prazo dos nanomateriais ainda precisam de ser melhor estudados e compreendidos (17,32).

Devido aos mecanismos de resistência e formação dos biofilmes, a eficácia dos antimicrobianos convencionais está a diminuir gradualmente. Uma estratégia promissora para reduzir a resistência bacteriana é a nanotecnologia, que faz uso de nanotransportadores para

entrega de fármacos e biomoléculas para a prevenção e tratamento de biofilmes bacterianos. A aplicabilidade desses sistemas no tratamento de biofilmes é variável, no entanto, os sistemas de libertação de fármacos baseados em nanotecnologia podem facilitar a interação direta dos fármacos com a estrutura complexa dos biofilmes e exercer ação durante os diferentes estágios da formação do biofilme. Dentro das principais capacidades desses sistemas, duas são predominantemente estudadas pelos investigadores, a interação direta com células planctónicas e a interação ou desnaturação da matriz EPS (17,33,34).

## **6.2 Nanopartículas**

A veiculação de antibióticos e de outras substâncias ativas nos biofilmes pode ser alcançada utilizando diferentes tipos de NPs, como por exemplo NPs inorgânicas, NPs lipídicas sólidas, lipossomas, microemulsões, nanoemulsões, ciclodextrinas e nanopartículas poliméricas (NPPs) (2).

### **6.2.1 Propriedades das NPs**

O tamanho e a forma, as propriedades da superfície e a carga das NPs são importantes a ter em conta no que diz respeito ao controlo da infeção por biofilme (33).

A forma e o tamanho das NPs têm relação com a sua distribuição e toxicidade, sendo que, o seu tamanho ideal é de aproximadamente de 100 nm. Foi relatado que nanopartículas de 100 nm exibiram uma absorção 2,5 vezes maior, em comparação com NPs de 1µm de diâmetro e uma absorção 6 vezes maior do que partículas de 10 µm. Os sistemas vascular e linfático são responsáveis pela filtragem e eliminação de substâncias estranhas e produtos químicos. Foi demonstrado que partículas de 200 nm ou superiores tendem a ativar o sistema linfático e são removidas da circulação mais rapidamente (35).

A manipulação das características da superfície também vai influenciar o reconhecimento das NPs por parte das células.

A carga da superfície das NPs é importante para que a atividade antimicrobiana seja direcionada para o local da infeção pois as interações eletrostáticas influenciam a interação entre a nanopartícula e a membrana celular da bactéria. Devido à composição da membrana celular das bactérias (carga negativa), o uso de nanopartículas catiónicas permitirá que a sua atividade seja otimizada, por exemplo utilizando polímeros como o PLGA ou o Quitosano.

A incorporação de ligandos de *targeting* apropriados, curvatura da superfície e a reatividade são fatores importantes tanto para a prevenção da agregação, como para permitir uma melhor

estabilidade, ligação ao recetor e efeitos farmacológicos subsequentes do fármaco. Como as nanopartículas podem ser reconhecidas pelo sistema linfático, quanto mais hidrofóbica for a NP, maior será a ligação aos componentes do sangue, e conseqüentemente, maior a probabilidade de ser eliminada, logo superfícies hidrofílicas aumentariam o tempo de circulação do fármaco (35,36).

### **6.3 Nanopartículas poliméricas**

Dentro dos vários tipos de NPs, as NPPs são amplamente estudadas como transportadores de fármacos para libertação controlada (32).

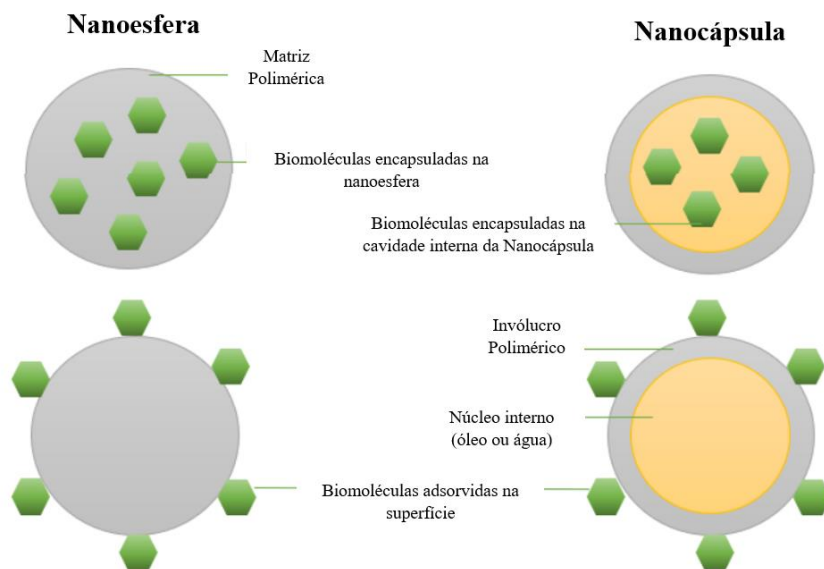
As NPPs podem ser sintetizadas a partir de diferentes materiais naturais ou sintéticos, bem como monómeros ou polímeros pré-formados, permitindo assim uma grande variedade de estruturas e características. Consoante o método de preparação, a organização estrutural do polímero e do fármaco podem diferir, conferindo à NP uma capacidade variável de veiculação dos fármacos, ou seja, o fármaco poderá estar em diferentes locais da NP, ora no seu núcleo, disperso em toda a partícula ou adsorvido na sua superfície. Assim sendo, é possível uma veiculação de vários tipos de fármacos pelas NPs, incluindo compostos hidrofóbicos, hidrofílicos, bem como com diferentes massas moleculares. Além disso, estas NPs são fáceis de transpor de escala, rentáveis e têm uma elevada estabilidade durante o armazenamento (7,13, 37).

De acordo com sua composição e organização estrutural, as formas mais comuns de NPPs são nanoesferas e nanocápsulas (Figura 4).

As nanoesferas são sistemas homogêneos formados por uma matriz polimérica sólida, neste caso, o fármaco pode estar distribuído no interior da matriz ou adsorvido à superfície. (17,35–37).

As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, envolvidas por uma membrana polimérica, que isola o núcleo (oleoso ou aquoso) do meio externo. Neste caso, a libertação é controlada pela difusão do fármaco através da camada polimérica, sendo assim, um fator determinante na sua veiculação. No caso de existirem interações iónicas entre o fármaco e o polímero, formar-se-ão complexos, que irão inibir a libertação do fármaco da cápsula, dificultando assim o processo de difusão. No entanto, estes complexos podem ser evitados adicionando agentes auxiliares, como o óxido de polietileno-óxido de propileno, que diminuirá as interações entre o fármaco e a matriz da cápsula, permitindo uma maior libertação do fármaco para os tecidos-alvo (17,35–37).

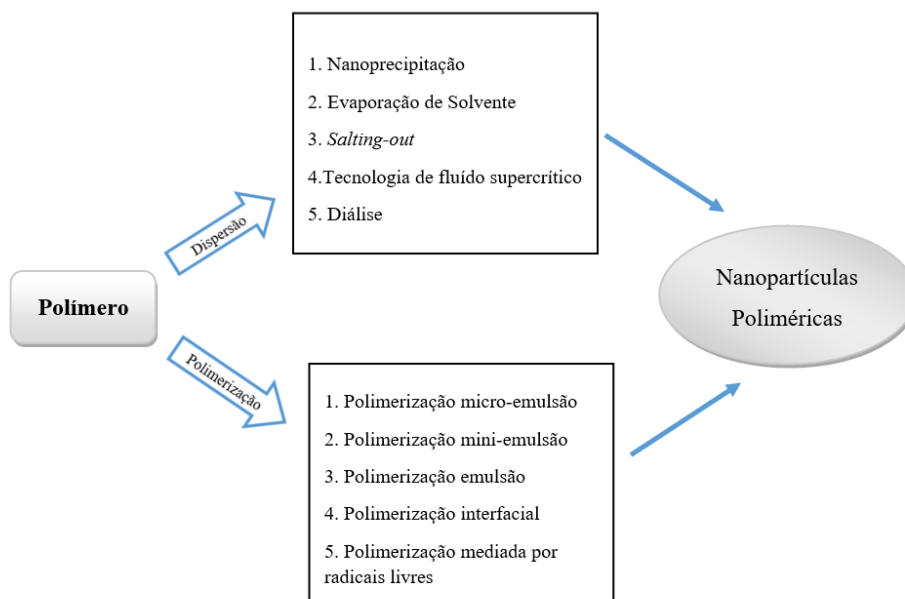
Dentro dessas duas grandes categorias, as NPs são ainda divididas quanto à sua forma, como polimerssomas, micelas ou dendrímeros. Os polimerssomas são vesículas artificiais, com membranas de blocos de co-polímeros anfipáticos, sendo comparados a lipossomas. As micelas poliméricas podem ser formadas a partir de co-polímeros anfipáticos, que se micelizam espontaneamente em solventes orgânicos, formando estruturas ramificadas com uma camada externa de polímero hidrofílico e um núcleo de polímero hidrofóbico. Já os dendrímeros são polímeros hiper-ramificados com arquiteturas tridimensionais complexas para as quais a massa, o tamanho, a forma e a química da superfície, podem ser controladas. Estes têm a particularidade de, no seu exterior, conterem grupos funcionais ativos, que permitem a conjugação de biomoléculas enquanto o fármaco é transportado no seu interior (37).



