



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

MARIANA OLIVEIRA DE PAULA

**PREPARO DE LIPOSSOMAS CONTENDO
CIPROFLOXACINA: POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME PARA TRATAMENTO
DE FERIDAS**

Itajubá-MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

MARIANA OLIVEIRA DE PAULA

**PREPARO DE LIPOSSOMAS CONTENDO
CIPROFLOXACINA: POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME PARA TRATAMENTO
DE FERIDAS**

Qualificação submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Sachs

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Cristian
Ferreira Soares

Itajubá-MG

Agradecimentos

Quero expressar minha mais profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa e para minha jornada acadêmica como um todo.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Daniela Sachs, por seu apoio, orientação e paciência ao longo deste projeto. Ao meu coorientador, Professor Doutor Daniel Cristian Ferreira Soares, pelo apoio e suporte, expresso minha sincera gratidão. Seus conselhos e sugestões foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

As minhas colegas de laboratório, especialmente a Tainara Aparecida Nunes Ribeiro, doutoranda em química, e a mestranda Grazielle Aparecida dos Santos, que me ajudaram e me ensinaram muito, sem a ajuda e companheirismo de vocês este trabalho não seria possível.

Ao meu querido amigo e colega de profissão, Doutor Flávio Bastos Miguez, cuja generosidade, paciência e conhecimento foram inestimáveis durante todo este processo. Sua presença constante e sua disposição em compartilhar ideias, discutir soluções e encorajar-me em momentos difíceis foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao meu supervisor estrangeiro, que me recebeu durante meu estágio de curta duração nos Estados Unidos em sua universidade (Colorado State University), Professor Doutor Ketul Popat, e ao seu aluno doutorando Lizst Coutinho, por me receberem em sua instituição e pelo apoio contínuo durante minha estadia e na realização dos experimentos. Seus conhecimentos e expertise foram inspiradores e contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

À minha mãe, Maria Aparecida de Oliveira, cujo amor incondicional e apoio incansável foram meu alicerce em todos os momentos, expresso minha profunda gratidão. Suas palavras de encorajamento e apoio foram e sempre são a luz que me guiam em momentos mais desafiadores.

Ao meu marido, Henrique de Freitas Serra, agradeço por estar ao meu lado, por ser meu porto seguro e por compreender as demandas e desafios deste caminho acadêmico. Sua presença foi minha fonte de força.

A todos os amigos, familiares e colegas que de alguma forma contribuíram para este trabalho, meu mais sincero obrigado. Suas palavras de estímulo, incentivo e compreensão foram preciosas ao longo desta jornada.

Por fim, expresso minha gratidão à UNIFEI e ao programa de pós-graduação multicêntrico em química, pela oportunidade de realizar este mestrado e pelo ambiente propício à pesquisa e ao aprendizado.

Gratidão a todos e a Deus.

RESUMO

Feridas crônicas representam um fardo biológico, psicológico, social e econômico devido ao longo tratamento e necessidade de cuidados contínuos, impactando a qualidade de vida dos pacientes e os custos para o sistema de saúde. Infecções retardam a cicatrização e favorecem a formação de biofilmes bacterianos, que dificultam a ação de antibióticos. Alternativas como sais de prata podem ser tóxicas, e com o surgimento de cepas resistentes, terapias nanotecnológicas, como os lipossomas, oferecem maior eficácia e menos efeitos adversos devido à alta biocompatibilidade, não toxicidade e capacidade de proteger o fármaco. Em suma, este projeto tem por objetivo preparar lipossomas encapsulados com ciprofloxacina, caracterizá-los e analisar *in vitro* sua atividade antimicrobiana e antibiofilme com possível aplicação no tratamento de feridas. Para tal foi utilizado o método de evaporação de fase reversa para o preparo dos lipossomas com proporção lipídica de 75:20:5 de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol) (DSPE-PEG-2000) respectivamente. Para caracterização foram realizados testes como taxa de encapsulação do fármaco, tamanho de partícula, citotoxicidade, Alamar blue e fusogenicidade. Os estudos de concentração mínima inibitória e bactericida foram realizados em cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA - HU25, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, através da avaliação pela técnica de coloração com Resazurina e pela leitura de absorbância das placas em um fotômetro de microplacas. Para estudo da atividade antibiofilme foram preparados ensaios utilizando-se das concentrações mínimas inibitórias obtidas para as cepas bacterianas, e as técnicas utilizadas foram a de contagem de unidades formadoras de colônia e análise de microscopias de varredura e fluorescência. Os lipossomas preparados apresentaram uma taxa de encapsulação próxima a 29% e tamanho médio de partícula de 315 nm. Os lipossomas mostraram-se não citotóxicos e fusogênicos, enquanto os resultados para a atividade inibitória e bactericida foram satisfatórios, com eficiência superior à do fármaco puro e a atividade antibiofilme dos lipossomas foi observada. Esses resultados indicam que os objetivos do trabalho foram alcançados, os lipossomas foram preparados e caracterizados com sucesso, assim como os testes de atividades inibitória, bactericida e anti-biofilme. Onde os lipossomas encapsulados

demonstraram uma atividade superior ao fármaco isolado, destacando-se como uma alternativa promissora para o tratamento de feridas.

Palavras-Chave: Feridas Crônicas, tratamento, Lipossomas, biocompatibilidade, atividade inibitória, antibiofilme.

ABSTRACT

Chronic wounds represent a biological, psychological, social, and economic burden due to the prolonged treatment and need for continuous care, impacting patients' quality of life and healthcare costs. Infections delay healing and promote the formation of bacterial biofilms, which hinder the action of antibiotics. Alternatives like silver salts can be toxic, and with the emergence of resistant strains, nanotechnology-based therapies, such as liposomes, offer greater efficacy and fewer side effects due to their high biocompatibility, non-toxicity, and ability to protect the drug. In summary, this project aims to prepare liposomes encapsulated with ciprofloxacin, characterize them, and analyze their in vitro antimicrobial and anti-biofilm activity with potential application in wound treatment. The reverse-phase evaporation method was used to prepare the liposomes with a lipid ratio of 75:20:5 of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), distearoylphosphatidylcholine (DSPC), and distearoylphosphatidylethanolamine-(polyethylene glycol) (DSPE-PEG-2000), respectively. For characterization, tests such as drug encapsulation efficiency, particle size, cytotoxicity, Alamar blue, and fusogenicity were performed. The minimum inhibitory and bactericidal concentration studies were conducted on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA - HU25, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, through the evaluation using Resazurin staining technique and absorbance readings of the plates using a microplate reader. For the anti-biofilm activity study, assays were prepared using the minimum inhibitory concentrations obtained for the bacterial strains, and the techniques used were colony-forming unit counting and scanning and fluorescence microscopy analysis. The prepared liposomes showed an encapsulation efficiency of approximately 29% and an average particle size of 315 nm. The liposomes were found to be non-cytotoxic and fusogenic, while the inhibitory and bactericidal activity results were satisfactory, with efficiency superior to that of the pure drug, and the liposomes' anti-biofilm activity was observed. These results indicate that the study's objectives were achieved, the liposomes were successfully prepared and characterized, and the inhibitory, bactericidal, and anti-biofilm activity tests were successful. The encapsulated liposomes demonstrated superior activity compared to the isolated drug, highlighting them as a promising alternative for wound treatment.

Keywords: Chronic Wounds, treatment, Liposomes, biocompatibility, inhibitory activity, anti-biofilm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição anatômica da pele	14
Figura 2 - a) Diagrama de uma ferida na pele enquanto ela se fecha. B) Formação do coágulo. C) Inflamação. D) Angiogênese. E) Migração celular e proliferação. F) Reparação e resolução	16
Figura 3 - Exemplo de bactérias gram-positivas e gram-negativas.	18
Figura 4 - Diagrama esquemático e micrografia eletrônica de varredura de diferentes etapas na formação do biofilme de <i>S. suis</i> .	19
Figura 5 - Resistência biofilme a entrega de fármacos	21
Figura 6 - Representação de um lipossoma.	23
Figura 7 - Composição fosfolipídios.	24
Figura 8 - Fosfatidilcolina.	25
Figura 9 - Tipos de Lipossomas.	26
Figura 10 - Representação esquemática dos lipossomas de diferentes tamanhos	27
Figura 11 - Transição de fase dos fosfolipídios	27
Figura 12 - Influência das cadeias de ácido graxo na Tc.	28
Figura 13 - Fusão mediada por similaridade estrutural de lipossomas	28
Figura 14 - Método de hidratação de filme lipídico.	29
Figura 15 - Preparo lipossomas por REV.	30
Figura 16 - Formação dos lipossomas em REV	30
Figura 17 - Placa 48 poços para alamar realização citotoxicidade	38
Figura 18 – Placa montagem teste de Alamar blue.	39
Figura 19 – Placa para teste de fusogenicidade.	40
Figura 20 - Sequência de preparação da placa de CMI.	41
Figura 21 - Sequência do procedimento de diluição e adição de bactéria.	42
Figura 22 - Montagem placa para realização CMB	43
Figura 23 - Montagem placa para análise de CMI e CMB por leitura absorbância	45
Figura 24 - Montagem da placa para ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias.	46
Figura 25 – Placa teste atividade antibiofilme.	47
Figura 26 - Crescimento celular e fusogenicidade – dia 1	52
Figura 27 - Concentração de fármaco nos poços.	53
Figura 28 - Resazurina reduzida em Resorufina	54

Figura 29 - Placa de ensaio de concentração mínima inibitória para <i>E. coli</i>	54
Figura 30 - Placas de ensaios para determinação da concentração mínima bactericida.	57
Figura 31 - Concentração de fármaco nos poços das placas de CMI e CMB por absorvância	58
Figura 32 - Placas realizadas para contagem de UFC.	61
Figura 33 - Microscopia eletrônica de varredura <i>Staphylococcus aureus</i> em poliestireno.	63
Figura 34 - Microscopia eletrônica de varredura <i>Staphylococcus aureus</i> em vidro.	64
Figura 35 - Microscopia de fluorescência <i>Staphylococcus aureus</i> .	65
Figura 36 - Microscopia eletrônica de varredura <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em poliestireno.	66
Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vidro.	67
Figura 38 - Microscopia fluorescência <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	68
Figura 39 - Microscopia eletrônica de varredura <i>Escherichia coli</i> em poliestireno.	69
Figura 40 – Microscopia eletrônica de varredura <i>Escherichia coli</i> em vidro.	70
Figura 41 – Microscopia de fluorescência <i>Escherichia coli</i> .	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Característica lipossomal de acordo com metodologia de preparo com representações de tamanhos e tipos.	31
Tabela 2 - Valores de CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra <i>S. aureus</i> HU25.	57
Tabela 3 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra <i>S. aureus</i> .	58
Tabela 4 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco), lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra <i>S. epidermidis</i> .	58
Tabela 5 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra <i>E. coli</i> .	58
Tabela 6 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra <i>S. aureus</i> .	63
Tabela 7 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra <i>P. aeruginosa</i> .	63
Tabela 8 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra <i>E. coli</i> .	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Correlação linear das leituras de diferentes concentrações no HPLC.	49
Gráfico 2 – Distribuição tamanho de partículas TSLC.	51
Gráfico 3 - Grau de citotoxicidade em %.	52
Gráfico 4 – Quantidade de células viáveis no meio em % de Alamar blue reduzido – dia 1.	53
Gráfico 5 - Quantidade de células viáveis no meio em % de Alamar blue reduzido – dia 4.	53
Gráfico 6 – CMI e CMB <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	61
Gráfico 7 – CMI e CMB <i>Escherichia coli</i>	62
Gráfico 8 –CMI e CMB <i>Staphylococcus aureus</i> .	63
Gráfico 9 - Número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em biofilmes de <i>S.aureus</i> , <i>S.aureus HU-25</i> , <i>S.epidermidis</i> e <i>E.coli</i> .	66

LISTA DE SIGLAS

- ADSCs = Células-tronco derivadas do tecido adiposo (Adipose-Derived Stem Cells).
- CMB = Concentração mínima bactericida.
- CMI = Concentração mínima inibitória.
- DPPC = Dipalmitoilfosfatidilcolina.
- DSPC = Diestearoilfosfatidilcolina.
- DSPE-PEG 2000 = Distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol.
- EPS = Polissacarídeos extracelulares (Extracellular Polysaccharides).
- FITC = Fluoresceína Isotiocianato (Fluorescein Isothiocyanate).
- LUV = Vesículas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles).
- MLV = Vesículas multilamelares (Multilamellar Vesicles).
- MVV = Vesículas multivesiculares (Multivesicular Vesicles).
- REV = Evaporação de fase reversa (Reverse Phase Evaporation).
- SUV = Vesículas unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicles).
- TSL = Lipossoma termo solúvel.
- TSL B = Lipossoma termo solúvel branco.
- TSL C = Lipossoma termo solúvel contendo ciprofloxacina.
- UFC = Unidades formadoras de colônias.
- UV = Vesículas unilamelares (Unilamellar Vesicles).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Anatomia e Fisiologia da Pele	17
2.2	Feridas e processo de cicatrização	19
2.3	Feridas crônicas	20
2.4	Bactérias e biofilme	21
2.5	Tratamentos.....	24
2.6	Antibióticos e resistência bacteriana.....	25
1.1	Nanotecnologia e entrega de fármacos	26
1.2	Lipossomas.....	27
3	OBJETIVO	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	JUSTIFICATIVA.....	38
5	METODOLOGIAS.....	39
5.1	PREPARO DOS LIPOSSOMAS 	39
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	40
4.2.1	Taxa de encapsulação 	40
4.2.2	Tamanho médio de partícula DLS e potencial Zeta 	41
4.2.3	Biocompatibilidade 	41
4.3	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E BACTERICIDA (CMI E CMB)	45
4.3.1	CMI e CMB por indicador Resazurina 	45
4.3.2	CMI e CMB por absorvância 	48
4.4	POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBIOFILME	50
4.4.1	Biofilme por contagem de unidades formadoras de colônias 	50
4.4.2	Crescimento de biofilme em poliestireno e vidro 	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	53
5.2.1	Taxa de encapsulação	53
5.2.2	Tamanho De Partícula DLS.....	55
5.2.3	Biocompatibilidade	56
5.3	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E BACTERICIDA CMI E CMB	61

5.3.1	Concentração mínima inibitória e bactericida por Resazurina.....	61
5.3.2	Concentração mínima inibitória pela leitura de absorbância	65
5.4	POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....	70
5.4.1	Biofilme por contagem de unidades formadoras de colônias	70
5.4.2	Crescimento de biofilme em poliestireno e vidro	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
7	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Feridas podem ser consideradas uma "epidemia silenciosa", com causas variadas, incluindo procedimentos cirúrgicos, lesões, pressão, cisalhamento ou condições clínicas, como diabetes e doenças vasculares. Feridas que não seguem um processo normal de cicatrização e permanecem abertas por mais de um mês são classificadas como crônicas (FALANGA et al., 2022). A principal origem das feridas crônicas são infecções pós-cirúrgicas, seguidas por infecções relacionadas à diabetes. Outras causas comuns incluem úlceras venosas em membros inferiores, úlceras de pé diabético, úlceras de pressão e queimaduras (NUSSBAUM et al., 2018).

As feridas crônicas apresentam etiologias variadas e acarretam custos elevados para o sistema de saúde. Os tipos mais comuns de feridas crônicas são úlceras vasculares (venosas ou arteriais), úlceras diabéticas e úlceras de pressão, geralmente localizadas nos membros inferiores (THAARUP et al., 2022). As comorbidades mais associadas às feridas crônicas são doenças crônicas não transmissíveis, como Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e Diabetes Mellitus (DM), além de fatores de risco como dislipidemia, tabagismo e etilismo (HU et al., 2022). A presença simultânea de múltiplas doenças crônicas, denominada comorbidade, frequentemente complica o quadro das feridas crônicas, dificultando seu rastreamento como uma doença isolada (SEN, 2019). Elas são uma preocupação de saúde pública global que exige recursos significativos do sistema de saúde. A incidência de feridas crônicas tem aumentado como uma em proporções epidemiológicas (LUÍS CARLOS ANTUNES CLARO et al., 2023).