**Figura 4. Nanoesferas e Nanocápsulas. Adaptado de referência (38)**

#### **6.4 Métodos de preparação de NPPs**

Existem diferentes métodos de preparação de NPPs, os quais estão ilustrados na figura 5.

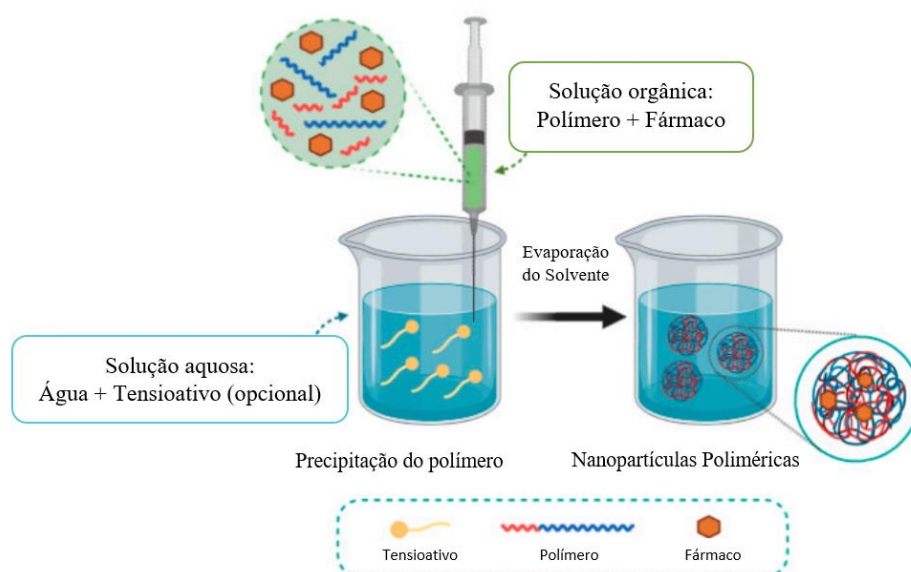


**Figura 5. Métodos de preparação de NPPs. Adaptado de referência (39)**

A seleção do fármaco e do polímero são fatores muito importantes, tal como a escolha do método de preparação que também desempenha um papel vital na aquisição das propriedades de interesse. O tipo de solvente utilizado e a sua proporção influenciam o tamanho da NP e o pH do meio de síntese influencia a taxa de libertação (39).

#### **6.4.1 Nanoprecipitação (NPC)**

A nanoprecipitação (Figura 6) é um dos métodos de preparação de nanopartículas poliméricas que também é conhecido como método de deposição interfacial ou deslocamento de solvente. Esta é uma técnica de encapsulamento que envolve a precipitação de polímeros, seguida da sua solidificação. Neste processo de preparação, o primeiro passo é a seleção de um solvente orgânico adequado, que deve ser miscível em água, e ao qual são adicionados o polímero e o fármaco. A fase aquosa que contém um estabilizador é adicionada com agitação contínua. Devido à diminuição da tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase orgânica, a difusão do solvente orgânico na fase aquosa ocorre muito rapidamente. Essa rápida difusão e o fluxo do solvente formam e caracterizam gotículas de nanopartículas bem definidas. Devido à eficiência, baixo custo e linha de produção simplificada, o método nanoprecipitação é o mais promissor para a transposição de escala de nanocápsulas para as indústrias farmacêuticas (36,39).



**Figura 6. Ilustração sistemática do método Nanoprecipitação. Adaptado de referência (36)**

#### **6.4.2 Evaporação do solvente**

A evaporação do solvente é uma das técnicas mais comuns de preparação de nanopartículas poliméricas. Primeiramente, para a fase orgânica, seleciona-se um solvente orgânico no qual o fármaco e o polímero são dissolvidos e dispersos. Por outro lado, a fase aquosa contém tensoativos como, polissorbato 80, PVA, etc. Depois, a fase orgânica é adicionada à fase aquosa e são então misturadas por homogeneização, a elevada velocidade, o que resulta na formação de uma emulsão estável, que é depois convertida numa suspensão de nanopartículas. Posteriormente, ao se aplicar uma temperatura aumentada e pressão reduzida, dá-se então a evaporação do solvente (36,39).

#### **6.4.3 Emulsificação - Difusão solvente**

Este método consiste na formação de uma emulsão O/A entre um solvente parcialmente miscível em água (como o álcool benzílico ou o acetato de etilo) contendo o polímero e o fármaco, e uma solução aquosa com um tensoativo. A diluição com uma grande quantidade de água induz a difusão do solvente, a partir das gotículas dispersas, para a fase externa, resultando na formação de partículas coloidais. Finalmente, dependendo do ponto de ebulição do solvente orgânico, esta última fase pode ser eliminada por evaporação ou por filtração. Geralmente, este método é utilizado para produzir nanosferas, no entanto, as nanocápsulas também podem ser obtidas adicionando à fase orgânica uma pequena quantidade de óleo (como triglicéridos: C6, C8, C10, C12). Com este método, é possível obter

NPs com dimensões entre 80 e 900 nm. De realçar que é um método muito utilizado, apesar da exigência de um elevado volume na fase aquosa e do risco de difusão de fármacos hidrofílicos nesta mesma fase (36).

## 6.5 Diferentes tipos de polímeros usados na preparação de NPPs

Os polímeros utilizados na preparação das NPPs podem ser divididos em 2 grandes grupos - naturais e sintéticos (tabela 3) (38).

Os polímeros mais utilizados para NPPs são o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), quitosano (QS) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e/ou mucoadesividade. Estes três polímeros são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e têm perfis de segurança adequados (7).

**Tabela 3. Classificação de polímeros baseada na sua origem. Adaptado de referência (38)**

Polímeros		Exemplos		
Naturais	À base de Polissacarídeos	Quitosano; Alginato; Ácido hialurónico; Dextrano; Amido; Agarose; Ciclodextrinas		
	À base de Proteínas	Albumina; Colagénio; Gelatina		
Sintéticos	Biodegradáveis	À base de fósforo	Polifosfazenos; Polifosfonatos	
		Polianidridos	Ácido polissebácico; Ácido poliadípico, Ácido politereftálico	
		Poliésteres	PLA; PLGA; PCL; Polihidroxibutirato	
		Poliamidas	Poli (imino carbonatos); Poliaminoácidos	
	Não-Biodegradáveis	Polímeros acrílicos	Polimetacrilato; Polimetilmetacrilato (PMMA)	
		Silicones	Sílica coloidal	
		Derivados de Celulose	Acetato de celulose	

## **6.5.1 Polímeros Naturais**

### **6.5.1.1 Quitosano**

O QS, polímero natural, biocompatível e biodegradável, é um polissacarídeo linear hidrófilo constituído por monómeros de Glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4).