Nos Estados Unidos as feridas crônicas afetam 10,5 milhões de beneficiários do sistema de saúde e impactam cerca de 2,5% da população total, especialmente entre idosos. Essas condições acarretam uma variedade de complicações e custos elevados para a saúde (SEN, 2023) Uma pesquisa mostrou que em cinco anos, o número de beneficiários do sistema de saúde estadunidense com feridas aumentou de 8,2 milhões para 10,5 milhões (CARTER et al., 2023), com destaque para o crescimento de úlceras arteriais e distúrbios de pele, entre pacientes menores de 65 anos, e uma redução nas feridas traumáticas (CARTER et al., 2023). Na Austrália,

um estudo de modelagem realizou estimativas para o cenário de feridas crônicas no país, sendo o custo total de \$2,85 bilhões por ano destinados ao tratamento delas, representando 2% do total dos gastos governamentais em saúde na Austrália (GRAVES; PHILLIPS; HARDING, 2022). No Brasil, as feridas crônicas representam um grave problema de saúde pública. Estima-se que a prevalência de feridas crônicas na população é de 2,2 por 1.000 habitantes (DANTAS et al., 2022). Segundo a Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vasculiar (SBACV), mais de 282 mil cirurgias de amputação de membros inferiores foram realizadas no Sistema Único de Saúde (SUS) entre janeiro de 2012 e maio de 2023, sendo metade dos pacientes diabéticos (SBACV, 2023). A demanda por produtos para tratamento de feridas nos maiores mercados de curativos do mundo, EUA e Europa, é significativa. Globalmente, o custo anual para o tratamento de feridas foi de US\$2,8 bilhões em 2014. Dessa maneira, o mercado de tratamento de feridas voltado para feridas cirúrgicas e úlceras crônicas pode chegar a US\$ 22 bilhões até 2024, impulsionado principalmente pelo aumento da incidência de feridas crônicas e consequentemente da demanda, aumento da população geriátrica e avanços tecnológicos nessa área (SEN, 2019).

O processo de cicatrização de uma ferida requer uma sequência de eventos sistêmicos simultâneos e/ou paralelos que envolvem todo o organismo, sendo mais complexo do que um evento local (WANG et al., 2024) . O reparo de feridas em indivíduos saudáveis acontece em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelação, que se inicia e termina em aproximadamente seis semanas com a total cicatrização, porém qualquer mudança ou interferência nesse processo pode prolongar o processo de cicatrização (MORGUETTE et al., 2023). A fase inflamatória se inicia assim que o corpo atinge uma certa estabilidade no ferimento (homeostase) e tem como objetivo a limpeza da região e expulsar qualquer material estranho do local. Cerca de três dias após o dano tecidual ocorre a proliferação, fase que envolve fibroblastos e produção de colágeno e outras moléculas que serão responsáveis pela remodelação tecidual. E por fim, depois de duas a três semanas ocorre a restauração do colágeno e o tecido da ferida amadurece, restaurando assim o tecido (JONIDI SHARIATZADEH et al., 2025). Atenção e cuidados apropriados devem ser realizados para que a regeneração tecidual ocorra de maneira correta. Caso contrário, uma ferida pode servir como porta de entrada para diversos microrganismos terem acesso ao

interior do corpo, além do comprometimento do processo de cicatrização (MORGUETTE et al., 2023), causando danos sociais e redução da qualidade de vida do paciente. Infecções são os maiores contribuintes para a cronicidade de uma ferida, já que elas interferem diretamente no processo de reparação e crescimento do tecido além de modificar a resposta inflamatória (GANESH et al., 2015). Um desequilíbrio na interferência de microrganismos, como bactérias, pode acarretar problemas como a degradação do colágeno, estresse e desnutrição, impedindo a cicatrização normal de ferimentos (MORGUETTE et al., 2023).

As bactérias são amplamente presentes na natureza, e a maioria das feridas cutâneas agudas cicatrizaram na presença da flora normal da pele, a infecção ocorre quando o equilíbrio entre a carga bacteriana, virulência e imunidade favorece estes microrganismos (GAJULA; MUNNAMGI; BASU, 2020). A maioria das bactérias presentes em feridas crônicas está em estado de biofilme, ele é geralmente definido como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma interface e envoltos em uma matriz polimérica. Essa organização contribui para manter a ferida em um estado de inflamação prolongada e não cicatrizante (DURAND et al., 2022).

A despeito dos inúmeros tratamentos disponíveis, as melhores práticas atuais de tratamento de feridas visam principalmente tratar as causas secundárias de cronicidade, como a formação do biofilme, persistente e resistente a antibióticos. Outras alternativas, como sais de prata, reduzem a carga bacteriana, entretanto são citotóxicos para o hospedeiro, enquanto formulações modernas baseadas em nanotecnologia, como por exemplo nanopartículas, têm menor citotoxicidade e podem promover a cicatrização de feridas (NQAKALA et al., 2021). Os sistemas baseados em nanotecnologia detêm um imenso potencial no aumento da eficácia terapêutica de fármacos (NEVES et al., 2022; WANG et al., 2019), inúmeros nano sistemas de liberação de fármacos estão sendo adotados para a cicatrização de feridas e regeneração da pele, melhorando a eficácia dos antimicrobianos e os auxiliando a superar a resistência bacteriana em casos selecionados (GÜVEN, 2021). Portanto, não é surpreendente que uma grande proporção da pesquisa recente sobre feridas tenha se concentrado no desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e anti-biofilme (WILKINSON; HARDMAN, 2020). Inúmeros nanossistemas de liberação de fármacos que transportam agentes terapêuticos foram desenvolvidos e estão sendo implementados de forma inédita na promoção da cicatrização de feridas,

principalmente os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas lipídicas, estruturas nano fibrosas e nano hidrogéis(CAI et al., 2024; FÁTIMA et al., 2024; HOU et al., 2024; ZHANG et al., 2024) (ENGEL et al., 2008; GAINZA et al., 2015; KORRAPATI et al., 2016; WANG et al., 2019a). Como alvo deste trabalho, os lipossomas são vesículas esféricas, constituídas por uma ou mais bicamadas de lipídios, que possuem a capacidade de isolar compartimentos internos do meio externo, possuindo uma alta biocompatibilidade (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020). Eles podem acomodar moléculas hidrofóbicas, aprisionadas entre a bicamada lipídica, hidrofílicas ou anfifílicas, podendo ser encapsulados no núcleo (COSTA; SANTOS, 2017). Além dos benefícios oferecidos por nanossistema liberadores de fármacos, como liberação controlada e sustentada de fármacos (GÜVEN, 2021), lipossomas são atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis com a pele e capazes de prevenir a degradação do fármaco (WANG et al., 2019a). Essas nanopartículas são fabricadas redirecionando os fosfolipídios, em meio hidrofílico, onde espontaneamente eles se organizam formando as vesículas em busca de diminuir as forças internas desfavoráveis. Uma outra característica atrativa é a possibilidade de modificações na bicamada para viabilizar o transporte de fármacos em meios biológicos, como a inserção de polietilenoglicol, peptídeos e carboidratos, conferindo mais especificidade ao modelo de entrega de fármacos (PEREIRA et al., 2024). Com a soma desses fatores, os lipossomas configuram uma alternativa eficaz e inovadora para o tratamento de feridas, proporcionando um sistema avançado de entrega de fármacos e a possibilidade de otimização de sua estrutura garante uma maior biocompatibilidade, assegurando seu grande potencial para atuar na cicatrização e redução da cronicidade das feridas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

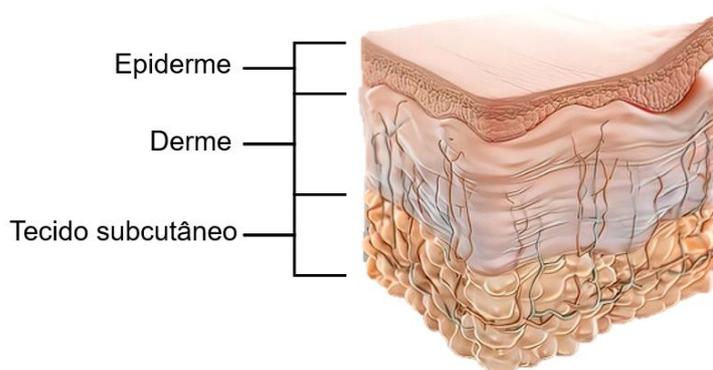
2.1 Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, é uma estrutura complexa que desempenha uma variedade de funções fisiológicas essenciais. Atuando como um sistema de barreira primária, ela protege o organismo contra agentes patogênicos externos, como microrganismos e substâncias químicas nocivas, mitigando assim o

risco de infecções e lesões cutâneas (LEE; KIM, 2022). Além da proteção do corpo humano, ela também desempenha um importante papel em funções regulatórias como manutenção térmica.

A pele representa cerca de 15% do peso corporal total de um adulto e tem uma área de superfície de aproximadamente 2 m². Do ponto de vista anatômico, ela é composta por três camadas principais (Figura 1): a epiderme, a derme e a hipoderme (ou tecido subcutâneo), cada uma com características estruturais e funcionais distintas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). A epiderme é a camada mais externa da pele, composta principalmente por queratinócitos, células fibrosas que conferem resistência e proteção à primeira camada da pele (SILVA et al., 2024). A derme é composta por componentes intersticiais e celulares, é uma região vascularizada e possui canais linfáticos e nervos sensoriais (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). Por fim o tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele, composta por células de gordura (adipócitos) e fibras que a conectam à derme (SILVA et al., 2024).

Figura 1 - Composição anatômica da pele



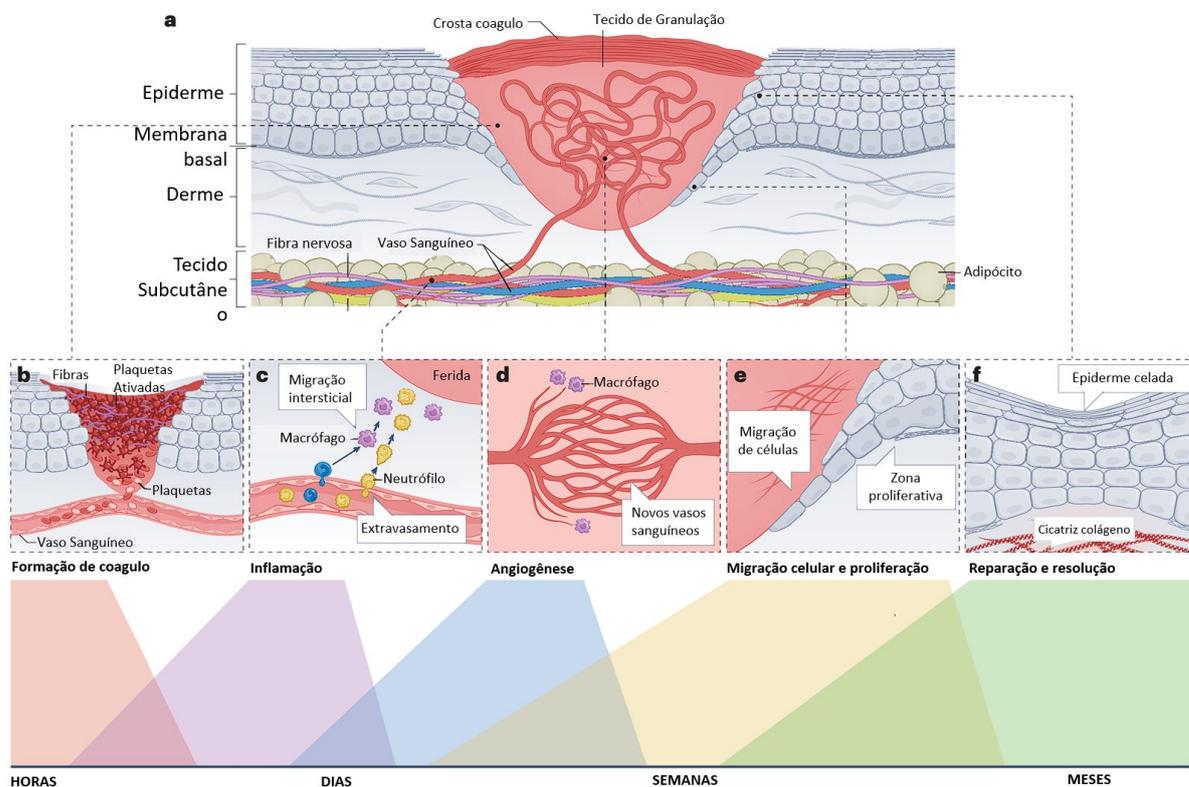
Fonte: Adaptado de (ANON, 2023)

Apesar de uma barreira potente e eficiente, diversas comunidades microbianas prosperam na superfície fazendo com que o maior desafio para o sistema imunológico da pele seja o de resistir a infecções, em condições normais, sem a geração de um recrutamento celular ou resposta inflamatória (MA et al., 2024). Uma defesa enfraquecida devido a situações atípicas, como uma lesão, pode comprometer a proteção contra estes agentes infecciosos, aumentando o risco de infecção, desencadeando respostas imunológicas mais complexas (MA et al., 2024).

2.2 Feridas e processo de cicatrização

Uma ferida ou lesão em uma área de dano na pele, pode ocorrer devido a vários fatores, como cortes, abrasões, queimaduras, contusões, picadas de insetos, ou mesmo por condições médicas subjacentes (SEN, 2019). Quando lesionada, a pele entra no processo de cicatrização, que em sua essência consiste numa reposta sequencial do corpo a fim de reparar o tecido e conter a entrada de agentes externos (Figura 2A). No primeiro momento (Figura 2B), em horas após o ferimento, ocorre a formação de um coágulo na barreira mais externa da pele (PEÑA; MARTIN, 2024), o qual consiste em uma agregação de trombócitos e plaquetas em uma rede de fibrina, contando com a ação de fatores específicos através da ativação e agregação dessas células (JONIDI SHARIATZADEH et al., 2025). Posteriormente, a resposta inflamatória da ferida entra em ação, acontecendo dentro de horas e podendo durar alguns dias após ferimento, onde os neutrófilos e macrófagos, são atraídos, por sinais de dano e dos patógenos, recrutados por extravasamento dos vasos próximos antes de migrarem para a ferida (Figura 2C) (PEÑA; MARTIN, 2024), Essas células inflamatórias coordenam a formação de um tecido de granulação que será um substituto para o tecido danificado, esse tecido começa a se formar aproximadamente quatro dias após a lesão, ele é formado devido a um aumento na proliferação dos fibroblastos e biossíntese de colágeno e elastina, que cria uma rede tridimensional extracelular de tecido conjuntivo (ARIF; ATTIOGBE; MOULIN, 2021). Nesta etapa também há o envolvimento da formação de novos vasos sanguíneos no local, chamada de angiogênese (Figura 2D). À medida que o tecido de granulação é depositado e os vasos sanguíneos vão se formando, há o impulsionamento da migração epitelial quanto a divisão celular para restaurar a integridade da barreira (Figura 2E) (PEÑA; MARTIN, 2024), e assim por fim, esses episódios cessam quando as bordas da ferida se confrontam e a ferida está curada (Figura 2F), gerando a restauração completa do tecido em casos mais leves ou a resolução da ferida com formação de cicatrizes em casos de danos mais severos.

Figura 2 - a) Diagrama de uma ferida na pele enquanto ela se fecha. B) Formação do coágulo. C) Inflamação. D) Angiogênese. E) Migração celular e proliferação. F) Reparação e resolução



Fonte: Adaptado de (PEÑA; MARTIN, 2024)

Para que a cicatrização ocorra de maneira adequada, além de as respostas sequenciais do sistema acontecerem de forma correta, uma higienização e tratamento médico adequado é importante para prevenir infecções.

2.3 Feridas crônicas

As feridas podem ser classificadas de diversas formas, com base em características como profundidade, tempo de evolução e conteúdo microbiano. Essas classificações são fundamentais para a escolha do tratamento mais apropriado e para a compreensão do processo de cicatrização (ANDRADE et al., 2019). No que diz respeito à profundidade, as feridas podem ser superficiais ou epidérmicas, afetando apenas a camada mais externa da pele, a epiderme; de espessura parcial, envolvendo a epiderme e parte da derme, a camada subjacente; ou de espessura total, que atravessam todas as camadas da pele e atingem tecidos subjacentes, como músculos e ossos (LOPES, 2016). Além disso, as feridas podem ser classificadas pelo tempo de evolução, sendo categorizadas como agudas ou crônicas. Feridas agudas seguem

o processo normal de cicatrização, enquanto as feridas crônicas não cicatrizam adequadamente, permanecendo abertas por longos períodos (ANDRADE et al., 2019). Estas últimas são frequentemente associadas a condições subjacentes, como problemas circulatórios, diabetes ou infecções. Por fim, as feridas também são diferenciadas com base no conteúdo microbiano, sendo classificadas como sépticas, quando há presença de infecção, ou assépticas, quando não há infecção presente (CHAVES et al., 2017).

O termo ferida crônica é caracterizado pela incapacidade de cicatrização de uma lesão, resultando numa descoordenação nos eventos sequenciais do processo que perturba a recuperação da região dentro de um intervalo de tempo aceitável (FALANGA et al., 2022). Existem diversos fatores que podem influenciar no surgimento de feridas crônicas, como insuficiência venosa, alterações vasculares e neuropáticas associadas ao diabetes e as úlceras relacionadas com mecanismos de pressão (VIEIRA; ARAÚJO, 2018).

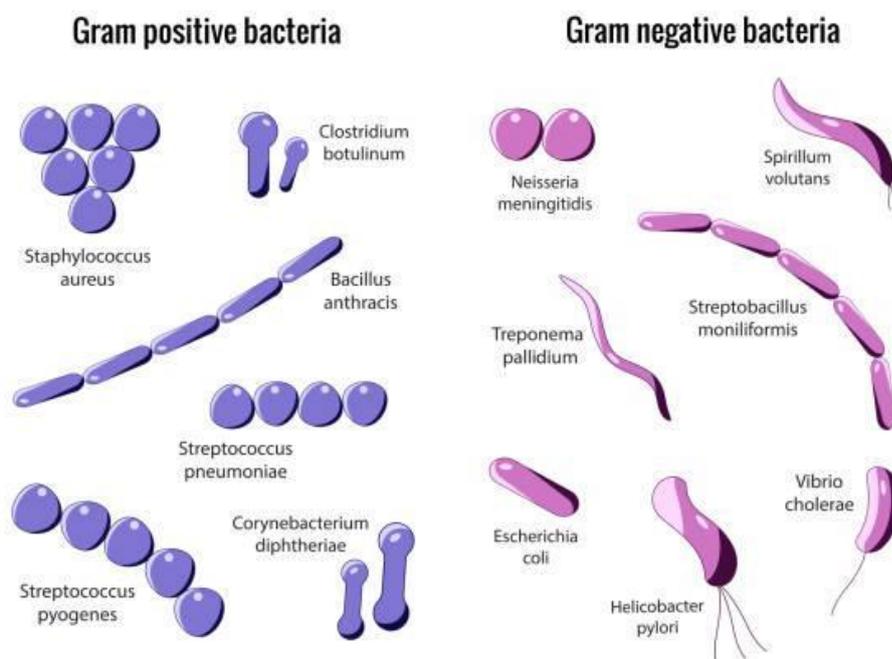
O grau de cronicidade de uma ferida é proporcional ao grau de infecção gerada pelos microrganismos que permearam e adentraram o local danificado devido ao longo tempo de exposição e vulnerabilidade da região (NTENTAKIS et al., 2021). A susceptibilidade a presença de bactérias, pode desempenhar um papel significativo na dificuldade de cicatrização. A presença prolongada delas na ferida pode criar um ambiente propício para a inflamação persistente e a interrupção do processo de cicatrização (THAARUP et al., 2022).

2.4 Bactérias e biofilme

As bactérias, podem ser classificadas com base em suas características estruturais, fisiológicas e bioquímicas. Elas no geral são separadas em dois grandes grupos as gram-positivas e gram-negativas, isso porque quando submetidas ao teste de coloração de Gram, as positivas apresentam uma coloração violeta intensa e as negativas apresentam coloração rosa (MEGRAN et al., 2020). Esse fenômeno é atribuído à estrutura da parede celular que irá reter a cor, quando adicionada o corante específico, com base nas diferenças de propriedades químicas e físicas da parede da bactéria (TRIPATHI; SAPRA, 2024). As bactérias Gram-positivas possuem em sua parede celular uma camada mais espessa de peptidoglicano do que as bactérias

Gram-negativas (MEGRAN et al., 2020), ambas podendo apresentar formato e composições diferentes (Figura 3).

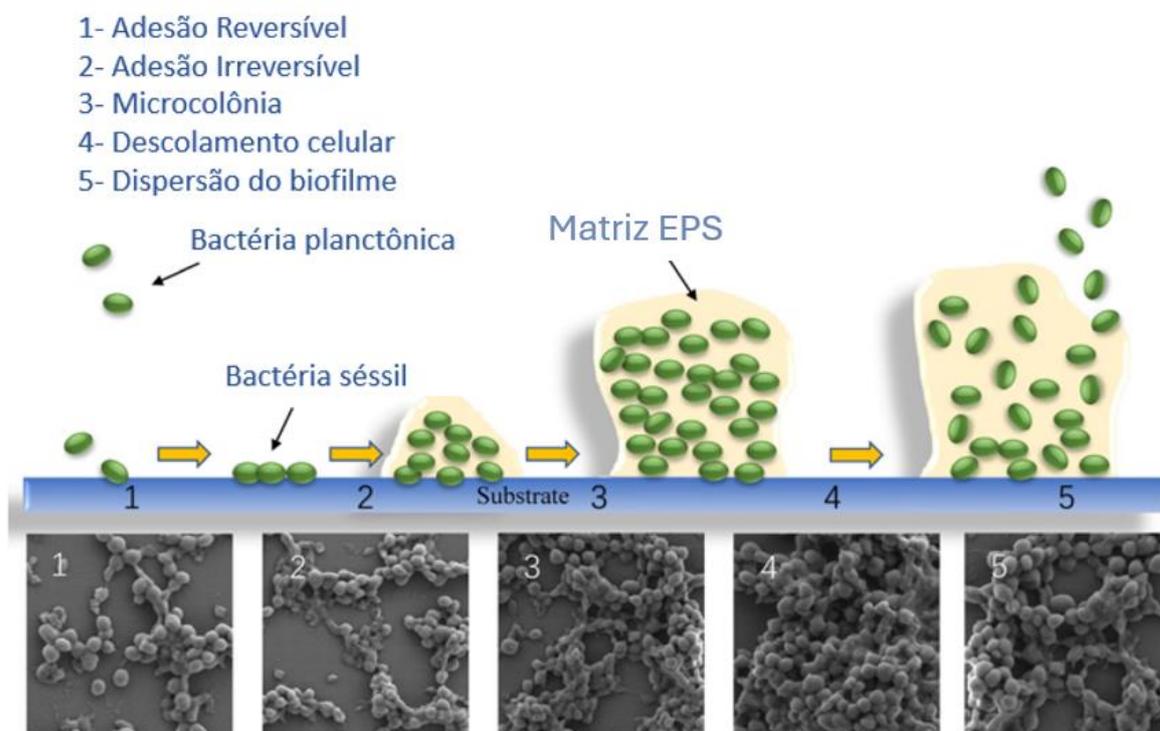
Figura 3 - Exemplo de bactérias gram-positivas e gram-negativas.



Fonte: (IRINA CHUGUNOVA, 2020)

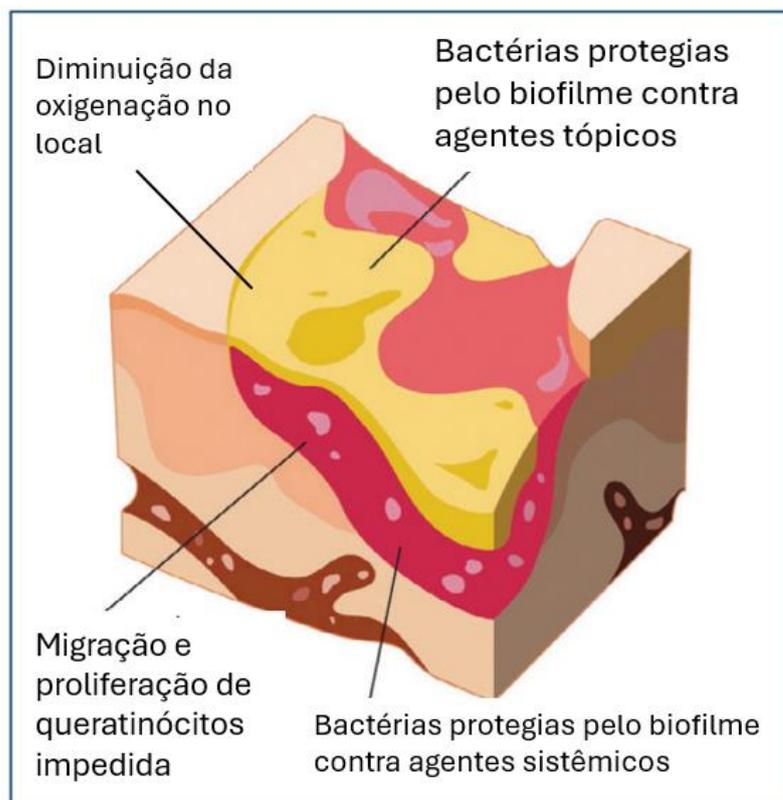
A formação do biofilme faz parte do desenvolvimento bacteriano, nele as bactérias estão ligadas a um substrato e inseridos em uma matriz poliméricas que lhes proporcionam um alto nível de tolerância e resistência a antimicrobianos (SEN et al., 2021). Para a formação do biofilme, bactérias produzem uma matriz extracelular composta por carboidratos, proteínas e/ou DNA extracelular. Essa matriz extracelular propicia a sobrevivência desses microrganismos em ambientes agressivos. Além da maior aderência, à matriz extracelular, confere às bactérias uma maior resistência ao sistema imune e a antimicrobianos (BAZSEFIDPAR et al., 2024). Devido a associação a infecções, os biofilmes são importantes na pesquisa de doenças infecciosas (VALENCIA et al., 2021). Geralmente, o processo de formação do biofilme bacteriano é dividido em cinco estágios (Figura 4): 1) Adesão inicial/reversível; 2) Adesão irreversível; 3) Formação de microcolônias; 4) Deslocamento celular e 5) Dispersão do biofilme (YI et al., 2020).

Figura 4 - Diagrama esquemático e micrografia eletrônica de varredura de diferentes etapas na formação do biofilme de *S. suis*.



Fonte: Adaptado de (YI et al., 2020)

Na Terra, acredita-se que mais de 99% das bactérias vivem em comunidades estruturadas de biofilme. A matriz polimérica extracelular que as envolve promove a sobrevivência em ambientes hostis, incluindo a tolerância a antibióticos (ALOTAIBI, 2021). Em feridas estes microrganismos flutuantes se aderem a sua superfície quase imediatamente e, dentro de 2 a 4 horas, as bactérias já se apresentam na forma de micro colônias fixas a ferida (CURTIS, 2020). Estima-se que a probabilidade de formação de biofilme em feridas esteja entre 78% e 100%, especialmente em feridas crônicas, sendo agravada pela presença de detritos ou corpos estranhos (CALDWELL, 2020). A matriz de EPS criada age como uma camada de proteção que faz com que haja uma diminuição na oxigenação no local, causando a necrose, e reduz a permeabilidade ou captação de antibióticos tanto tópica quanto sistêmica (Figura 5) (BELL, 2024), e embora algumas células imunes pareçam interagir com biofilmes, sua função é frustrada ou incompleta (SEN et al., 2021), dificultando ainda mais a ação de fármacos e tratamentos convencionais.

Figura 5 - Resistência biofilme a entrega de fármacos

Fonte: Adaptado de (BELL, 2024)

2.5 Tratamentos

No geral, para realização do tratamento de feridas crônicas, há o envolvimento de uma abordagem multidisciplinar, incluindo cuidados com a pele, manejo da dor, tratamento de infecções e manipulação de medicamentos. Pode variar dependendo da causa subjacente e da gravidade da ferida (FALANGA et al., 2022). A limpeza da ferida é crucial, para remoção de tecido morto, bactérias e outros detritos para promover a cicatrização (SOBRINHO et al., 2024). Existem técnicas comuns como, a terapia a vácuo, onde um curativo selado é aplicado sobre a ferida e conectado a um dispositivo que aplica sucção intermitente ou contínua ajudando a remover o excesso de fluido e promover a cicatrização (DOS SANTOS et al., 2019) e a terapia com oxigênio hiperbárico, onde o paciente respira oxigênio puro em uma câmara pressurizada, aumentando a quantidade de oxigênio disponível na ferida para promover a cicatrização (GOTTFRIED; SCHOTTLENDER; ASHERY, 2021). Curativos especiais são frequentemente aplicados para manter a ferida limpa, úmida

e protegida, podendo incluir curativos de materiais diversos e até associados a fármacos, dependendo das necessidades da ferida (FARAHANI; SHAFIEE, 2021).

O tratamento de feridas com biofilmes é desafiador devido à resistência dessas comunidades bacterianas à terapia convencional. Fora os procedimentos mais simples no tratamento de feridas, os tratamentos mais comuns hoje utilizados envolvem a remoção física do biofilme do tecido necrosado, conhecido como desbridamento (THOMAS et al., 2021), esse procedimento normalmente é realizado utilizando equipamento específicos, mas em alguns casos são utilizadas enzimas, a fim de quebrar o biofilme e facilitar a remoção dele do local (DE DECKER et al., 2022). Há também a utilização de antibióticos, tópicos ou sistêmicos para combater as bactérias presentes no biofilme.

2.6 Antibióticos e resistência bacteriana

Os antibióticos são agentes farmacológicos utilizados para combater infecções bacterianas, atuando através da destruição direta das bactérias ou da inibição de sua replicação (COOK; WRIGHT, 2022). No início da era dos antibióticos, a maioria das infecções bacterianas respondia bem a esses medicamentos. No entanto, com o tempo, a resistência aos antibióticos tornou-se comum, principalmente devido à evolução e seleção natural (COOK; WRIGHT, 2022). Essa resistência surge, em grande parte, por mutações durante a replicação do DNA, que favorecem bactérias resistentes, e pela transferência horizontal de genes de resistência entre diferentes bactérias (COQUE; CANTÓN; et al., 2023). O surgimento de bactérias resistentes limita as opções terapêuticas para infecções bacterianas, especialmente em ambientes de alto risco. Entre as cepas multirresistentes mais comuns temos como exemplo a *Klebsiella pneumoniae* resistente a Carbapenem e Colistina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Carbapenem, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), e *Escherichia coli* produtora de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (VANEGAS et al., 2021). A presença dessas cepas associada a dificuldade de entrega do fármaco no biofilme, o tratamento de infecções em feridas representa um dos grandes desafios da medicina moderna.

Apesar da gravidade da resistência aos fármacos, foram raros os novos antibióticos desenvolvidos nos últimos 40 anos, os estímulos de mercado

convencionais não foram, e provavelmente não serão capazes de solucionar essa falha na inovação (SILVA et al., 2020), especialmente considerando as restrições de uso desses medicamentos. Por este motivo muitas pesquisas atuais visam não o desenvolvimento de novos fármacos, mas sim o desenvolvimento de materiais e técnicas para enfrentar estes obstáculos clínicos. Uma opção promissora é a adoção da terapia conjugada, que implica na união de antimicrobianos tradicionais e nanopartículas (RODRIGUES et al., 2024), os chamados nano sistemas entregadores de fármacos, que visam penetrar as barreiras impostas por infecções bacterianas resistentes.

1.1 Nanotecnologia e entrega de fármacos

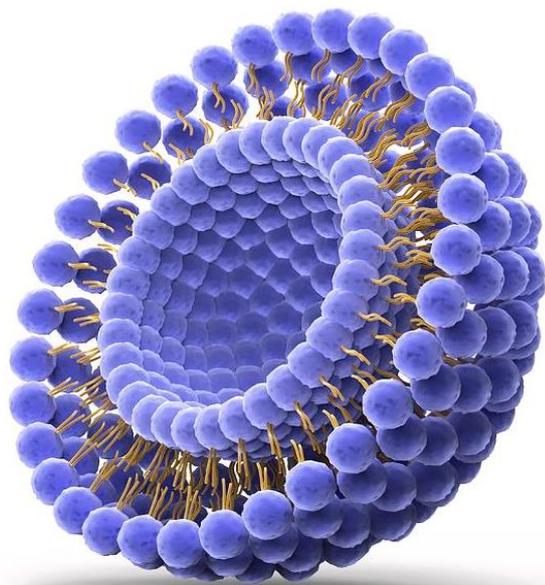
A nanotecnologia trouxe avanços impressionantes nos meios de tratamento de feridas e entrega de medicamentos em nanoescala para regeneração da pele. Esses sistemas aceleram a cicatrização de feridas e melhoram sua qualidade (WANG et al., 2019a). Avanços nesta área permitiu a entrega intracelular de biomoléculas e medicamentos para cicatrização de feridas crônicas, enquanto os protege da degradação e aumentam sua penetração e tempo de meia-vida, reduzindo a frequência de aplicação e os custos associados. Nanocarreadores encapsulam esses agentes, oferecendo perfis de liberação específicos que atendem às necessidades de cicatrização (BLANCO-FERNANDEZ et al., 2021).