Apesar do QS existir naturalmente na natureza, em alguns fungos, é geralmente obtido através do processo de desacetilação alcalina da quitina, tendo a quitina de ser previamente tratada. O QS é solúvel em soluções aquosas ácidas, tem baixa solubilidade a pH acima de 6,5 e geralmente, as NPs de QS podem ser formadas pela incorporação de um polianião, como trifosfato de sódio (TPP) no QS sob agitação constante. O método de preparação padrão para as NPs de QS é a gelificação iónica. Este método é principalmente adequado para moléculas de fármacos hidrofílicos, enquanto se for necessário encapsular um fármaco lipofílico podem ser utilizados um co-solvente e um tensoativo para melhorar a solubilidade aparente do fármaco. (39,40). O QS apresenta algumas vantagens e desvantagens: uma vantagem é o facto de possuir propriedades antimicrobianas intrínsecas e por apresentar propriedades mucoadesivas – permite a ligação a mucinas no biofilme, tornando-se um material atraente para os possíveis antimicrobianos; enquanto que a desvantagem recai no facto de poder ser degradado por lisozimas, enzimas frequentemente encontradas nas mucosas humanas e outros fluídos fisiológicos (7,39,40). Apesar da desvantagem apresentada, o mecanismo de ação do QS ainda não é totalmente conhecido. A hipótese mais aceite descreve interações eletrostáticas: os grupos amina positivamente carregados do QS interagem com as superfícies bacterianas carregadas negativamente, resultando em danos na membrana celular e, assim, fugas de componentes intracelulares. Além disso, foi também sugerido que o QS complexa iões metálicos que conduzem à produção de toxinas e, consequentemente, inibem a atividade enzimática que resulta em morte bacteriana. Finalmente, uma outra explicação possível é o facto do QS penetrar na célula e se ligar ao DNA intracelular, interferindo com a síntese do mRNA e de proteínas (7).

### **6.5.1.2 Alginato**

O alginato, um polímero de base natural, biodegradável e biocompatível por natureza, é um polissacarídeo linear formado por dois monómeros de base,  $\beta$ -D manuronato e  $\alpha$ -L-glucoronato ligados por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). As NPs de alginato são uma área de interesse emergente e podem ser preparadas por gelificação iónica e complexação, sendo facilmente controláveis e sensíveis ao pH (38,39).

## **6.5.2 Polímeros Sintéticos**

### **6.5.2.1 PLGA**

PLGA é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, sintetizado por copolimerização através da abertura do anel de dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) de ácido glicólico e ácido láctico. De salientar que, o PLGA sofre rapidamente hidrólise dentro do corpo. Muitos estudos foram feitos sobre este polímero, estudos toxicológicos indicaram que causa uma reação tecidual local (38,39).

Os fármacos lipofílicos são encapsulados nas partículas com o polímero PLGA através da utilização de óleo na emulsificação da água (O/A), enquanto para encapsular antibióticos hidrofílicos pode ser utilizada água em óleo em água (A/O/A). A nanoprecipitação é um método comum de preparação de nanopartículas de PLGA, o fármaco pode ser incorporado durante a produção das partículas ou adsorvido após a sua preparação (7, 38).

Entre uma vasta gama de polímeros, PLGA é o mais utilizado para entrega de fármacos, existindo vários estudos que relatam o uso de NPs de PLGA para a entrega de antibióticos em biofilmes bacterianos (13).

### **6.5.2.2 PLA**

O ácido polilático é não-tóxico, biodegradável e biocompatível, de natureza hidrofóbica. O PLA exhibe uma grande quantidade de resistência mecânica que, quando usado em condições otimizadas, pode produzir um sistema de libertação controlada de fármacos (38,39).

### **6.5.2.3 PCL**

O PCL é um polímero à base de poliéster hidrofóbico, sendo muitas vezes utilizado em combinação com outros polímeros ou componentes lipídicos (7).

A preparação de partículas de PCL é feita utilizando múltiplas técnicas, tais como evaporação de solvente de emulsão, evaporação de solvente de difusão e métodos mais simples, como a suspensão. Uma das principais vantagens das partículas de PCL é o facto de tornar possível a encapsulação de antibióticos hidrofílicos e lipofílicos independentemente da técnica de preparação, sem enfraquecer a atividade antimicrobiana do fármaco em questão. (38).

### **6.5.2.4 Poli(etilenoglicol) (PEG)**

O PEG é um poliéster hidrofílico não iónico, preparado através da polimerização do monómero de etilenoglicol. A sua massa molecular varia de 300 a 100.000 Da. A desvantagem de usar o PEG é que não é biodegradável e é excretado inalterado no rim, no

entanto não se acumula nos tecidos, graças à sua natureza hidrofílica. Além disso, pela sua natureza hidrofílica, pode ser usado para estabilizar a nanopartícula especialmente em meio aquoso, evitando a agregação devido ao impedimento estérico na produção e armazenamento. A aplicação do PEG também aumenta a solubilidade. Outra vantagem é que o PEG não envolve a fração iônica e, portanto, não ocorre nenhum problema quando o PEG está em contato com qualquer molécula carregada, como o DNA (22,39).

O PEG demonstrou reduzir a toxicidade das NPs, alterando as interações com proteínas. No entanto, deve-se notar que o aumento da quantidade de PEGulação pode alterar a captação celular das NPs e a sua eficácia como sistemas de liberação de fármacos (32).

#### **6.5.2.5 PEG-PLGA**

O PEG-PLGA é um exemplo de um co-polímero de bloco, biodegradável e que rapidamente se auto-organiza em micelas nanométricas, transportando o fármaco no seu interior e libertando-o de maneira dependente do tempo. O PEG-PLGA é uma molécula anfipática, sendo que, o PLGA hidrofóbico permanece no interior da micela, enquanto que, o PEG hidrofílico se encontra na sua camada exterior, atuando como “escudo” de proteção, o que torna assim possível o transporte de fármacos hidrofílicos, uma das vantagens deste co-polímero (39).

## 7. Atividade antibiofilme de nanopartículas poliméricas: estudos *in vitro* e *in vivo*

Diferentes exemplos de estudos mostraram o alto potencial das NPPs contendo antibióticos para o tratamento de biofilmes. Estudos esses que estão referidos na tabela 4 e serão seguidamente discutidos.

Nestes estudos existem vários fatores importantes a ter em conta, de modo a poder avaliar a qualidade das NPPs enquanto transportadoras de antibióticos, tais como: o tamanho das partículas, *drug loading* (DL), eficiência da encapsulação (EE), potencial zeta, perfil de libertação e atividade antimicrobiana.

### 7.1 Influência do tamanho das NPs

É estimado que o tamanho ideal das NPs se encontre entre os 100 e os 500 nm, porém, o “valor ideal” pode diferir consoante o local de aplicação e a via de administração. Por exemplo, para aplicações sistêmicas, são indicadas NPs até 200 nm, de forma a evitar a acumulação nos vasos sanguíneos enquanto que, para aplicações tópicas, as NPs podem apresentar tamanhos superiores a 200 nm de modo a promover a entrega do fármaco localmente (35,41). Em relação à via de administração, o tamanho pode ou não ser um fator importante, por exemplo, para atingir o biofilme em infeções gastrointestinais, o tamanho é um parâmetro menos crítico, enquanto para a libertação pulmonar de fármacos, o tamanho das partículas já é um fator crucial (7).

Comparando o DL de micropartículas (MPs) com NPs é evidente que é mais elevado nas MPs. A eficácia de NPs PLGA (300 nm) e MPs (12 mm) contendo CIP foi testada contra biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo que o *drug loading* foi significativamente maior para MPs (7,5% p/p) em comparação com NPs (4,3% p/p). Tanto as NPs como MPs demonstraram *in vitro* um desempenho antibiofilme semelhante contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, mas com uma diferença significativa entre as duas bactérias. A libertação sustentada de CIP tanto das NPs como das MPs foi igualmente eficaz na erradicação de *S. aureus* tal como o tratamento contínuo com uma solução de CIP, que proporcionam uma erradicação completa em 6 dias. Em contraste, a *P. aeruginosa* não foi totalmente erradicada, mas ocorreu uma redução sem diferenças significativas no número de bactérias sobreviventes entre NPs e

MPs, sugerindo que o tamanho das partículas não era um parâmetro crítico para o desempenho antibiofilme (mantendo a concentração de CIP constante) (42).