A nanoescala permite uma precisão sem precedentes na entrega de agentes terapêuticos, a capacidade de encapsular uma variedade de substâncias terapêuticas, incluindo fármacos, proteínas e material genético, amplia ainda mais o potencial desses nano sistemas (NEVES et al., 2022). A nanotecnologia é um campo científico que tem foco no desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com dimensões na escala nanométrica (JALALI et al., 2024). Um número crescente de sistemas de entrega de fármacos em nanoescala está emergindo. Esses sistemas incluem principalmente nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nano hidrogéis e lipossomas. (WANG et al., 2019a).

1.2 Lipossomas

Como alvo deste trabalho, os Lipossomas são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas (Figura 6). Foram descobertos por volta de 1960 pelo biofísico Alec Bangham, quando este realizava estudos direcionados ao entendimento de membranas biológicas (MUFAMADI et al., 2011). Em um dos seus experimentos Bangham visualizou que fosfolipídios em meio aquoso se ajustaram, de forma a minimizar as interações desfavoráveis entre as longas cadeias carbônicas apolares e o meio aquoso, em vesículas. Em 1964 Alec Bangham, publicou o primeiro artigo sobre sua descoberta chamado as vesículas de mesofases esméricas multifamiliares, que posteriormente seriam apelidadas por ele de Lipossomas (GERARD G.M. D'SOUZA, 2017).

Figura 6 - Representação de um lipossoma.



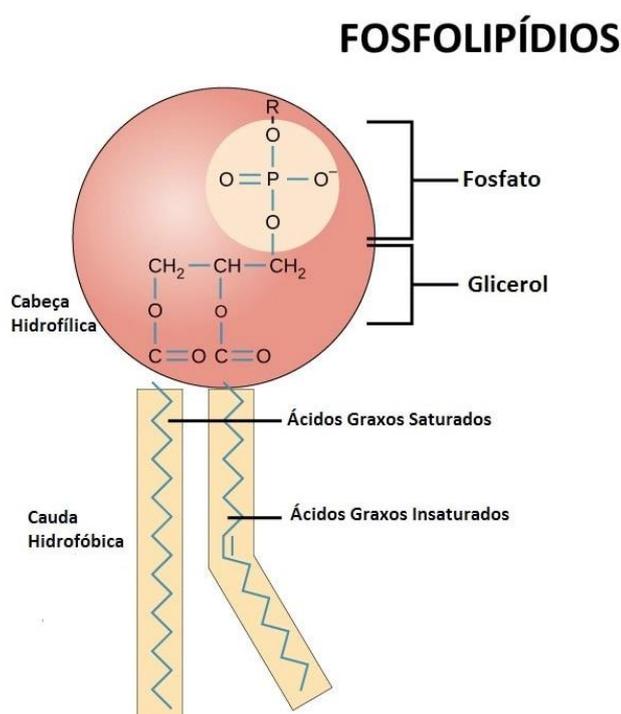
Fonte: (ALFRED PASIEKA, 2016)

A semelhança dos lipossomas com as membranas biológicas permite uma biocompatibilidade e segurança superiores em comparação com outras nanopartículas poliméricas e metálicas (BIANCHI et al., 2020). Além disso, os lipossomas possuem capacidade única de transportar tanto moléculas solúveis em lipídios quanto em água simultaneamente, devido ao autoajuste separando as porções hidrofóbicas e hidrofílicas dos fosfolipídios que podem carregar nelas o fármaco com afinidade similar. Essa versatilidade é fundamental para a eficácia terapêutica, pois

permite a entrega de uma ampla variedade de medicamentos, independentemente de sua hidrofobicidade e hidrofiliicidade, em um único sistema de liberação (HE et al., 2019).

Em termos de composição lipossomas se constituem basicamente de fosfolipídios, que também são os principais componentes de membranas biológicas. Estes fosfolipídios possuem uma porção hidrofílica comumente chamada de “cabeça” polar e uma porção hidrofóbica ligados a um fosfato, que por sua vez encontra ligado a um glicerol seguido da porção hidrofílica ou “cauda” apolar, constituídas por duas cadeias de ácidos graxos (Figura 7), eles podem ser de origem natural ou sintética. O grupo hidrofílico dos lipídios pode ser carregado ou neutro e o grupo hidrofóbico dos lipídios varia pode variar em comprimento de cadeia, simetria e saturação (NSAIRAT et al., 2022a).

Figura 7 - Composição fosfolipídios.

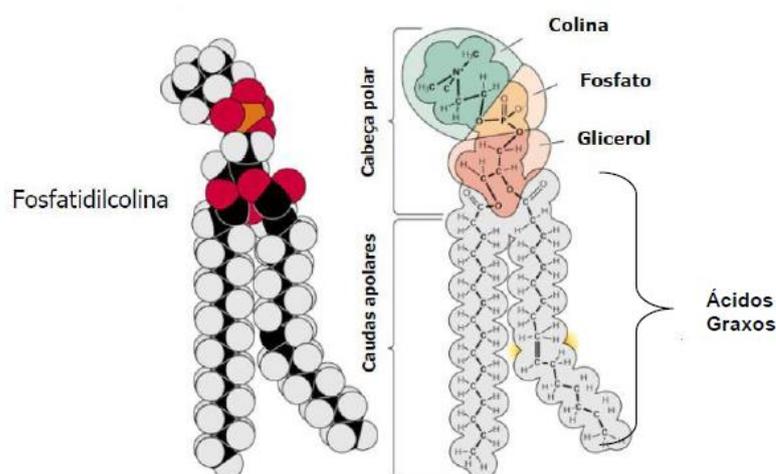


Fonte: Adaptado de (THOMPSON RIVERS UNIVERSITY, 2024)

Este tipo de fosfolipídio utilizado no preparo dos lipossomas é chamado glicerofosfolipídios e são os mais utilizados devido a sua estrutura química permitir uma maior variedade modificações que podem ser utilizadas para direcionar os lipossomas para tecidos específicos ou melhorar a estabilidade dos lipossomas (CHAI; PARK, 2024). A possibilidade de alterações através da substituição dos grupos

ligados ao grupamento fosfato e os ácidos graxos, abrem um leque de possibilidades em relação a composição e propriedades lipossomais (AJEESHKUMAR et al., 2021). Um exemplo de glicerofosfolipídios muito utilizado é a Fosfatidilcolina (Figura 8), neste fosfolipídio, a parte polar chamada de cabeça é composta por uma colina.

Figura 8 - Fosfatidilcolina.

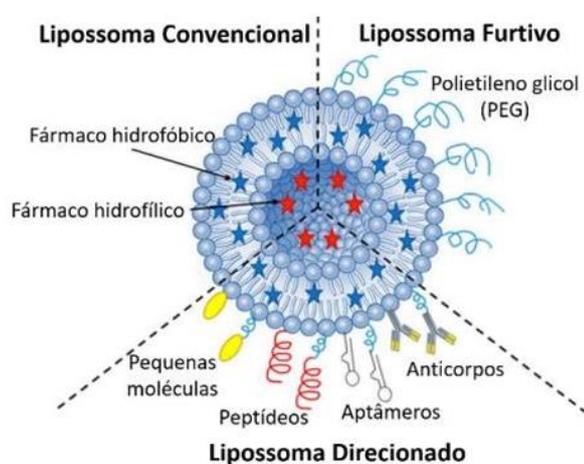


Fonte: Adaptado de (LUCKEY, 2008)

Além da escolha entre uma gama de variedade de fosfolipídios, é possível a realização de alterações superficiais para agregar ou melhorar as propriedades do lipossoma, o que leva a diferenciação dele por tipos (Figura 9). Lipossomas convencionais, são os compostos exclusivamente pelas bicamadas lipídicas, e se limitam a condições específicas para a liberação do fármaco e dependem do meio (PEREIRA et al., 2024) dificultando a seletividade e especificidade da entrega, são indicados para aplicações tópicas por exemplo, diretamente no local de entrega desejado, ainda sim são extremamente biocompatíveis e comportam tanto fármacos hidrofóbicos quanto hidrofílicos (NSAIRAT et al., 2022a). Lipossoma furtivos são caracterizados pela aplicação de revestimentos superficiais compostos por polímeros sintéticos, glicoproteínas, polissacarídeos ou ligantes de receptores específicos, visando o melhoramento na precisão e especificidade da entrega do fármaco nos locais desejados (PEREIRA et al., 2024). O ácido hialurônico, o álcool polivinílico (PVA) e principalmente o polietilenoglicol (PEG) se mostram as principais escolhas na incorporação para produção de lipossomas furtivos (NSAIRAT et al., 2022a). Os lipossomas estabilizados com PEG apresentam circulação sanguínea prolongada

resultando numa maior concentração nos alvos terapêuticos do que lipossomas convencionais (RANGGER et al., 2012). Assim como os furtivos os lipossomas direcionais visam um melhor direcionamento e facilidade na entrega do fármaco no local, enquanto lipossomas convencionais não distinguem entre células normais e doentes, lipossomas direcionados são desenvolvidos para que encontrem células específicas (NSAIRAT et al., 2022), eles podem ser aprimorados pela incorporação de substâncias que ajudam no reconhecimento molecular, melhorando o transporte e eficácia do fármaco e diminuindo os efeitos colaterais. Um exemplo é a utilização de peptídeos, proteínas (incluindo anticorpos) ou aptâmeros (ELKHOURY et al., 2020).

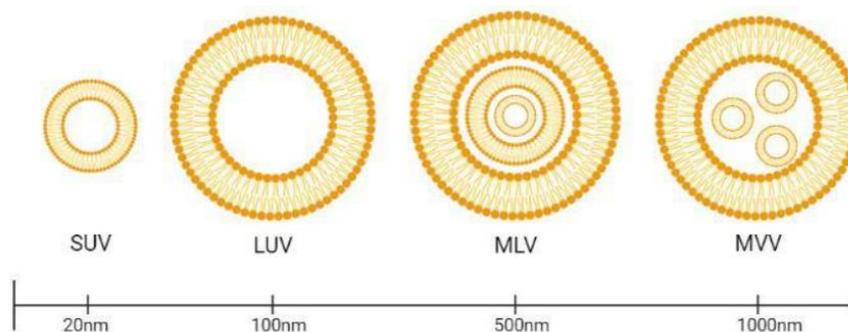
Figura 9 - Tipos de Lipossomas.



Fonte: Adaptado de (ELKHOURY et al., 2020)

Lipossomas podem ser separados também por tamanho e quantidade de vesículas (Figura 10), quando formados por uma única bicamada lipídica são chamados de uni vesiculares UV e quando duas ou mais chamados de lamelas multivesiculares MLV, ainda dentro das multivesiculares é possível obter-se uma vesícula grande contendo outras menores dentro chamada de vesícula multivesicular MVV (NEVES et al., 2021). As uni vesiculares têm tamanhos entre 20 nm e 100 nm, separadas em pequenas (small) SUV e grandes (Large) LUV, já as multivesiculares possuem tamanho entre 500 nm, normalmente as MLV, a 1000 nm para MVV (NEVES et al., 2022).

Figura 10 - Representação esquemática dos lipossomas de diferentes tamanhos



Fonte:(SANTOS et al., 2023)

Uma outra característica muito importante em relação aos lipossomas é a temperatura de transição de fase, onde em uma temperatura crítica específica, chamada T_c , os fosfolipídios que compõem a estrutura do lipossoma passam de um estado ordenado rígido, para uma transição de fase, atingindo um estado desordenado fluido (Figura 11) (CHAI; PARK, 2024), onde pode ocorrer a liberação do fármaco encapsulado, conferindo a característica de termo solubilidade.

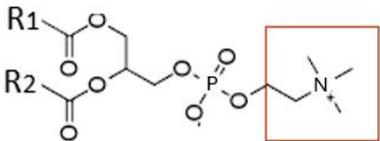
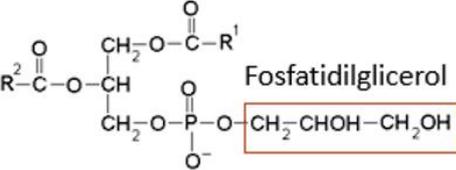
Figura 11 - Transição de fase dos fosfolipídios



Fonte: Adaptado de (CHAI; PARK, 2024)

A temperatura de transição de fase de lipossomas depende principalmente da composição lipídica específica dos lipossomas em questão (WAHEED et al., 2024). Essa transição de fase é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de lipídios presentes nos lipossomas, sua concentração, a presença de outros componentes na formulação (WAHEED et al., 2024) a troca de ácidos graxos na composição dos fosfolipídios, por exemplo, mudará drasticamente a T_c do lipossoma (Figura 12), cadeias mais longas e saturadas aumentam o valor da T_c enquanto cadeias menores e insaturadas diminuem a temperatura crítica (CHAI; PARK, 2024).

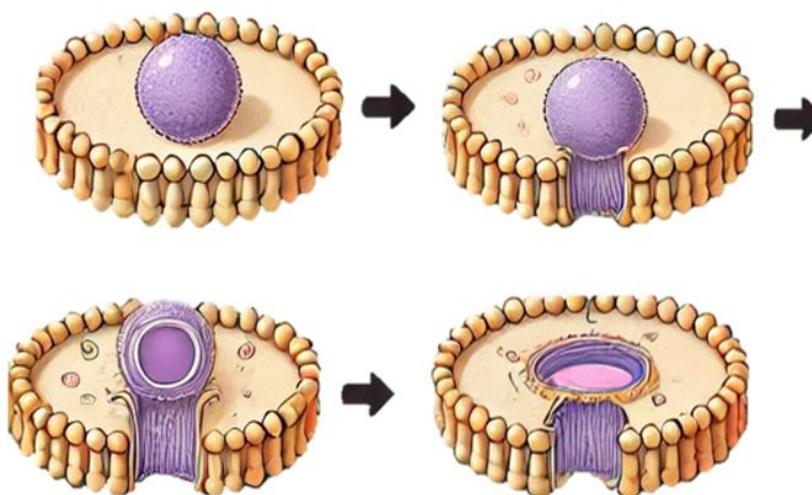
Figura 12 - Influência das cadeias de ácido graxo na Tc.

Fosfolipídios R ₃	Ácido Graxo (R ₁ e R ₂)	Tc(°C)
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-(\text{O})-$ $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-$ $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-$ $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{C}(\text{O})-$	<0 23 42 55
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-$ $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-$	13 35

Fonte: Adaptado de (CHAI; PARK, 2024)

Outra vantagem associada aos lipossomas é sua semelhança química e estrutural a membranas celulares biológicas devido a bicamada fosfolipídica dos lipossomas (DE LEEUW et al., 2009). Esse mimetismo favorece a fusogenicidade dos lipossomas com a membrana externa das células (Figura 13), por sua vez, facilita a entrega de drogas ao citoplasma (AKBARZADEH et al., 2013).

Figura 13 - Fusão mediada por similaridade estrutural de lipossomas em membranas celulares biológicas.



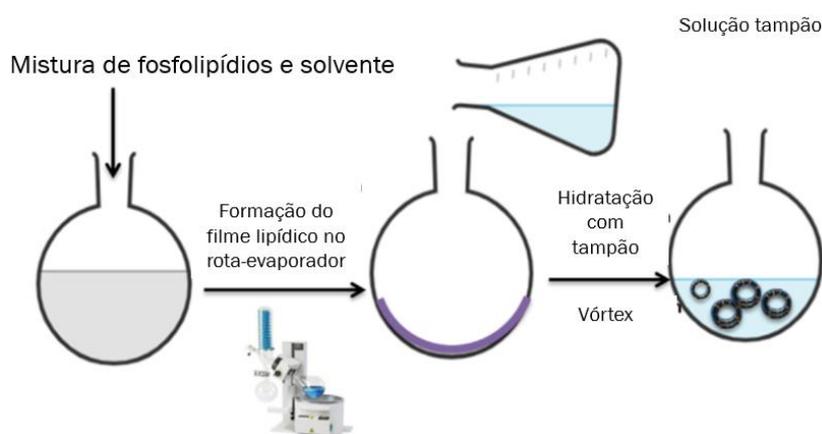
Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2019)

Quanto à formulação, lipossomas podem ser preparados utilizando diferentes abordagens, é preciso planejar quais as características são as desejadas já que o

processo de fabricação do lipossoma e o tipo de fosfolipídio afetam criticamente as suas características finais. (RANGGER et al., 2012).