## **7.2 Potencial Zeta**

O PZ é uma medida da magnitude da repulsão/atração eletrostática ou das cargas entre partículas. Quanto maior o potencial zeta (acima de  $\pm 30$  mV) mais provável que a suspensão/emulsão seja estável, pois as partículas carregadas repelem-se umas às outras e essa força supera as forças de van der Waals que promovem a agregação. O PZ também pode ser usado para determinar se um fármaco está encapsulado na nanopartícula ou adsorvido na sua superfície. O valor do PZ das NPs pode ser adaptado, pela introdução de tensoativos ou outros revestimentos na superfície das NPs, como o PEG. Em diferentes estudos foi relatado que NPs com um PZ positivo elevado aderem melhor aos biofilmes, pela carga negativa da membrana das bacterias (36,43,44).

## **7.3 Drug loading e eficiência de encapsulação**

De forma a criar sistemas de veiculação de fármacos adequados, é importante ter uma elevada EE (percentagem de fármaco veiculado em relação à quantidade total de fármaco usado durante a formulação) e um elevado *DL* (percentagem de fármaco veiculado em relação à massa total da partícula). A eficiência de encapsulação de um fármaco em NPs aumenta com a concentração do fármaco até certo ponto e é dependente das propriedades físico-químicas do fármaco e do método de preparação (7).

As NPPs são frequentemente relatadas em diferentes estudos como tendo uma alta eficiência de encapsulação, no entanto, isso não aborda a dose do fármaco veiculado, parâmetro chave para a obtenção de sistemas terapêuticos eficientes. Por exemplo, o *drug loading* de partículas de PLGA é frequentemente relatado como sendo  $<1\%$ , o que significa que a maioria da partícula é o material transportador e que precisam de ser administradas quantidades muito grandes para atingir a dose terapêutica. Portanto, melhorar o *drug loading* é um fator importante para que este tipo de partículas seja utilizado na prática clínica (7,45).

Encapsular fármacos hidrofílicos dentro de um invólucro hidrofóbico pode ser um desafio, uma vez que existe uma baixa afinidade entre o fármaco e o polímero. Isto foi exemplificado por Kho et al. e Cheow et al., onde a eficiência de encapsulamento da Levofloxacina (LEV) em NPs de PCL foi de apenas 4-10%, resultando num *drug loading* de 0,3 a 0,4%. Porém, a libertação de LEV das NPs de PCL foi de 90% em 3 h o que demonstra

que, muito provavelmente, o fármaco foi adsorvido à superfície das partículas em vez de encapsulado (46,47).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para aumentar a quantidade de fármaco encapsulado nas NPs. A encapsulação de fármaco em NPs de PLGA pode ser melhorada pela modificação do pH da formulação durante a produção, como se pode verificar no caso da gentamicina hidrofóbica que foi melhorada de 6,4 para 22,4 µg/mg alterando o pH de 5 para 7,4 (48).

#### **7.4 Perfil de libertação das NPs e atividade antimicrobiana**

A libertação de um fármaco de uma NP depende de vários fatores, como do polímero utilizado e da sua solubilidade.

No caso do PLGA, as suas propriedades podem ser manipuladas para ajustar a cinética de libertação do fármaco. O perfil de degradação do PLGA é modificado, alterando a proporção dos seus monómeros de degradação (ácido lático e ácido glicólico), permitindo assim o controlo da cinética de libertação do fármaco. Como o ácido glicólico é mais hidrofílico que o ácido lático, quanto maior quantidade de unidades de ácido glicólico menor a hidrofobicidade, resultando numa maior absorção de água e, portanto, numa degradação mais rápida (7). Existem assim vários estudos que concluem que a libertação de antibióticos de NPs de PLGA revela perfis cinéticos altamente dependentes da solubilidade aquosa do fármaco encapsulado, como o exemplo da levofloxacina (LEV), solúvel em água, em que 80% foi libertada em 24 h, em contraste com a ciprofloxacina (CIP), pouco solúvel, em que apenas aproximadamente 20% foi libertada no mesmo período (49).

O perfil de libertação dos fármacos a partir das NPs pode ser bifásico, ou seja, é feita uma primeira libertação, normalmente em menor quantidade, seguida depois de uma libertação sustentada, de uma maior quantidade do fármaco, tendo este modelo se mostrado vantajoso em vários estudos. Temos o exemplo das NPs de PLGA com LEV e CIP contra o biofilme de *E. coli*, no qual uma subpopulação de bactérias sobreviveu apesar do tratamento com NPs-PLGA-LEV numa concentração acima da MBIC e ocorreu recrescimento. Em comparação, as NPs-PLGA-CIP suprimiram o recrescimento das bactérias, mesmo em concentrações tão baixas quanto 1/16 da MBIC. Assim, as NPs-PLGA-CIP, com 20% de libertação rápida seguida de sustentada, foram mais promissoras no tratamento de biofilmes *E. coli* (46). Outro exemplo é o caso das NPs-PLGA-Gentamicina, em que, foi realizado um estudo *in vivo* em ratos com uma infeção de *P. aeruginosa*. Aqui, foi notado que a

gentamicina livre foi capaz de reduzir a infecção após 24 h, mas os níveis bacterianos retornaram a níveis comparáveis aos controles com solução salina em 96 h. Em contraste, quando os animais foram tratados com a mesma concentração de gentamicina veiculada em NPs-PLGA, o efeito protetor da NP foi observado ainda depois de 96 h, presumivelmente devido à liberação sustentada de quantidade suficiente de gentamicina, mantendo as concentrações dentro da faixa terapêutica (48).

Temos ainda o exemplo do QS, em que a CIP é libertada de forma bifásica a partir de NPs de QS-DNase I, observando-se uma primeira liberação de 44% em 3 h, seguida por uma liberação sustentada nas próximas 21 h de 92%. Da mesma forma, temos a tobramicina, que quando encapsulada em NPs de QS com sulfato de dextrano, tem uma liberação de 15% em 1 h, havendo depois uma liberação sustentada de 25% em 60 h (50,51). Esta diferença na liberação pode ser atribuída a vários fatores, como a diferença no tamanho das partículas, bem como a presença de compostos solúveis em água, como por exemplo, a DNase I. Em estudos feitos com *E. coli* foi demonstrado que a massa molecular e o grau de desacetilação (GD) (fração de grupos amino na cadeia polimérica), acabam, também, por influenciar a atividade antimicrobiana das NPs de QS. É então notado que, com baixas massas moleculares de QS (entre 55 kDa e 155 kDa), a atividade antibacteriana para a *E. coli* é substancialmente maior, em comparação com massas moleculares de QS mais elevadas. Quanto ao GD, quanto mais elevado for este valor no QS, maior a contribuição para a densidade positiva da carga do QS, e conseqüentemente, para o grau de interações eletrostáticas, tendo uma maior atividade antibacteriana contra a *E. coli* (7).

**Tabela 4. Exemplos de NPPs contendo antibiótico para tratamento de biofilmes.**

	Polímero	AB	Classe do AB	Funcionalização adicional	Características físico-químicas da partícula	Método de preparação	Biofilme	Resultados	Ref.
NPPs	PLGA	GEN	Aminoglic.	--	<p><b>Form. A/O/A pH 5</b> Tamanho (nm): 251.6 PZ (mV): 1.5 Fármaco encapsulado: 6.4 µg/mg PLGA</p> <p><b>Form. A/O/A pH 7.4</b> Tamanho (nm): 241.3 PZ (mV): 0.7 Fármaco encapsulado: 22.4 µg/mg PLGA</p> <p><b>Form. S/O/A pH 5</b> Tamanho (nm): 302.4 PZ (mV): 2.3 Fármaco encapsulado: 7.3 µg/mg PLGA</p> <p><b>Form. S/O/A pH 7.4</b> Tamanho (nm): 358.5 PZ (mV): -0.4 Fármaco encapsulado: 21.0 µg/mg PLGA</p>	ESE	<i>P. aeruginosa</i>	<p>GEN livre: MIC (µg/mL) 1.5; MBC (µg/mL) 3.0; MBEC (µg/mL) 50</p> <p><u>Formulação A/O/A:</u> MIC (µg/mL) 3.0; MBC (µg/mL) 6.0; MBEC (µg/mL) 100.</p> <p><u>Formulação S/O/A:</u> MIC (µg/mL) 3.0; MBC (µg/mL) 6.0; MBEC (µg/mL) N/A</p> <p>A liberação controlada da GEN pode diminuir efeitos secundários indesejáveis.</p>	(7,48)
	PLGA, QS	CLA	Macrólido	--	<p><u>NPs-PLGA</u> Tamanho (nm): 252.6 PZ (mV): -15.2</p> <p><u>NPs-QS-PLGA</u> Tamanho (nm): 294.6 PZ (mV): +15.7</p> <p><u>NPs-QS-PLGA-CLA</u> Tamanho (nm): 416.5 PZ (mV): +19.9</p>	Difusão do solvente da emulsão	<i>S. epidermidis</i>	% de bactérias viáveis depois do tratamento com solução de CLA, NPs-PLGA, NPs-QS-PLGA, NPs-QS-PLGA-CLA 63.4, 69.8, 47.0 e 38.0%, respetivamente. As NPPs- QS-PLGA-CLA tiveram maior capacidade antimicrobiana vs NPs-PLGA e NPs-PLGA-QS	(17,44)
	PLGA Ou PCL	CIP ou LEV	Fluoroquinolona	--	<p><u>PLGA-CIP:</u> Tamanho (nm): 170±50 DL (% p/p): 0.55 EE %: 69</p> <p><u>PLGA-LEV:</u> Tamanho (nm): 190-240 DL (% p/p): 1.10-2.30 EE %: 16-22</p> <p><u>PCL-CIP:</u> Tamanho(nm): 170±60 DL (% p/p): 0.5 EE %: 54</p> <p><u>PCL-LEV:</u> Tamanho(nm): 230±80 DL (% p/p): 0.3 EE %: 4</p>	ESE	<i>E. coli</i>	<p>As NPs de PLGA têm uma maior EE e DL do que as NPs-PCL, tanto para a CIP como para a LEV, indicando uma maior afinidade das fluoroquinolonas para o polímero PLGA.</p> <p><u>CIP:</u> MIC: 0.012 µg/mL; MBIC: 0.90 µg/mL</p> <p><u>LEV:</u> MIC: 0.030 µg/mL; MBIC: 0.15 µg/mL.</p> <p>Com exceção das NPs-PCL-CIP, todas as outras formulações apresentaram um perfil de liberação bifásico.</p>	(7,46)
	PLGA ou PEG-PLGA	Tb	Aminoglic.	--	<p>Tamanho (nm): 225-902 PZ (mV): -9.6 ± 2.6 DL (%p/p): 0.168 ± 0.034 EE%: 3.36 ± 0.68</p>	Difusão do solvente da emulsão	<i>P. aeruginosa</i> <i>B. cepacia</i> ( <i>Bcc</i> )	<p>NPs de PLGA (carga negativa), com PEG de carga neutra e "inerte ao muco" pode reduzir a interação iónica adesiva das NPs de PLGA com o muco, facilitando a difusão das NPs no muco e nos biofilmes bacterianos. As NPs com Tb encapsulada (PZ: -13,2) mostraram penetração quase completa através do muco em &lt;10 h, enquanto para as NPs sem fármaco (PZ: -27,9 mV) apenas 40% penetraram o muco dentro do mesmo tempo, indicando que uma superfície menos negativa foi benéfica. A encapsulação da Tb aumentou fortemente a sua eficácia na erradicação dos biofilmes cultivados em condições estáticas ou fluidas. As NPs Tb-PEG-PLGA, carregados com menos de 0,77 mg/L antibiótico, conseguiram reduzir significativamente o CFU de biofilmes <i>P. aeruginosa</i> e biofilmes <i>B. cepacia</i>.</p>	(52)

**Tabela 4. Cont.**

	Polímero	AB	Classe do AB	Funcionalização adicional	Características físico-químicas da partícula	Método de preparação	Biofilme	Resultados	Ref.
NPPs	PLGA	CIP	Fluoroquinolona	--	Tamanho (nm): 300nm PZ (mV): -4.1 DL (%p/p): 4.3	ESE	<i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i> : MIC (µg/mL): CIP: 0,250 NP-PLGA-CIP: 0.125 MBEC (µg/mL): CIP: 16 NP-PLGA-CIP: 32. <i>S. aureus</i> : MIC (µg/mL): CIP:0.5 NP-PLGA-CIP: 0.5 MBEC (µg/mL): CIP: 128; NP-PLGA-CIP: >256	(42)
	PLGA ou PCL	LEV	Fluoroquinolona	--	NP-PLGA: Tamanho (nm): 80-190 DL (%p/p): 0.65-1.10 EE %: 15-16 NP-PCL: Tamanho (nm): 110-230 DL (%p/p): 0.3-0.4 EE %: 4-5	NPC ou ESE	<i>E. coli</i>	NPs LEV-PCL e LEV-PLGA preparadas por NPC- perfis de liberação monofásica em que ≈ 80% do fármaco é libertado na 1ª hora, e é libertado todo após 6h. NPs produzidas por ESE- perfis de liberação bifásica PLGA ≈ 80% do fármaco é libertado após 1 dia. PCL-perfil de liberação mais lento apenas ≈ 40% do fármaco é libertado após um 1 dia e apenas ≈ 75% é libertado após 6 dias. A MIC (0,03 µg/mL) e MBIC (0,15 µg/mL) indicam que o modo de crescimento das células bacterianas <i>E. coli</i> em biofilme resulta em 5 vezes mais tolerância a LEV do que na forma planctônica.	(7,49)
	PCL ou PLGA	IMP	Beta-lactâmico, subgrupo-Carbapenem	Cilastatina	NP-PCL-IMP Tamanho (nm): 132±20 EE %: 83 ± 2.2; DL % (PCL-IMP): 17.7 ± 0.6 NP-PLGA-IMP Tamanho (nm): 348±65 EE %: 76 ± 1.2 DL%: 17.2 ± 1.3	Dupla emulsão/evaporação	<i>K. pneumonia</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Os resultados da avaliação da eficácia antibacteriana mostraram que as NPs-PCL-IMP eram mais eficazes do que as NPs-PLGA-IMP e do que IMP livre, contra todos os isolados resistentes testados. A incorporação do IMP em nanocápsulas pode fornecer proteção contra enzimas de degradação bacterianas. NPs-PLGA - liberação rápida ocorre na fase inicial seguida por um período de liberação muito mais lento; NPs-PCL- demonstraram uma taxa de difusão lenta em todos os períodos de estudo de liberação.	(45)
	PCL	VCM	Glicopéptido	Dendrímero de poli (éster-amina) e metoxi polietileno glicol-b-poli(ε-caprolactona) (mPEG-b-PCL)	Tamanho (nm): 52-59 PZ (mV): -7,3 ± 1.3 DL (%p/p): 19.1	ESE	<i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> resistente à <i>Meticilina</i> (MRSA)	A proporção polímero:fármaco de 3:1 (p/p) é a concentração ideal que fornece o encapsulamento de VCM mais alto com NPs de tamanho (52,48 nm), PDI (0,103) e PZ (-7,3 mV) O estudo <i>in vivo</i> revelou que as NPs tiveram uma redução de 103 e 20 vezes na carga de MRSA em comparação com os ratinhos não tratados e tratados com VCM livre, respetivamente.	(47)
	QS, TPP	Oxa	Beta-lactâmico	DNase I	NP-QS-Oxa: Tamanho (nm): 158,3 PDI: 0.208 PZ: +10.5mV DL: 6.95% NP-QS-Oxa-DNase: Tamanho (nm): 166.7 PDI: 0.179 PZ: +8.3mV DL: 6.65%	Gelificação iônica	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	MIC (µg/mL) NP-QS-Oxa-DNase: 1 Oxa livre: 0.5. NP-QS-DNase-Oxa melhor atividade antibiofilme em todos os testes <i>in vitro</i> . NP-QS -Oxa-DNase reduziu a matriz do biofilme, a espessura e a quantidade de células viáveis. NP-QS -Oxa-DNase apresentou a maior erradicação de biofilmes de isolados clínicos.	(10)
	QS	Tb	Aminoglic.	DS	Tamanho (nm): 170-1250 PZ (mV): -4.9 - +2.4	Gelificação iônica	<i>P. aeruginosa</i>	Com as NPPs QS-Tb-DS os biofilmes foram inibidos em 70 a 80 % em concentrações de 25 µg/ml ou 5 µg/ml de Tb.	(51)