O método mais popular de preparo de lipossomas é o desenvolvido por Bangham, chamado de hidratação de filme lipídico (Figura 14) (NSAIRAT et al., 2022a), nele envolve a dissolução de fosfolipídios em solventes orgânicos para formar uma solução lipídica, que então por meio da rota-evaporação do solvente e reidratação do filme lipídico que se fecham em vesículas em contato com meio aquoso formando os lipossomas. (AHMED et al., 2019)

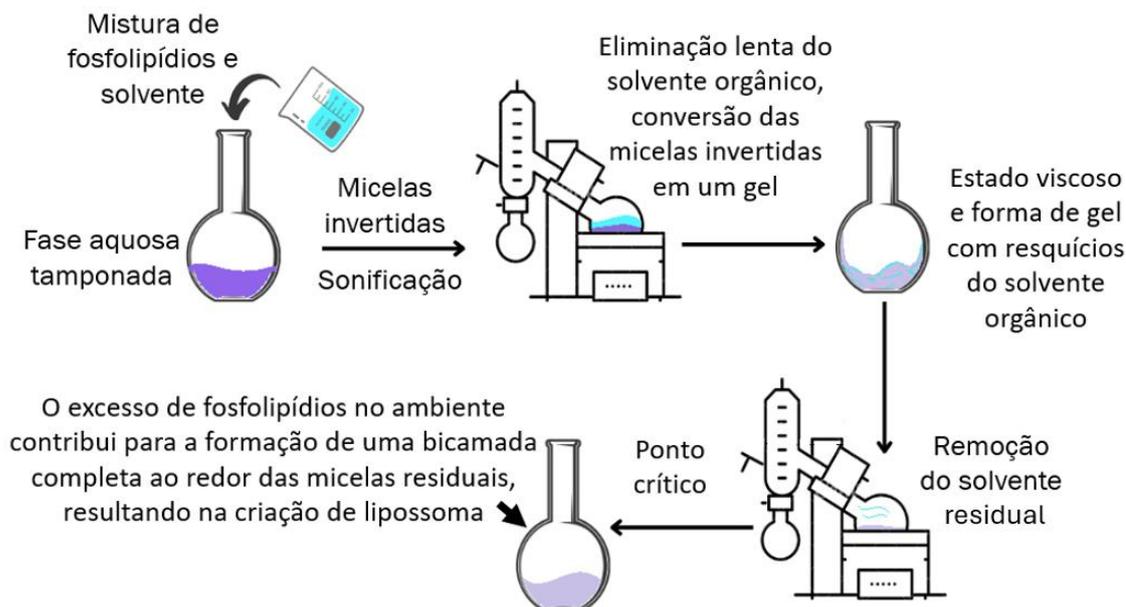
Figura 14 - Método de hidratação de filme lipídico.



Fonte: Adaptado de (NSAIRAT et al., 2022a)

Outra metodologia bastante difundida é a evaporação de fase reversa (Figura 15), inicialmente, os lipídios são dissolvidos em um solvente orgânico, que pode carregar fármacos apolares, para formar uma fase lipídica. Em seguida, essa fase lipídica é combinada com uma fase aquosa, podendo conter o fármaco polar. A mistura é então agitada vigorosamente, por sonificação, para formar uma emulsão estável (NEVES et al., 2022). Posteriormente, ocorre uma remoção lenta do solvente orgânico através de um rota-evaporador, levando a formação de um estado gel, que é submetido novamente a rota-evaporação a vácuo, promovendo a eliminação do solvente até um ponto crítico onde o excesso de fosfolipídios leva à formação das bicamadas lipídicas e vesículas gerando os lipossomas (NSAIRAT et al., 2022a). Este método é utilizado para encapsular substâncias hidrofóbicas ou hidrofílicas em lipossomas, proporcionando uma entrega eficaz de medicamentos, nutrientes ou agentes terapêuticos (NEVES et al., 2022).

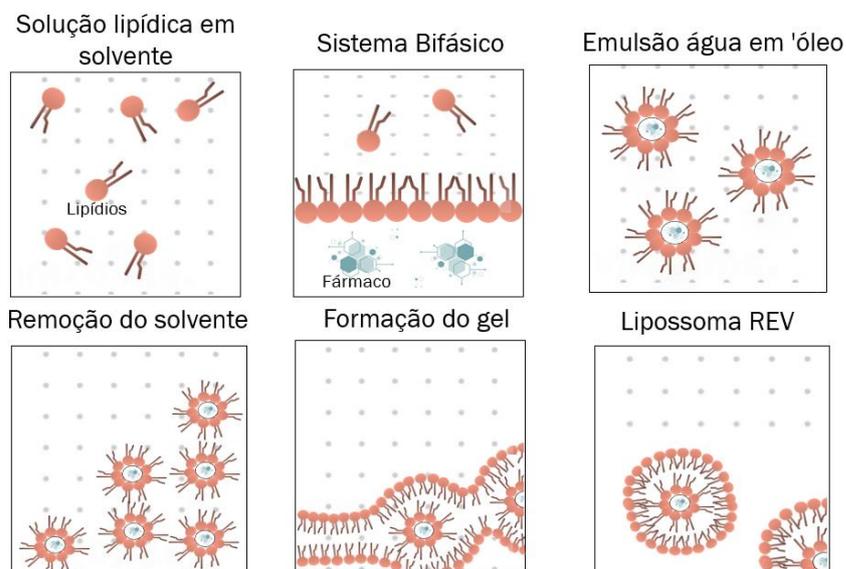
Figura 15 - Preparo lipossomas por REV.



Fonte: Autor.

Essa técnica é chamada de fase reversa pois nele há a formação de micelas invertidas que serão convertidas posteriormente na bicamada lipídica e nos lipossomas (Figura 16) (SHI; QI, 2018)

Figura 16 - Formação dos lipossomas em REV



Fonte: Autor.

Há também o método de injeção de solvente, onde uma solução lipídica é injetada em uma solução aquosa, resultando na formação instantânea de lipossomas devido à rápida dispersão dos lipídios na água (NSAIRAT et al., 2022a). A

microfluidização é realizada com auxílio de um microfluidizador onde as soluções lipídicas e aquosas são injetadas em microcanais em posições opostas sob alta pressão e passam por um pequeno orifício, resultando em cisalhamento intenso. Isso leva à formação de lipossomas de tamanho uniforme e pequeno (ELKHOORY et al., 2020). O processo de Desidratação/Reidratação consiste em dissolver os fosfolipídios em um solvente orgânico para formar uma película lipídica, que por sua vez é desidratada para formar uma matriz lipídica (AKBARZADEH et al., 2013). Posteriormente, esta matriz é reidratada com uma solução aquosa contendo o composto a ser encapsulado, resultando na formação de lipossomas. Outro exemplo de metodologia de preparo, a fusão induzida por íons de cálcio, onde os lipossomas são formados misturando fosfolipídios em uma solução aquosa contendo íons de cálcio (SCHMID et al., 2020). Os íons de cálcio interagem com os grupos fosfato presentes nos lipídios, causando a formação de complexos de cálcio-lipídio (SALDANHA; SCHILLER; HAUSER, 2023). Esses complexos promovem a fusão das membranas lipídicas, resultando na formação de lipossomas maiores e mais complexos (SCHMID et al., 2020).

Enfim a variedade de técnicas e possibilidades para formulação de lipossomas é grande e suas utilizações variam de acordo com a necessidade de aplicação. Cada método proverá características específicas ao lipossoma produzido não só em questões estruturais e dimensionais, mas como influenciará no volume de encapsulação do fármaco e na eficiência de encapsulação (Tabela 1).

Tabela 1 - Característica lipossomal de acordo com metodologia de preparo com representações de tamanhos e tipos.

		ESTRUTURAS	DIÂMETRO nm	VOLUME DE ENCAPSULAÇÃO ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ lipídico)	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO %	
MVV		HIDRATAÇÃO FILME LIPÍDICO	MLV	1000	1,4-1,8	9-27
		EVAPORAÇÃO FASE REVERSA	LUV	500	11-17	30-68
MLV		INJEÇÃO DE SOLVENTE	SUV	30	0,2-3	5
		MICROFLUIDIFICAÇÃO	SUV	<10	0,7-1	5-78
LUV		DESIDRATAÇÃO-REIDRATAÇÃO	MLV	200-2000	1-5	26-72
SUV		FUSÃO INDUZIDA POR ÍONS DE CÁLCIO	LUV	200-1000	1-7	10-15

Fonte:(AHMED et al., 2019; AKBARZADEH et al., 2013b; NSAIRAT et al., 2022a; SALDANHA; SCHILLER; HAUSER, 2023)

A escolha do fármaco também terá influência na escolha do método já que cada metodologia responde a determinado tipo de fármaco. Como alvo deste trabalho (AHMED et al., 2019), a ciprofloxacina compõe o grupo de antibióticos da classe das fluoroquinolonas, com eficácia comprovada contra bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (SHARIATI et al., 2022). Ela se destaca por sua potência contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* (COOK; WRIGHT, 2022), é um fármaco polar e necessita que o encapsulamento seja eficiente na parte interna das vesículas e deve ser adicionado na fase aquosa utilizada na preparação do lipossoma (AJEESHKUMAR et al., 2021), como na hidratação de filme lipídico.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de um nanossistema de liberação de antimicrobianos baseado em lipossomas encapsulados com ciprofloxacina e avaliação de seu potencial antimicrobiano e atividade antibiofilme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar lipossomas brancos e encapsulados com ciprofloxacina;
- Caracterizar os lipossomas;
- Avaliar a citotoxicidade do lipossoma;
- Avaliar a fusogenicidade do lipossoma e seu impacto no crescimento celular através de teste de Alamar blue e fluorescência.
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) do crescimento bacteriano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Avaliar a atividade antibiofilme.

4 JUSTIFICATIVA

A pesquisa sobre o desenvolvimento de novas tecnologias para auxiliar no tratamento de feridas crônicas é de suma importância devido à sua relevância clínica e científica. Feridas infeccionadas representam um desafio contínuo na medicina moderna, principalmente com a crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais (LUCENA et al., 2023).

O desenvolvimento de formulações lipossomais contendo fármacos apresenta uma oportunidade significativa para superar limitações na entrega de fármacos ao sistema, se portando como um veículo ideal para a entrega controlada, permitindo uma liberação prolongada e direcionada do agente terapêutico no local da ferida (PARTOAZAR; KIANVASH; GOUDARZI, 2022), além da capacidade dos lipossomas de melhorar a estabilidade e a solubilidade do fármaco e da alta compatibilidade com a membrana celular biológica e seu potencial para contenção e prevenção da formação de biofilmes (MAKHLOUF; ALI; AL-SAYAH, 2023).

A escolha da ciprofloxacina, um antibiótico de amplo espectro, aplicados tanto em bactérias gram-positivas quanto em negativas, oferece uma opção terapêutica valiosa para fármaco alvo da encapsulação (IBNE SHOUKANI et al., 2024).

Além de sua importância clínica, essa pesquisa também contribui para o avanço do conhecimento científico, o estudo das propriedades físico-químicas dos lipossomas, juntamente com a avaliação de sua eficácia antimicrobiana e antibiofilme, oferece insights valiosos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no campo da medicina regenerativa e da terapia antimicrobiana.

5 METODOLOGIAS

Como uma abordagem multicêntrica os ensaios foram realizados em Campis e universidades diferentes englobando ambos os Campos da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) – Itajubá MG e Itabira MG, e uma parceria com o Laboratório de Bioengenharia da Universidades Estadual do Colorado (CSU) – Fort Collins CO USA.

O local de realização do ensaio está sinalizado por bandeiras,  para os experimentos realizados nos *campis* da UNIFEI e  para os realizados na CSU.

5.1 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados na Universidade Federal de Itajubá, campus Itabira no Laboratório de Bioengenharia, o volume total de lipossomas preparados foi de 15 mL, seguindo o método de evaporação de fase reversa. Utilizou-se de alíquotas clorofórmicas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol) (DSPE-PEG-2000) com proporções molares de 75:20:5 respectivamente, em uma concentração lipídica total de 60 mg para o preparo de dois lipossomas diferentes (5mL cada), um encapsulado com ciprofloxacina e um outro branco.

Para cálculo das quantidades de fosfolipídios a serem adicionados para preparo das soluções destes em clorofórmio, foram consideradas as massas molares de cada um sendo elas 734,04g/mol para DPPC, 790,15g/mol para DSPC e 875g/mol para o DSPE-PEG₂₀₀₀. Considerando a contribuição de cada fosfolipídios para preparo de 15mL (volume total necessário para preparo dos três lipossomas) temos que:

- 75% de DPPC correspondendo a 0,24774g para 11,25mL de clorofórmio;
- 20% de DSPC correspondendo a 0,04709g para 3mL de clorofórmio;
- 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀ correspondendo a 0,00654g para 0,75mL de cloroformo.

Essas soluções foram transferidas para três balões volumétrico em alíquotas, por balão, de 3,75mL de DPPC, 1mL de DSPC e 0,25mL de DSPE-PEG₂₀₀₀, e então cada um dos balões foi submetido a remoção do solvente sob vácuo até que um filme lipídico nas paredes do frasco fosse formado. Em todos os frascos foi adicionado uma

alíquota de 15 mL de éter dietílico foi adicionada à solução lipídica (razão de fase aquosa/fase orgânica de 1/3). Foram adicionados 5mL da solução de 250 ug/mL de ciprofloxacina a um balão volumétrico, para a encapsulação do fármaco no lipossoma e um segundo balão foi utilizado sem adição de nenhuma solução para preparo do lipossoma branco. Os filmes foram então dissolvidos e agitados vigorosamente, as misturas obtidas foram submetidas a um aparelho de vórtex por 3 minutos, produzindo uma emulsão do tipo A/O (água em óleo). As emulsões foram submetidas à evaporação sob vácuo para remoção do solvente orgânico, permitindo a formação de vesículas lipídicas. Para garantia de tamanho mínimo de partícula, todos os lipossomas foram submetidos a diálise em água ultrapura por 24h sob agitação magnética, utilizando membrana de celulose para diálises com aberturas de 33mm.

Para estudos com microscopia de fluorescência foi preparado também 1mL de lipossoma encapsulado não só com o fármaco, mas com um corante Fluoresceína (FITC) (m-IgGk BP-FITC: sc-516140), a única diferença no preparo deste lipossoma foi a adição junto ao fármaco do corante numa proporção de 50:1 de fosfolipídios para FITC.

A nomenclatura utilizada para os lipossomas foi TSL, por se tratar de lipossomas termo sensíveis, C e B para ciprofloxacina e branco.

Para os ensaios realizados na Universidade estadual do Colorado foram utilizados somente o lipossoma TSLC e encapsulado com FITC, previamente preparado no laboratório de bioengenharia da Universidade Federal de Itajubá, campus Itabira.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

4.2.1 Taxa de encapsulação

Para cálculo da taxa de encapsulamento dos fármacos foi utilizado o equipamento de cromatografia líquida (HPLC). Foi preparada uma curva de calibração com concentrações conhecidas dos fármacos de 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL a partir da diluição de uma *solução mãe* de 250 µg/mL, os parâmetros utilizados na leitura foram, fase móvel, fase estacionária, coluna c18 e comprimento de onda de 230 nm,

fase móvel KH_2PO_4 , $\text{pH}=3,2$ e concentração de $0,05 \text{ mol/L}$ e metanol 99,8% numa proporção de 82:18, num fluxo de 10 mL/min .

Uma alíquota de $0,1 \text{ mL}$ do lipossoma foi adicionada a um *Vial* com $0,2 \text{ mL}$ de etanol e então levado para leitura e aplicado a curva para determinar a concentração do lipossoma.

4.2.2 Tamanho médio de partícula DLS e potencial Zeta

Para a análise do tamanho de partículas foi utilizado um espectrômetro de correlação de fótons ou Dynamic Light Scattering (DLS). Três diluições foram preparadas do lipossoma, puro, 50% e 25% da concentração inicial. Os lipossomas foram introduzidos na célula de medição do equipamento. A luz laser é então direcionada para a amostra e a dispersão da luz pelas partículas é medida ao longo do tempo.

4.2.3 Biocompatibilidade

4.2.3.1 Crescimento Celular

Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ADSC) foram isoladas pela Professora Kimberly Cox-York, do Departamento de Ciência de Alimentos e Nutrição Humana da Colorado State University a partir de biópsias de tecido adiposo subcutâneo abdominal e femoral. As células foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , em frascos de poliestireno para cultura de tecidos com área de superfície de 175 cm^2 , usando meio de crescimento (MEM Modificação Alpha, HyCloneTM) com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina adicionados. Todas as ADSC utilizadas neste estudo estavam abaixo da quinta passagem. Antes da semeadura das células, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e expostas à radiação ultravioleta por 30 minutos. As células foram semeadas nas amostras a uma concentração de 10.000 células por poço em placas de 48 poços, e foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Todas as amostras foram utilizadas pelo menos em triplicata ($n = 3$).

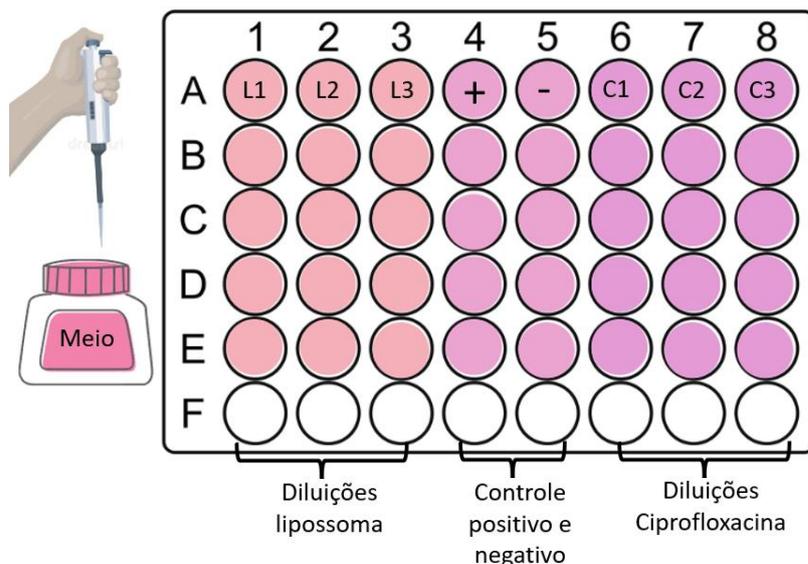
4.2.3.2 Citotoxicidade

Para análise da citotoxicidade foi utilizado o Kit de Ensaio de Citotoxicidade Thermo Scientific™ Pierce™ LDH, que envolve a quantificação da liberação de lactato desidrogenase (LDH), por absorbância, uma enzima citosólica liberada quando há danos na membrana celular.

Foram preparadas três diluições do TSLC e da ciprofloxacina, fármaco puro como controle, no meio contendo as células, o volume final preparado de cada concentração foi de 2000 μL sendo respectivamente 1800 μL de meio para 200 μl de lipossoma encapsulado puro, 1900 μL de meio para 100 μL e por fim 1950 μL de meio para 50 μL do lipossoma ou fármaco. Elas foram nomeadas da mais concentrada como L1/C1 para mais diluída L3/C3.

Para tanto, foi adicionado 300 μL em uma placa de 48 poços quintuplicatas de cada diluição de lipossoma (coluna 1, 2 e 3) e de fármaco puro (coluna 6, 7 e 9) em colunas separadas e nas duas colunas centrais da placa foram adicionados 300 μL de meio com células puro para controle negativo e positivo. A Figura 17 ilustra como ficaram organizados os grupos. A placa foi levada para incubação por 24h em temperatura constante igual a 37°C.

Figura 17 - Placa de 48 poços para a realização dos testes de citotoxicidade e Alamar Blue.



Fonte: Autor

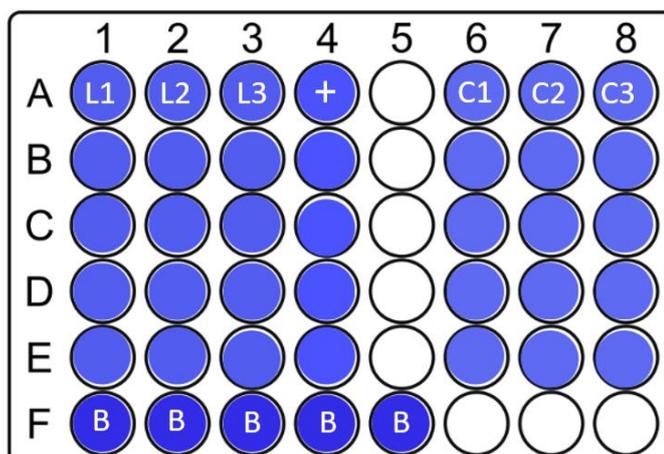
Para controle positivo as células foram simplesmente adicionadas ao meio nos poços sem nenhum reagente e para controle negativo foi adicionado ao meio Triton, que é um surfactante e promove a abertura das membranas celulares.

Após a incubação retirou-se 50 μ L de cada poço e transferiu-se para uma placa de 96 poços adicionando a eles 50 μ L de uma mistura de substratos (Lactato + NAD⁺ + Sal de Tetrazólio + Diaforese) e incubou-se por 30 min. Ao final da incubação adicionou-se 50 μ L de uma solução *stop* e a placa foi encaminhada para leitura de absorbância na faixa de 490 a 680 nm.

4.2.3.3 Alamar blue: Respiração Celular

A mesma placa do teste de citotoxicidade foi utilizada para realização dos testes com o Alamar Blue. Após retirar as amostras para leitura do LDH no leitor de placas, aspirou-se todo o meio de cultura celular restante da placa e adicionou-se 300 μ L de uma solução de meio de cultura celular e alamar blue numa proporção de 90% de meio para 10% de alamar blue, em todos os poços, exceto a coluna 5 do controle negativo, juntamente a mais cinco poços da fileira F para controle branco, como ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Placa montagem teste de Alamar Blue.



Fonte: Autor.

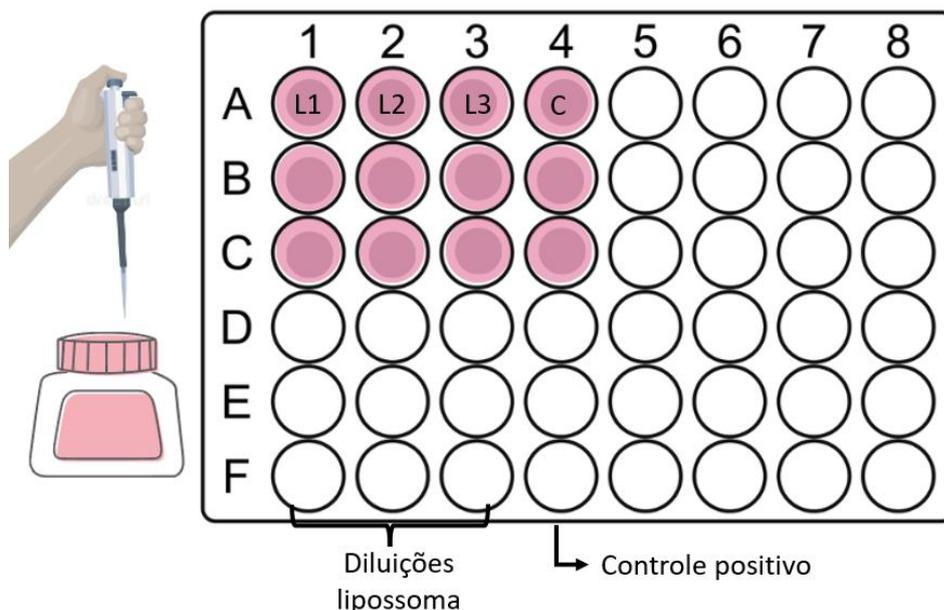
A placa foi levada para incubação por 7h e depois retirou-se as alíquotas de 200 μ L de cada poço e transferiu-as para uma nova placa de 96 poços, que foi levada ao leitor de placas para leitura da absorbância no comprimento de onda de 600 nm.

Aspirou-se o restante do meio na placa de 48 e adicionou-se 300 μ L de um novo meio com as mesmas diluições anteriores e um controle positivo e levou-a para incubação novamente. O teste alamar blue foi realizado para dia 1 (24h de incubação) e repetido no dia 4 (96h de incubação), diferenciando o tempo de incubação entre eles e a troca de meio.

4.2.3.4 Fusogenicidade

Utilizando a mesma metodologia anterior foram preparadas novas diluições com o lipossoma encapsulado com o FITC no meio contendo células, para serem adicionados em duas placas de 48 poços, dia 1 e dia 4 contendo em cada poço a ser usado um disco de poliestireno pregado aos poços e esterilizados previamente com álcool etílico. Foram adicionados 300 μ L de cada lipossoma em triplicata nas 3 primeiras colunas da placa e na quarta foi adicionado meio puro com células para controle também em triplicata, como ilustrado na Figura 19, as placas foram levadas para uma incubadora por 24 h, dia 1, outra por 96h dias, dia 4.

Figura 19 – Placa para teste de fusogenicidade.



Fonte: Autor.

Após o tempo de incubação, lavou-se a placa com PBS três vezes por 5 minutos cada e adicionou-se fixativo, 3,7% formaldeído, por 15min, lavou-se novamente as amostras três vezes com PBS por 5 min cada. Adicionou-se 300 μ L de uma solução de 10% de Rodamina (Rhodamine Phalloidin – Cytoskeleton) preparada previamente em meio e incubada em temperatura ambiente por 25 min.

Em cada poço, após período de incubação, foi adicionado 31,5 μ L de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - Life Technologies) e incubou-se por mais 5 min. Aspirou-se a solução e lavou-se as amostras 3 vezes com PBS, adicionou-se 300 μ L de PBS em cada poço para reservar as placas em ambiente refrigerado até que fossem submetidas à microscopia de fluorescência.

Todo o experimento foi realizado em um ambiente protegido da luz e as placas foram envoltas em papel alumínio para serem guardadas e levadas para leitura.

4.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E BACTERICIDA (CMI E CMB)

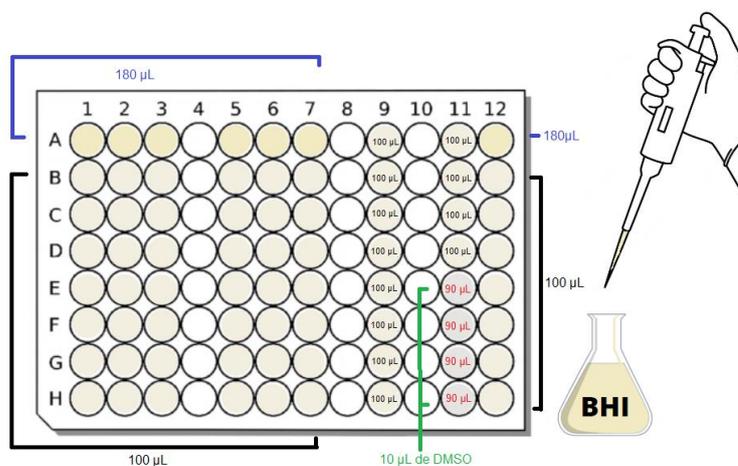
4.3.1 CMI e CMB por indicador Resazurina 🇧🇷

Na análise biológica para determinação da concentração mínima inibitória, foi utilizada a metodologia proposta por André e colaboradores (2020), as cepas de

bactérias utilizadas foram de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* MRSA - HU25 (cepa clínica resistente à meticilina isolada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis*. Todas as bactérias foram semeadas da mesma maneira, em uma placa de *Tryptic Soy Agar* - TSA e incubadas por 24 h a 37 °C, após tempo de incubação adicionou-se cerca de 3 a 5 colônias em aproximadamente 5 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9 % estéril) e mediu-se a turbidez, foram adicionados mais salina ou colônias, de acordo com a necessidade, até o valor de turbidez de 0,5 na escala de McFarland fosse obtido.

Foram adicionados 180 µL de meio BHI nos poços das colinas 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 12 na fileira A de uma placa estéril de 96 poços e 100 µL de BHI nos demais poços dessas colunas, em toda coluna 9 foi adicionado 100 µL do meio e para coluna 11 os quatro primeiros poços (A, B, C e D) 100 µL de BHI e nos quatro últimos (E, F, G e H) foram aplicados 90 µL de BHI e 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), Figura 20.

Figura 20 - Sequência de preparação da placa de CMI.



Fonte: Autor

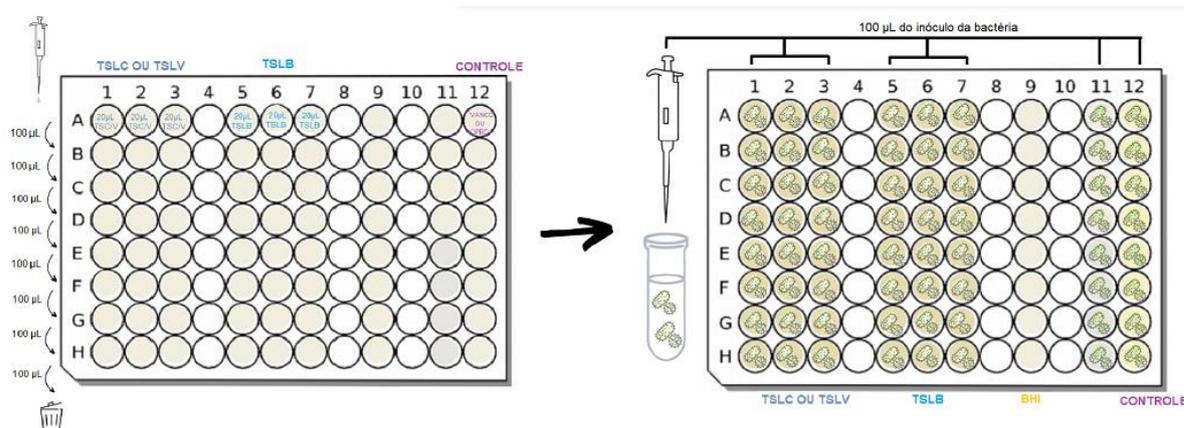
Em seguida para as primeiras placas foram adicionados 20 µL do lipossoma TSLC nos poços 1A, 2A e 3A e 20 µL TSLB nos poços 5A, 6A e 7A. Sequencialmente realizou-se diluição seriada transferindo 100 µL dos poços 1, 2, 3, 5, 6 e 7 da linha A para os da linha B repetindo o procedimento sucessivamente até a linha H, descartando os últimos 100 µL.

No poço 12A, foram colocados 20 µL do controle, uma solução contendo o fármaco que foi usado no encapsulamento, essa solução foi preparada previamente partindo de uma solução estoque, onde tem-se 1 mg do fármaco em 1.000 µL de

DMSO. Realizou-se novamente uma diluição seriada transferindo 100 μ L do poço 12A para o poço 12B e assim sucessivamente até o 12H, descartando-se os últimos 100 μ L (Figura 21). A concentração da substância controle variou de 8 μ g/mL à 0,0625 μ g/mL.

Com exceção da coluna 9 foram aplicados 100 μ L do inóculo da bactéria nas demais colunas preenchidas previamente e a placa foi levada para incubação na estufa, a 37 °C, por 24 h.

Figura 21 - Sequência do procedimento de diluição e adição de bactéria.



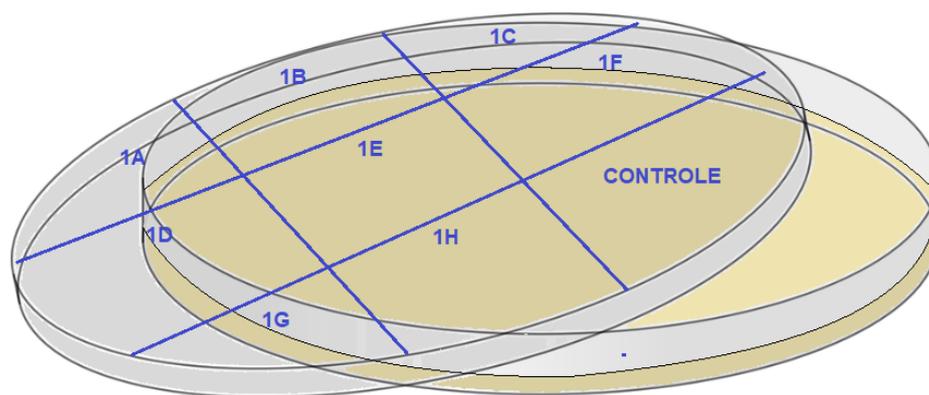
Fonte: Autor

Foram coletadas amostras para preparação de concentração mínima bactericida, que será descrito no tópico subsequente, foram aplicados 10 μ L de Resazurina diluída com concentração de 0,1 mg/mL para cada poço e levou-se a estufa novamente, por 1 h, após este período foram anotados os poços que apresentaram crescimento bacteriano (coloração rosa) e os que não apresentaram crescimento bacteriano (coloração azul), para assim determinar qual o menor valor de concentração necessário para inibição do crescimento. Todos os testes foram realizados em triplicatas, sendo uma duplicata no mesmo dia e uma réplica em outro para maior confiabilidade de resultados.