**Tabela 4. Cont.**

	Polímero	AB	Classe do AB	Funcionalização adicional	Características físico-químicas da partícula	Método de preparação	Biofilme	Resultados	Ref.
NPPs	QS	5-NFB	Nitrofurano	Micelas polissorbato 20 (P20)	QS-5-NFB-NP com P20: Tamanho $321.5 \pm 3.2$ nm PDI: $0.180 \pm 0.01$ PZ (mV): 32.3 – 47.1	Gelificação iônica seguida de <i>freeze drying</i>	<i>S. aureus</i>	NPs-QS-5-NFB com diâmetro de 321 nm, PDI de 0,18, PZ: +37 mV e EE de 44%, resultaram em bons parâmetros para aplicação tópica e estabilidade das nanopartículas. 5-NFB livre MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ): 0.4-0.9; QS-5-NFB-NPs MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ): 10.9-21.9	(41)

AB- Antibiótico; AMCA- 7-amino-4-metil-3-cumarinilacético; Aminoglic.- Aminoglicosídeo; CIP- Ciprofloxacina; CLA- Claritromicina; DL-*Drug Loading*; DS- Sulfato de Dextrano; EE- Eficiência de encapsulação; ESSE- Evaporação do solvente da emulsão; GEN- Gentamicina; IMP-Imipenem; LEV- Levofloxacina; MBEC- Concentração mínima de erradicação do biofilme; MBC- Concentração mínima bactericida; MBIC- concentração inibitória mínima de biofilme; MIC- Concentração mínima inibitória; MRSA- *S. aureus resistente à Metilina*; NPC- Nanoprecipitação; NPPs- Nanopartículas Poliméricas; Oxa-Oxacilina; PCL- poli( $\epsilon$ -caprolactona); PDI- índice de polidispersão; PEG- polietilenoglicol; PLGA- poli(ácido láctico-co-ácido glicólico); PZ- Potencial Zeta; QS- Quitosano; Ref.- Referência; Tb-Tobramicina; VCM- Vancomicina; 5-NFB- Análogo da Nifuroxazida.

## **7.5 NPPs contendo antibiótico para Tratamento de biofilmes associados a Fibrose Quística**

Exemplos de estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam o benefício do uso de Antibióticos veiculados em NPPs para o tratamento de biofilmes associados a FQ, estudos esses que estão referidos na tabela 5 e serão seguidamente discutidos.

**Tabela 5. Exemplos de Nanopartículas poliméricas contendo antibiótico para Tratamento de biofilmes associados a Fibrose Quística**

Polímero	AB	Classe do AB	Funcionalização adicional	Características físico-químicas da partícula	Método de preparação	Biofilme	Tipo de estudo	Resultados	Ref.
PLGA, PVA	CIP	Fluoroquinolona	DNase I; PL	<p><u>NPs-PLGA-CIP:</u> Tamanho (nm): 213.6 PDI: 0.085 PZ (mV): -12.9 DL (%p/p): 0.26</p> <p><u>NPs-PLGA-PL-CIP:</u> Tamanho (nm): 265 PDI: 0.099 PZ (mV): 30.8 DL (%p/p): 0.24</p> <p><u>NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I:</u> Tamanho (nm): 251.9 PDI: 0.122 PZ (mV): 28.9 DL (%p/p): 0.17</p>	Técnica derivada da NPC	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15692) <i>S. aureus</i> (ATCC 12600)	In vitro	<p><u>MIC (µg/ml) (<i>P. aeruginosa</i>):</u> CIP: 0,39; NPs-PLGA-CIP: 0,0625; NPs-PLGA-PL-CIP: 0,5; NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I: 0,5.</p> <p><u>MIC (µg/ml) (<i>S. aureus</i>):</u> CIP: 0,0975; NPs-PLGA-CIP: 0,125; NPs-PLGA-PL-CIP: 0,5; NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I: 0,5.</p> <p><u>Biofilme <i>P. aeruginosa</i>:</u> <u>Espessura (µm):</u> Controlo: 52; CIP: 33,8; NPs-PLGA-PL-CIP: 25,8; NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I: 19,1.</p> <p><u>Biomassa (µm<sup>3</sup>/µm<sup>2</sup>):</u> Controlo: 29,6; CIP: 22,9; NPs-PLGA-PL-CIP: 22,5; NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I: 16,7.</p> <p>A melhor atv. antibiofilme foi observada com NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I que eliminaram mais de 95% do biofilme, no segundo dia de aplicação, usando 0,0156µg/ml de CIP.</p>	(53)
PCL	CIP	Fluoroquinolona	Monoestearato de Sorbitano	<p>Tamanho (nm): 181.8 ± 10.7 PZ (mV): -21.3 ± 2.6 DL (%p/p): 1.85 EE%: 86.90 ± 0.83</p>	Deposição interfacial do polímero	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	In vitro	Os ensaios de crescimento revelaram uma atividade antibacteriana semelhante por parte da CIP livre e encapsulada. No entanto, devido à maior capacidade das LNC-CIP de permear o muco em comparação com o fármaco não encapsulado, podem ser esperadas concentrações mais altas de CIP no local da infeção usando as nanocápsulas.	(54)
QS	CIP	Fluoroquinolona	Alginato liase	<p><u>NPs-QS-CIP:</u> Tamanho (nm): 191±8.9 PDI: 0.257±0.042 PZ (mV): 14,6±1.2 (EE)%: 54.9±3.6</p> <p><u>NPs-QS-CIP-AgLase:</u> Tamanho (nm): 205.5±9.0 PDI: 0.302±0.031 PZ (mV): 12.2±2.1 (EE)%: 51.8±2.1</p>	Gelificação ionotrópica seguida de freeze drying	<i>P. aeruginosa</i>	In vitro e in vivo	<p><u>MIC (µg/ml) 24h:</u> CIP: 0,0625; NPs-QS-CIP: 0,125; NPs-QS-CIP-AgLase: 0,125.</p> <p><u>MIC (µg/ml) 48h:</u> CIP: 0,125; NPs-QS-CIP: 0,125; NPs-QS-CIP-AgLase: 0,125.</p> <p><u>MBEC (µg/ml) 24h:</u> CIP: 3; NPs-QS-CIP: 2; NPs-QS-CIP-AgLase: 1.</p> <p><u>Espessura (µm):</u> Controlo: 61,5; CIP: 50,7; NPs-QS-CIP: 34,5; NPs-QS-CIP-AgLase: 14,2.</p> <p><u>Biomassa (µm<sup>3</sup>/µm<sup>2</sup>):</u> Controlo: 36,2; CIP: 27,5; NPs-QS-CIP: 24,5; NPs-QS-CIP-AgLase: 9,1.</p> <p>NPs hemocompatíveis, não apresentaram toxicidade in vitro e in vivo em pulmões de ratos Wistar machos.</p>	(55)

**Tabela 5. Cont.**

Polímero	AB	Classe do AB	Funcionalização adicional	Caraterísticas físico-químicas da partícula	Método de preparação	Biofilme	Tipo de estudo	Resultados	Ref.
QS, Alginato	Tb	Aminoglicosídeo	DNase I	Tamanho (nm): 457 ± 12 PZ (mV): - 23,0 ± 1,5 DL (%p/p): 4.1-9.2 Tb (µg/mg polímero): 69.6 ± 6.4 EE Tb %: 34.8 ± 3.5	Emulsão	<i>P. aeruginosa</i>	<i>In vitro e in vivo</i>	NPs-Tb e Tb livre: ambos com MICs de 0,625 mg/L. Infecção por bactérias PA01 <i>in vivo</i> usando um modelo <i>G. mellonella</i> , as larvas foram tratadas com Tb livre ou NPs-Tb. As NPs ofereceram um efeito protetor, proporcionando 80% de sobrevivência, enquanto a Tb livre mostrou apenas metade desse valor, 40% de sobrevivência após 96 h. <u>NPs- Tb-DNase</u> : MIC contra PA01: 1.25 mg/L	(56)

AB- Antibiótico; AgLase- Alginato liase; CIP- Ciprofloxacina; EE- Eficiência de encapsulação; LNC- nanocápsulas de núcleo lipídico; MBEC- Concentração mínima de erradicação do biofilme; MBC- Concentração mínima bactericida; MBIC- concentração inibitória mínima de biofilme; MIC- Concentração mínima inibitória; PCL- poli( $\epsilon$ -caprolactona); PDI- índice de polidispersão; PEG- polietilenoglicol; PL-Poli-Lisina; PLGA- poli(ácido láctico-co-ácido glicólico); PZ- Potencial Zeta; QS- Quitosano; Tb-Tobramicina

Como referido anteriormente, para a libertação pulmonar de fármacos, o tamanho das partículas é um fator determinante. As NPs menores que 1000 nm são capazes de atingir as vias aéreas inferiores (brônquios terciários e bronquíolos), sendo capazes de evitar a captação por macrófagos alveolares. Se por sua vez, as NPs forem menores que 500 nm, como as descritas acima, estas são capazes de atingir os alvéolos (57).