O teste de concentração mínima bactericida, foi feito utilizando uma placa contendo ágar TSA, a solução foi previamente preparada e autoclavada e então vertida nas placas que foram utilizadas na realização dos testes de concentração mínima bactericida, dividiu-se cada placa em novas partições simétricas nomeando cada partição com a concentração correspondente aos oito poços da coluna 1 da placa de 96 poços utilizada no teste de concentração mínima inibitória e um para o poço 12A com o controle. Foram aplicados 10 μ L no campo referente à diluição

anotada (de acordo com aquelas analisadas na CMI) e a placa foi levada à estufa, à 37 °C, por 24 h. Após esse intervalo, observou-se se houve ou não crescimento bacteriano e qual a concentração correspondente. Na Figura 22 encontra-se uma ilustração de como foi montada a placa, além da coluna um também foi preparada uma outra placa para a coluna 5 da mesma placa de CMI, e assim como nos testes de concentração mínima inibitória foram realizadas triplicatas para CMB.

Figura 22 - Montagem placa para realização CMB



Fonte: Autor

4.3.2 CMI e CMB por absorvância

Esta metodologia foi realizada no laboratório de bioengenharia localizado na Universidade Estadual do Colorado (CSU), Fort Collin CO – EUA, por questões de disponibilidade as cepas bacterianas utilizadas não são as mesmas e por logística de transporte foi realizado testes somente no lipossoma contendo a ciprofloxacina e o medicamento puro.

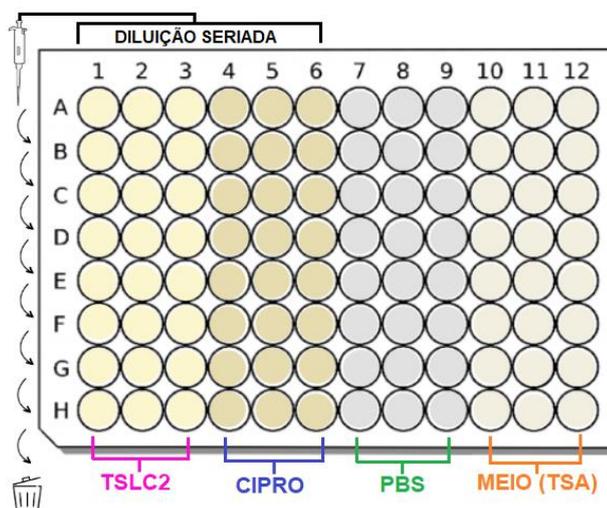
Foi preparada uma 400 mL de uma solução de TSA Agar, na proporção de 30 mg por litro, para ser utilizada como meio, a solução foi autoclavada e reservada por 24h para as análises. Cerca de 10 mL dessa solução foi adicionada em um tubo Falcon, as bactérias utilizadas neste estudo foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*, cepas destas bactérias foram ao tubo e incubadas por 24h, exceto pela *Pseudomonas Aeruginosa* que necessitou de um período de 48h.

Para determinação da concentração de bactéria após incubação foi adicionado, em uma placa de 96 poços, 200 µL da solução no poço 1A e realizou-se uma diluição

nos poços consecutivos da coluna 1 nas proporções de 1:3,1:1 e 2:1 de meio para bactéria respectivamente, a placa foi levada a um leitor de absorvância com comprimento de onda em 600 nm. O valor de diluição desejado para se obter uma concentração de bactérias de 10^9 é próximo ao valor referência de 0,52 em leitura de absorvância. Ao encontrar a diluição correspondente a essa absorvância foi então preparado a quantidade necessária de solução de bactérias para o experimento. Este procedimento foi realizado em triplicata e utilizado para encontrar a concentração de todas as três bactérias.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado na fileira A (exceto coluna 7,8 e 9) 180 μ L de meio TSA Agar e 100 μ L em todas as colunas com exceção da 7,8 e 9, as quais em todos os poços foram adicionados 100 μ L de PBS. Nos poços 1, 2 e 3A foram adicionados 20 μ L lipossoma TSLC 2 e nos 4, 5 e 6A foram adicionados 20 μ L de uma solução de 8 μ g/mL de ciprofloxacina, consecutivamente foi realizada a diluição seriada transferindo 100 μ L do poço 1A para o poço 1B e assim sucessivamente até o 1H, repetindo a diluição para as colunas 2 a 6. A Figura 23 ilustra esta montagem da placa para determinação da concentração mínima inibitória.

Figura 23 - Montagem placa para análise de CMI e CMB por leitura absorvância



Fonte: Autor

Em todos os poços foram adicionados 100 μ L de bactéria, concentração final de 10^8 , a placa foi levada para incubação na estufa, a 37 °C. Para cada bactéria foram montadas duas placas contendo dois tempos diferentes de incubação, após a adição da bactéria na placa, de 6 e 24 horas. Após estes períodos foram feitas as leituras no

leitor de placas com mesmo comprimento de onda de 600nm para determinar assim a concentração mínima inibitória.

Nestes testes também é possível a visualização da atividade bactericida e determiná-la nas mesmas leituras.

4.4 POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBIOFILME

4.4.1 Biofilme por contagem de unidades formadoras de colônias

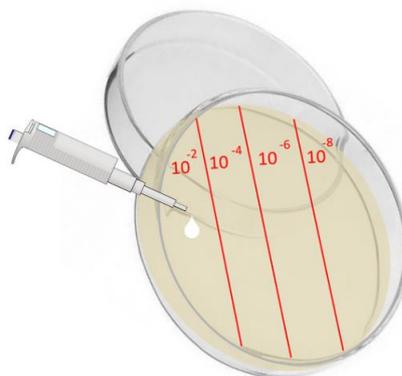
Para análise de biofilme foi adicionado em uma placa de 24 poços, discos de poliestireno, 50 µL de bactéria, testes realizados para a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* MRSA - HU25 (cepa clínica resistente à meticilina isolada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis*, o método de preparo foi o mesmo utilizado na primeira metodologia de MIC, mais 950 µL de meio (BHI) subtraindo desta quantidade o valor do MIC encontrado para o lipossoma para adicioná-lo ao poço, no caso do lipossoma branco foi utilizado o valor de concentração da coluna A do TSLC1, completando assim 1000 µL. Para cada lipossoma e bactéria foram preparados 8 poços, 2 deles destinados a microscopia eletrônica de transmissão MET e 6 para preparo da placa para análise do biofilme. Também foram preparados para cada bactéria 8 poços contendo os 950 µL BHI sem lipossomas como o controle. As placas foram levadas para incubação numa estufa a 37 °C por 24h.

Cada disco foi transferido para tubos Falcon contendo 3mL de solução salina estéril (0,9% de NaCl), os tubos foram lavados ao vórtex por 30s cada e depois ao banho de ultrassom por 15 min.

Em uma placa de 96 poços foi acionado a linha A 20 µL da solução dos seis diferentes tubos Falcon para 180 µL de BHI, completando a linha de 1 a 6 A para cada teste. Nos demais poços dessas colunas foi adicionado 100 µL de BHI para realização da diluição seriada transferindo 100 µL de um poço para o seguinte da mesma fileira, sucessivamente até a linha H, descartando os últimos 100 µL. Em uma placa de Petri, preparada com TSA Agar, foi feito quatro divisórias verticais (Figura 24), e em cada partição foi colocada uma gota de 10 µL da diluição da linha B, D, F, H da placa de 96 poços (que corresponde a concentrações de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8}) e escorridas na vertical, no total para cada teste foram feitas 6 placas de Petri para as 6 colunas de

diluição preparadas na placa de 96 poços. Elas foram levadas à estufa para incubação por 24h a 37 °C e por fim retiradas para contagem de colônias. Todos os lipossomas passaram pelo mesmo procedimento para todas as bactérias.

Figura 24 - Montagem da placa para ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias.



Fonte: Autor

4.4.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As duas lamelas de vidro reservadas do teste anterior foram lavadas e fixadas por 1h em glutaraldeído a 2%, posteriormente para remoção completa da água foram desidratadas em etanol com lavagens a 10%, 25%, 50%, 75%, 90% e 99,5%, respectivamente, com intervalos de 20 min em cada concentração, com exceção da 99,5% que deve ficar submerso por 1 hora. As amostras durante 24h em incubadora bacteriológica a 37 °C e metalizadas, possibilitando que as topografias superficiais dos biofilmes possam ser vistas e fotografadas utilizando o MEV.

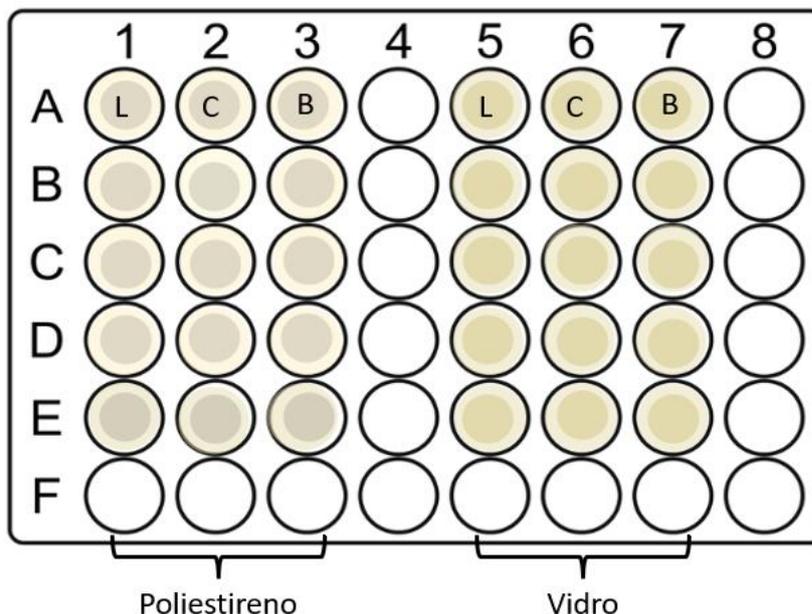
4.4.2 Crescimento de biofilme em poliestireno e vidro 🇺🇸

Foram adicionados em placas de 24 poços discos de poliestireno e vidro, total de 6 placas 2 para cada bactéria, 100 µL de bactérias, testes realizados para cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia Coli* (ATCC 25922). e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), todas foram semeadas em um tubo Falcon de 50mL em meio TSA (Tryptic Soy Agar), previamente preparado e autoclavado, e levadas para incubação por 24h a 37 °C, a concentração utilizada foi de 10⁹.

Com os valores de CMI obtidos para estas cepas bacterianas, foram preparadas soluções de lipossoma TSLC e ciprofloxacina no meio TSA para serem adicionadas nas placas, os ensaios foram realizados em quintuplicatas e as placas

foram organizadas como mostrado na Figura 25, totalizando 30 amostras em cada placa.

Figura 25 – Placa teste atividade antibiofilme.



Fonte: Autor

Foi adicionado 200 μ L das soluções de lipossoma ou ciprofloxacina em cada poço e 200 μ L de meio puro na coluna correspondente ao branco, levando as placas para incubar em dois tempos diferentes para cada bactéria, uma placa por 6h e outra por 24h, a 37°C.

Duas amostras de cada coluna foram transferidas para uma nova placa para ser submetida ao protocolo de preparação para MEV e as demais foram preparadas para a microscopia de fluorescência.

4.4.2.1.1 Microscopia eletrônica varredura

Fixou-se as amostras com 300 μ L formaldeído por 45min, aspirou-se a solução e adicionou-se 300 μ L de tampão por 10 min, retirando novamente a solução e adicionando 300 μ L álcool etílico em concentrações diferentes, 35%, 50%, 70% e 100%, de 10 em 10 minutos, sempre aspirando o anterior e adicionando 300 μ L do novo, até a retirada do último. a placa foi deixada para secar e guardada até ser levada para realização da microscopia eletrônica de varredura.

4.4.2.1.2 Microscopia de fluorescência

Com os poços vazios adicionou 300 μ L de uma solução de 0,3% de corantes preparados em PBS, 0,15% de cada, e incubou-se por 15 min a 37°C. Aspirou-se e lavou-se as amostras três vezes para então adicionar 300 μ L fixativo, formaldeído, por 15 minutos. Lavou-se novamente as amostras três vezes e adicionou 300 μ L de PBS em cada poço, cobrindo a amostra com papel alumínio e reservando em ambiente refrigerado até que as amostras fossem levadas ao microscópio de fluorescência para leitura.

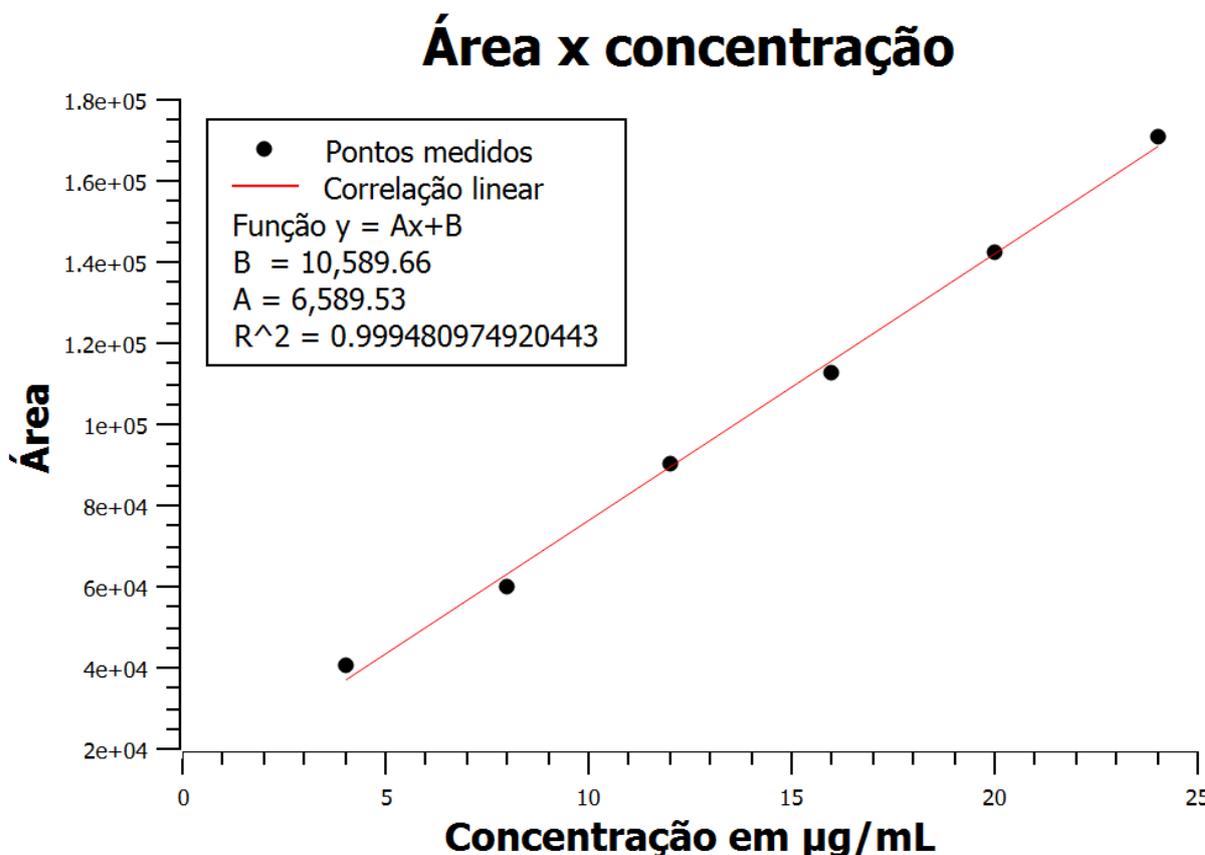
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

5.2.1 Taxa de encapsulação

Após leitura das soluções de diferentes concentrações de ciprofloxacina foi possível construir o Gráfico 1, expressando as áreas das curvas pela concentração de leitura.

Gráfico 1 – Correlação linear das leituras de diferentes concentrações no HPLC.



Fonte: Gerado pelo autor (Software SciDavis).