A matriz extracelular do biofilme é proposta como um alvo adicional e fundamental a ter em conta, a fim de combater as infecções crônicas bacterianas. Para isso, foram desenvolvidas NPs funcionalizadas com DNase I capazes de combinar a libertação controlada de antibióticos e romper ativamente a matriz dos biofilmes. O tamanho das partículas (NPs-PLGA-PL-CIP-DNase I) obtidas (entre 200 e 300 nm), é adequado para difusão através dos poros do muco em pulmões cronicamente infetados. O PZ das NPs variou de acordo com o tipo de revestimento de superfície aplicado, com o PVA como único aditivo, foram obtidas NPs negativas (-13 mV), enquanto que com a adição de PL foram geradas NPs positivas (+ 30 mV), já a funcionalização com DNase I não teve efeito significativo na carga (+28.9). As NPs ativadas pela DNase I foram capazes de impedir a formação de biofilmes a partir de bactérias planctônicas, como também reduziram com sucesso a massa de biofilme, espessura e densidade de células vivas, como observado em ambiente dinâmico, num ensaio de formação de biofilme num sistema de células de fluxo (53).

Por outro lado, a CIP veiculada em nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), também permitiu uma maior permeabilidade no muco, libertação sustentada e melhor atividade

antibacteriana vs CIP livre. As LNC com ciprofloxacina de tamanho médio 180 nm mostraram um aumento de 50% da permeação do fármaco através do muco. Ao chegar ao local de ação, é desejada uma libertação controlada do fármaco a partir das nanocápsulas. Por isso, foi analisada a libertação de fármaco *in vitro* pelo método da diálise direta. O fluido pulmonar simulado tipo 3 foi escolhido como meio de libertação, uma vez que representa a composição típica do fluido bronquiolar do revestimento pulmonar. *In vivo*, é assumida uma libertação mais lenta para a aplicação pulmonar, especialmente para partículas dentro do muco, uma vez que o volume de fluido nos pulmões é muito limitado. A solução de CIP teve um aumento mais rápido da concentração no compartimento de medição com 97,9 % do fármaco presente durante as primeiros 4 h, devido à difusão livre do fármaco. Em contraste, a suspensão das nanocápsulas teve de libertar primeiro o fármaco das partículas e apenas 66,9 % do fármaco chegou ao compartimento de medição, em 4h. A libertação total de CIP das nanocápsulas foi atingida após 24 h. As nanocápsulas mostraram uma libertação sustentada, sendo promissoras para uma redução da frequência de dosagem (54).

O alginato é um componente encontrado abundantemente na matriz do biofilme de *P. aeruginosa*. Assim sendo, a Alginato Liase foi imobilizada na superfície de NPs de quitosano para aumentar a suscetibilidade da terapêutica antibiótica, dispersando a matriz do biofilme e melhorando a distribuição de antibióticos na matriz extracelular. Logo, as NPs-QS-AgLase-CIP podem interromper ativamente a matriz EPS do biofilme e aumentar a suscetibilidade de antibióticos sem causar toxicidade sanguínea e local ao epitélio pulmonar, podendo ser uma abordagem alternativa melhor contra infecções *P. aeruginosa* associadas a biofilmes em pacientes com FQ. Além disto, foi também demonstrada uma hemólise inferior a 1%, indicando potencial segurança da formulação desenvolvida (55).

A tobramicina, para o tratamento de infecções pulmonares por *P. aeruginosa* está associada ao aumento da esperança média de vida em doentes com FQ, nos últimos anos. No entanto, a eficácia deste aminoglicosídeo ainda é limitada pela sua incapacidade de penetrar o muco nos pulmões, levando a uma baixa exposição do antibiótico a bactérias residentes. A atividade antimicrobiana das NPs-Tb contra *P. aeruginosa* PA01 foi equivalente à Tb não encapsulada (MIC- 0,625 mg/L), o que indica que a eficácia da tobramicina não foi negativamente afetada pelo processo de formulação das NPs. *Galleria mellonella*, na sua fase larvar, foi utilizada como modelo *in vivo* para a infeção de *P. aeruginosa*. Foi notado que, a tobramicina impediu a mortalidade das larvas de forma dependente de dose. As NPs-Tb com dose 2,5 µg/mL de Tb não melhoraram a sobrevivência, resultando na mesma resposta do

grupo não tratado. Com doses crescentes de tobramicina, a sobrevivência aumentou, 25 µg/mL e 250 µg/mL apresentaram 40% e 90% de sobrevivência, respectivamente. Foi feito um estudo profilático onde as larvas foram tratadas com tobramicina livre ou NPs-Tb e usando a tobramicina em NP, a taxa de sobrevivência duplicou, em comparação com o uso de tobramicina livre, de 40 para 80%, realçando o efeito protetor das NPs e que a liberação controlada das NPs pode fornecer uma janela terapêutica alargada. Juntamente com estes resultados, analisou-se que, NPs de tobramicina, quer sejam ou não funcionalizadas com DNase, conseguem um bom resultado contra a *P. aeruginosa*, uma vez que tiveram efeitos antimicrobianos semelhantes contra as culturas PA01 com único aumento na MIC no caso das NPs funcionalizadas com DNase para 1,25mg/L. De salientar por fim que, a tobramicina, estando inserida em NPs e funcionalizada com DNase, representa também uma estratégia para ultrapassar a barreira do muco, aumentar as concentrações de fármacos locais, evitar efeitos adversos sistêmicos e melhorar os resultados das infecções pulmonares em FQ. (56).

## 8. Conclusão e Perspetivas Futuras

A resistência antibiótica é uma das consequências das comunidades de biofilmes bacterianos e que contribuí para o aumento das infeções crónicas. Os biofilmes têm alguns mecanismos de resistência adicionais em comparação com as bactérias na forma planctónica que dificultam a eficácia da terapêutica tradicional.

Existem enzimas, como polissacarídeo-liases e DNases, que são capazes de romper os exopolissacarídeos da matriz do biofilme facilitando a entrada das NPs no biofilme. Estas enzimas dispersoras de biofilme são uma mais valia quando administradas em combinação com agentes antimicrobianos em NPs pelo aumento da eficácia da terapêutica.

O tamanho, carga superficial, incorporação de ligandos de *targeting* apropriados e hidrofobicidade das NPs são parâmetros importantes para a sua eficácia. Devido à carga negativa das bactérias o uso de NPs catiónicas permitirá que a sua atividade seja otimizada, por exemplo utilizando Quitosano. Quanto mais hidrofóbica for a NP, maior a probabilidade de ser eliminada devido à maior ligação aos componentes do sangue, como tal, NPs hidrofílicas aumentariam o tempo de circulação da partícula.

As nanopartículas poliméricas são tecnologias promissoras no tratamento de infeções associadas a biofilmes com múltiplas vantagens relativamente às terapêuticas antimicrobianas convencionais como por exemplo, a capacidade de libertação dirigida e modificada de fármacos, incorporação de fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos, aumento da biodisponibilidade do fármaco, redução da toxicidade, minimização das flutuações entre concentrações tóxicas e subterapêuticas nos tecidos e otimização da efetividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes.

Os sistemas de nanopartículas podem vir a constituir uma alternativa viável à veiculação de antibióticos livres como forma de contornar a resistência aos antibióticos, no entanto ainda enfrentam muitos desafios em diferentes domínios, nomeadamente o facto da maioria dos artigos relatar apenas a atividade de diferentes nanoformulações em estudos *in vitro*, a falta de padronização nas abordagens metodológicas e principalmente a escassez de estudos *in vivo* para testar a eficiência e a segurança das NPs.

## 9. Referências

1. Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. Vol. 59, *Indian Journal of Microbiology*. 2019.
2. Pircalabioru GG, Chifiriuc MC. Nanoparticulate drug-delivery systems for fighting microbial biofilms: From bench to bedside. *Future Microbiol*. 2020;15(8):679–98.
3. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2021;52(4):1701–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
4. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2018;81(1):7–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
5. Qiu Y, Xu D, Sui G, Wang D, Wu M, Han L, et al. Gentamicin decorated phosphatidylcholine-chitosan nanoparticles against biofilms and intracellular bacteria. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;156:640–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.090>
6. Wille J, Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora’s box? *Biofilm*. 2020;2(May).
7. Birk SE, Boisen A, Nielsen LH. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2021;174:30–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.005>
8. Tits J, Cammue BPA, Thevissen K. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–19.
9. Al-Wrafy FA, Al-Gheethi AA, Ponnusamy SK, Noman EA, Fattah SA. Nanoparticles approach to eradicate bacterial biofilm-related infections: A critical review. *Chemosphere*. 2022;288.
10. Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Haselmann GM, Wang J, et al. Enhancing antibiofilm activity with functional chitosan nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix. *Carbohydr Polym*. 2018;200(July):35–42.
11. Makabenta JM V., Park J, Li CH, Chattopadhyay AN, Nabawy A, Landis RF, et al.

- Polymeric nanoparticles active against dual-species bacterial biofilms. *Molecules*. 2021;26(16).
12. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
  13. Pinto RM, Lopes-De-Campos D, Martins MCL, Van Dijck P, Nunes C, Reis S. Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(6):622–41.
  14. Banerjee D, Shivapriya PM, Gautam PK, Misra K, Sahoo AK, Samanta SK. A Review on Basic Biology of Bacterial Biofilm Infections and Their Treatments by Nanotechnology-Based Approaches. *Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci* [Internet]. 2020;90(2):243–59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40011-018-01065-7>
  15. Pinto RM, Soares FA, Reis S, Nunes C, Van Dijck P. Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. *Front Microbiol*. 2020;11(May):1–20.
  16. Caetano ACL. *Biofilmes e Antimicrobianos*. Faculdade Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa, Porto; 2018.
  17. Dos Santos Ramos MA, Da Silva PB, Spósito L, De Toledo LG, Bonifácio B vidal, Rodero CF, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: A review. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:1179–213.
  18. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem*. 2019;7(November):1–17.
  19. Valen H, Scheie AA. Biofilms and their properties. *Eur J Oral Sci*. 2018;126.
  20. Kassinger SJ, van Hoek ML. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. Vol. 5, *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2020.
  21. Vyas T, Rapalli VK, Chellappan DK, Dua K, Dubey SK, Singhvi G. Bacterial biofilms associated skin disorders: Pathogenesis, advanced pharmacotherapy and nanotechnology-based drug delivery systems as a treatment approach. *Life Sci* [Internet]. 2021;287(November):120148. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120148>

22. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522–54.
23. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front Microbiol*. 2021;12(May):1–19.
24. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* [Internet]. 2018;4(12):e01067. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
25. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8):2003–20.
26. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. Vol. 9, *Antibiotics*. 2020.
27. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–10.
28. Garaicoa JL, Bates AM, Avila-Ortiz G, Brogden KA. Antimicrobial prosthetic surfaces in the oral cavity—a perspective on creative approaches. *Microorganisms*. 2020;8(8).
29. Benoit DSW, Sims KR, Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano*. 2019;13(5).
30. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(11):2005–19.
31. Mercadante V, Scarpa E, De Matteis V, Rizzello L, Poma A. Engineering polymeric nanosystems against oral diseases. *Molecules*. 2021;26(8):1–35.
32. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe nanoparticles: Are we there yet? *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–22.
33. Liu Y, Shi L, Su L, Van der Mei HC, Jutte PC, Ren Y, et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem Soc Rev*. 2019;48(2):428–46.

34. Hu L. The Use of Nanoparticles to Prevent and Eliminate Bacterial Biofilms. *Antimicrob Res Nov Bioknowledge Educ Programs*, Mendez-Vilas, A(Ed) Formatex, Spain. 2017;344–50.
35. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. Vol. 26, *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018.
36. Bhattacharjee S. Polymeric Nanoparticles. *Princ Nanomedicine*. 2019;195–240.
37. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2021;20(2):101–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
38. Niculescu AG, Grumezescu AM. Polymer-based nanosystems-a versatile delivery approach. *Materials (Basel)*. 2021;14(22).
39. Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, Sadhu V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. Vol. 20, *Nano-Structures and Nano-Objects*. 2019.
40. Sabbagh F, Kim BS. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *J Control Release*. 2022;341:132–46.
41. Andrade LF de, Apolinário AC, Rangel-Yagui CO, Stephano MA, Tavares LC. Chitosan nanoparticles for the delivery of a new compound active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020;55:101363. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101363>
42. Thomas N, Thorn C, Richter K, Thierry B, Prestidge C. Efficacy of Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Micro- and Nanoparticles of Ciprofloxacin Against Bacterial Biofilms. *J Pharm Sci* [Internet]. 2016;105(10):3115–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.022>
43. Rasmussen MK, Pedersen JN, Marie R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>
44. Takahashi C, Ogawa N, Kawashima Y, Yamamoto H. Observation of antibacterial effect of biodegradable polymeric nanoparticles on *Staphylococcus epidermidis* biofilm using FE-SEM with an ionic liquid. *Microscopy*. 2015;64(3):169–80.

45. Shaaban MI, Shaker MA, Mady FM. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):1–12.
46. Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K. Antibacterial efficacy of inhalable antibiotic-encapsulated biodegradable polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells. *J Biomed Nanotechnol*. 2010;6(4):391–403.
47. Omolo CA, Kalhapure RS, Agrawal N, Jadhav M, Rambharose S, Mocktar C, et al. A hybrid of mPEG-b-PCL and G1-PEA dendrimer for enhancing delivery of antibiotics. *J Control Release* [Internet]. 2018;290:112–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.005>
48. Abdelghany SM, Quinn DJ, Ingram RJ, Gilmore BF, Donnelly RF, Taggart CC, et al. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4053–63.
49. Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K. Antibacterial efficacy of inhalable levofloxacin-loaded polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells: The effect of antibiotic release profile. *Pharm Res*. 2010;27(8).
50. Jothiprakasham V, Sambantham M, Chinnathambi S, Vijayaboopathi S. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017;73:21–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.09.003>
51. Chronopoulou L, Di Domenico EG, Ascenzioni F, Palocci C. Positively charged biopolymeric nanoparticles for the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Nanoparticle Res*. 2016;18(10).
52. Ernst J, Klinger-Strobel M, Arnold K, Thamm J, Hartung A, Pletz MW, et al. Polyester-based particles to overcome the obstacles of mucus and biofilms in the lung for tobramycin application under static and dynamic fluidic conditions. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;131(July):120–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.025>
53. Baelo A, Levato R, Julián E, Crespo A, Astola J, Gavaldà J, et al. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J Control Release*. 2015;209.

54. Torge A, Wagner S, Chaves PS, Oliveira EG, Guterres SS, Pohlmann AR, et al. Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;527(1–2):92–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.013>
55. Patel KK, Tripathi M, Pandey N, Agrawal AK, Gade S, Anjum MM, et al. Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Int J Pharm* [Internet]. 2019;563(March):30–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.051>
56. Deacon J, Abdelghany SM, Quinn DJ, Schmid D, Megaw J, Donnelly RF, et al. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *J Control Release* [Internet]. 2015;198:55–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.022>
57. Klinger-Strobel M, Lautenschläger C, Fischer D, Mainz JG, Bruns T, Tuchscher L, et al. Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis-where do we stand? *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(8):1351–74.