Após traçar uma correlação linear entre os pontos, o coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9995, muito próximo de 1, o que confirma uma forte correlação entre as leituras. Utilizando a equação da reta e os valores obtidos no gráfico para as constantes, coeficiente linear e angular, A e B, foi possível calcular a concentração da amostra de lipossoma com base no valor da área obtido pela leitura, que foi igual a 169027,5. Para a ciprofloxacina os valores encontrados de coeficientes foram $A=6589,53$ e $B=10589,66$, com coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,995. O valor de área obtido através da leitura foi de 1690,27. Aplicando a fórmula temos então que:

$$169027,5 = \text{Concentração de Ciprofloxacina} \times 6589,53 + 10589,66$$

$$\text{Concentração de Ciprofloxacina} = 24,04 \mu\text{g/mL}$$

Como foi feita uma diluição de 0,1 mL para 0,2 mL de isopropanol faz-se necessário o cálculo a seguir para a real concentração utilizando a fórmula de diluição:

$$0,1 \text{ mL} \times \text{concentração real} = 0,3 \text{ mL} \times 24,04 \mu\text{g/mL}$$

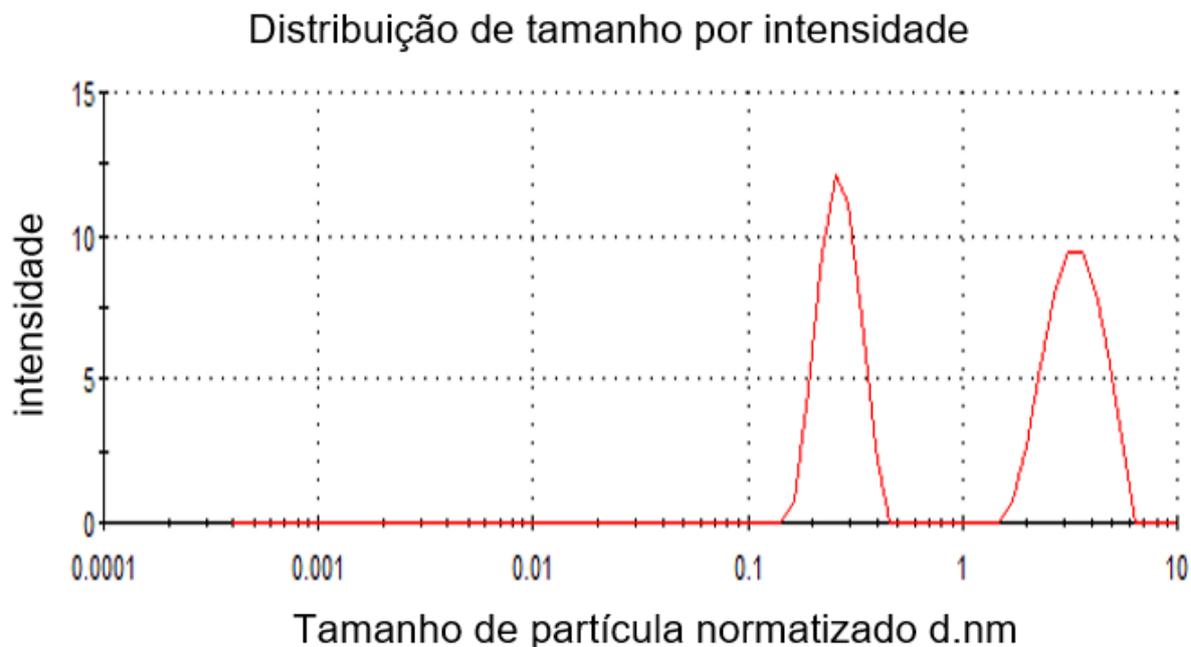
Concentração real = 72,16 µg/mL

Portanto temos que a concentração de ciprofloxacina encapsulada é de 72,16 µg/mL, e o quociente da divisão entre a concentração encapsulada e a inicial (250 µg/mL) resulta em uma taxa de encapsulação de 28,8%. O valor encontrado é menor do que o relatado por outros métodos na literatura, que podem ser encontrados valores entre 45 e 99% de encapsulamento (HAMBLIN et al., 2014; LIU et al., 2015). Isso mostra que apesar da confirmação do encapsulamento na metodologia utilizada para o presente trabalho, adaptações podem ser feitas futuramente para melhorar a eficiência do encapsulamento.

Utilizando dados como média e desvio padrão foi possível calcular o Limite de Detecção (Ld) do método que é de aproximadamente 21,13 µg/mL e o Limite de Quantificação (Lq) que é de aproximadamente 70,42 µg/mL. Esses valores indicam que é possível detectar concentrações acima de 21,13 µg/mL e quantificar concentrações acima de 70,42 µg/mL com confiança usando essa curva de calibração. Portanto, o valor calculado de 24,05 µg/mL está acima do Limite de Detecção (Ld) o que significa que a concentração da amostra pode ser detectada com confiança pelo método analítico utilizado.

5.2.2 Tamanho De Partícula DLS

O Gráfico 2, mostra os picos de tamanho de partículas obtidos através da leitura do lipossoma TSLC no equipamento de DLS, os lipossomas mostraram uma distribuição de tamanho de partículas em dois picos distintos. Um primeiro pico, que corresponde a 52,3% da intensidade da luz espalhada, está localizado em 340,0 nm, indicando que a maioria dos lipossomas possuem esse tamanho. O segundo pico, com 47,7% da intensidade, ocorre em 270,7 nm, evidenciando a presença de uma subpopulação de lipossomas menores.

Gráfico 2 – Distribuição tamanho de partículas TSLC.

Esses resultados podem ser atribuídos à variabilidade intrínseca no processo de formação dos lipossomas, frequentemente observada em métodos como a evaporação de fase reversa. Fatores como a concentração de lipídios, a taxa de evaporação e a técnica de agitação desempenham um papel crucial na uniformidade do tamanho das vesículas (WANG et al., 2019b). O tamanho médio das partículas, de 315,7 nm, está dentro da faixa considerada ideal para várias aplicações de liberação de fármacos e é consistente com as expectativas para a técnica de evaporação de fase reversa, que tipicamente gera vesículas unilamelares grandes (LUV) com tamanhos médios entre 100 e 500 nm (AL-JIPOURI et al., 2023).

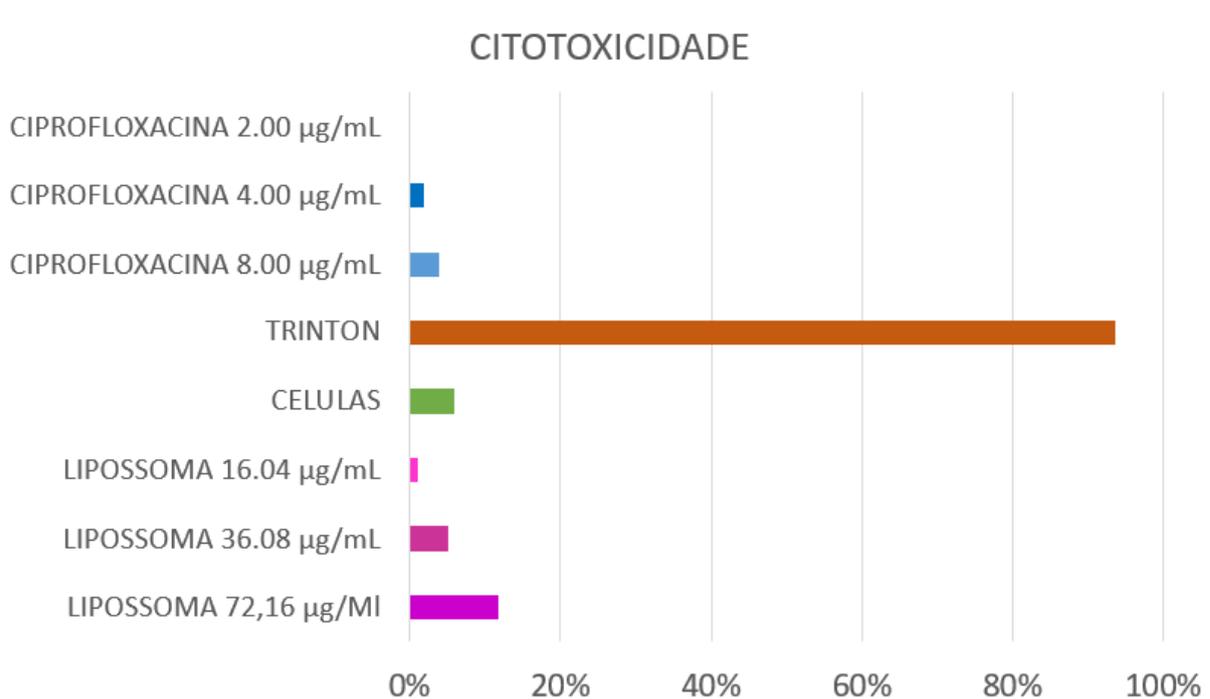
5.2.3 Biocompatibilidade

A escolha de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) se dá devido ao destaque que elas vêm ganhando no cenário de tratamento de feridas por suas propriedades regenerativas e imunomoduladoras. Elas são uma fonte abundante de células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares essenciais para a regeneração tecidual (KIM; HYUN; KIM, 2019) Além disso, as ADSCs secretam fatores que promovem a angiogênese e melhoram a cicatrização ao aumentar a formação de novos vasos sanguíneos (ALMALKI, 2022). Essas células

também desempenham um papel importante na modulação da inflamação, reduzindo o excesso de resposta inflamatória em feridas crônicas e criando um ambiente mais favorável para a cura (ZHU; QUAN, 2022). Em resumo, as ADSCs oferecem uma abordagem promissora para melhorar a cicatrização de feridas, especialmente em casos de feridas crônicas ou complicadas por infecções bacterianas, como úlceras diabéticas e queimaduras, o que a faz uma escolha ideal para estudos de bio compatibilidades com o lipossoma desenvolvido.

O ensaio de lactato desidrogenase (LDH) quantifica com precisão a citotoxicidade de substâncias químicas por meio da medição de LDH liberada de células danificadas. Danos à membrana plasmática liberam LDH no meio de cultura celular e ele pode ser quantificado por uma reação enzimática acoplada na qual a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato através da redução de NAD⁺ para NADH. A Diaphorase então usa NADH para reduzir um sal de Tetrazólio (INT) a um produto de Formazan vermelho que pode ser medido a 490 nm. O nível de formação de Formazan é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio, o que é indicativo de citotoxicidade.

Os valores de concentração de fármaco nos lipossomas utilizados foram de 72,1 µg/mL, 36,1 µg/mL, e 18,0 µg/mL. Para ciprofloxacina foram utilizadas as concentrações partindo de 8 µg/mL, 4 µg/mL até 2 µg/mL. O grau de citotoxicidade, em %, para cada concentração estão expressos no Gráfico 2.

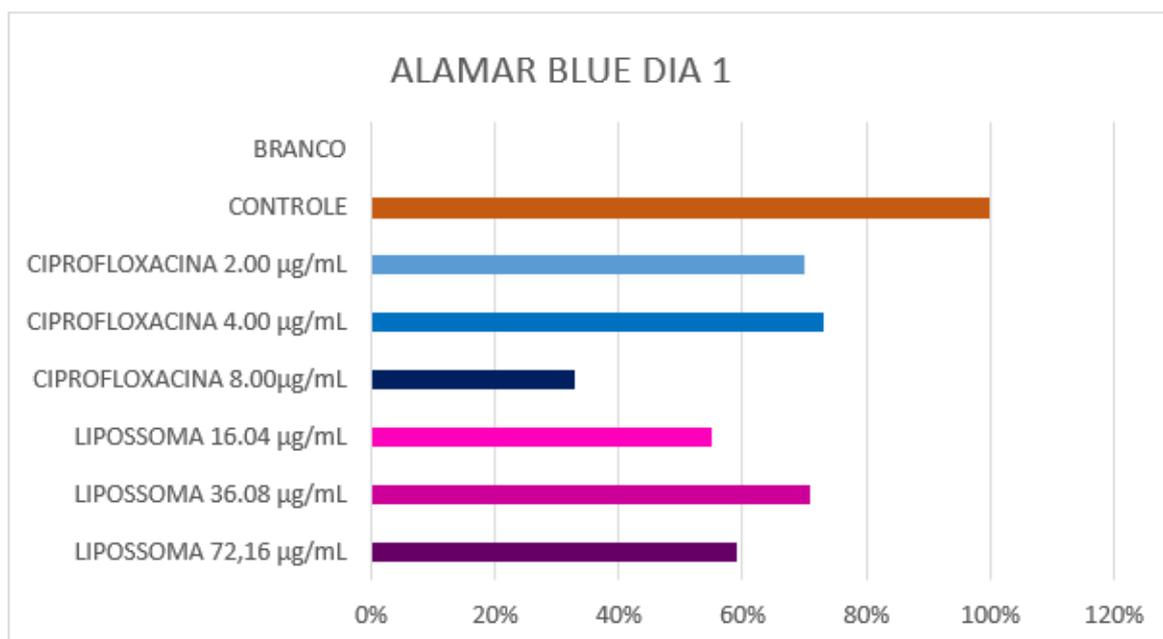
Gráfico 3 - Grau de citotoxicidade em %.

Fonte: Autor

Como é possível observar, os valores obtidos ficaram significativamente abaixo do controle negativo, o que comprova a ausência de citotoxicidade do TSLC. Esse resultado é um indicativo importante da segurança do uso do lipossoma em aplicações biológicas, reforçando seu potencial como um veículo eficaz para a administração de fármacos sem causar danos às células saudáveis.

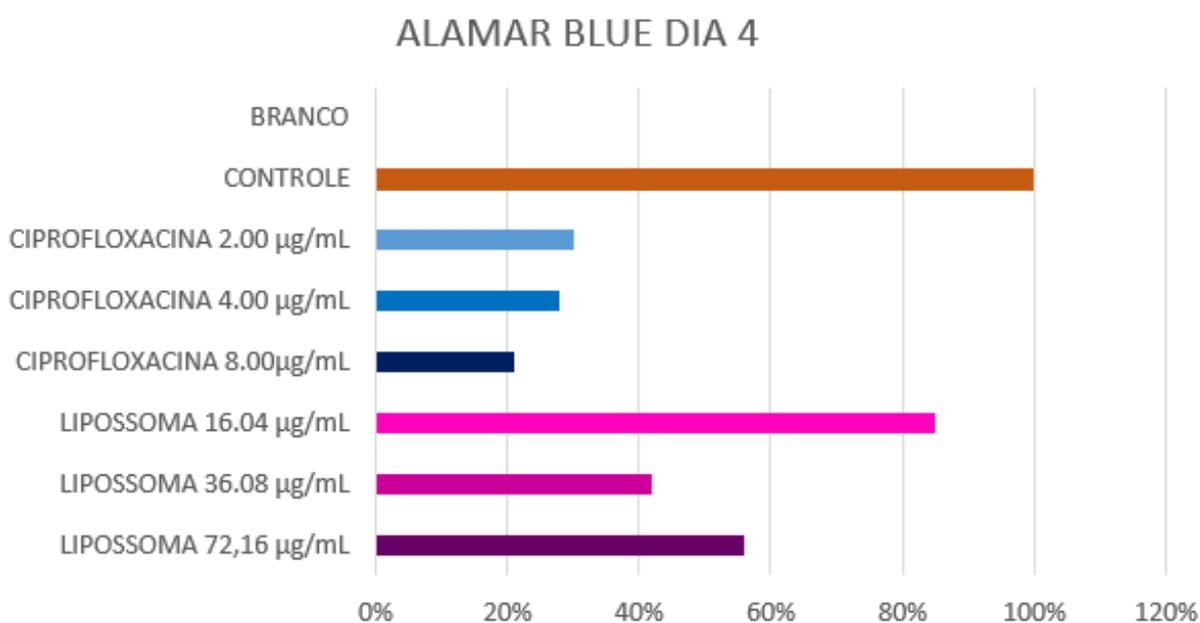
Um ensaio complementar à citotoxicidade é a análise da respiração celular através do teste de alarme blue, que consiste na conversão oxidativa da Resazurina em Resorufina pelo metabolismo de células viáveis. Quanto maior a quantidade de reagente sofrendo oxidação maior a quantidade de células vivas presentes no meio. Partindo de um controle positivo, com apenas o meio e as células, como sendo a quantidade máxima de células viáveis (100%) e um controle branco (0%) de meio e células é possível verificar, observando os Gráficos 3 e 4, que o lipossoma se mostrou biocompatível e apresentou valores melhores do que o fármaco puro, levando em consideração que as concentrações de fármaco estão cerca de 8 vezes maiores no lipossoma do que quando adicionado o fármaco puro. Esse dado corrobora os relatos da literatura sobre o aumento da biocompatibilidade de fármacos com a utilização de lipossomas (DYMEK; SIKORA, 2022)

Gráfico 4 – Quantidade de células viáveis no meio em % de Alamar blue reduzido – dia 1.



Após um dia de incubação a quantidade de células se mostrou semelhante entre as concentrações do lipossoma diferente do observado para o fármaco puro.

Gráfico 5 - Quantidade de células viáveis no meio em % de Alamar blue reduzido – dia 4.

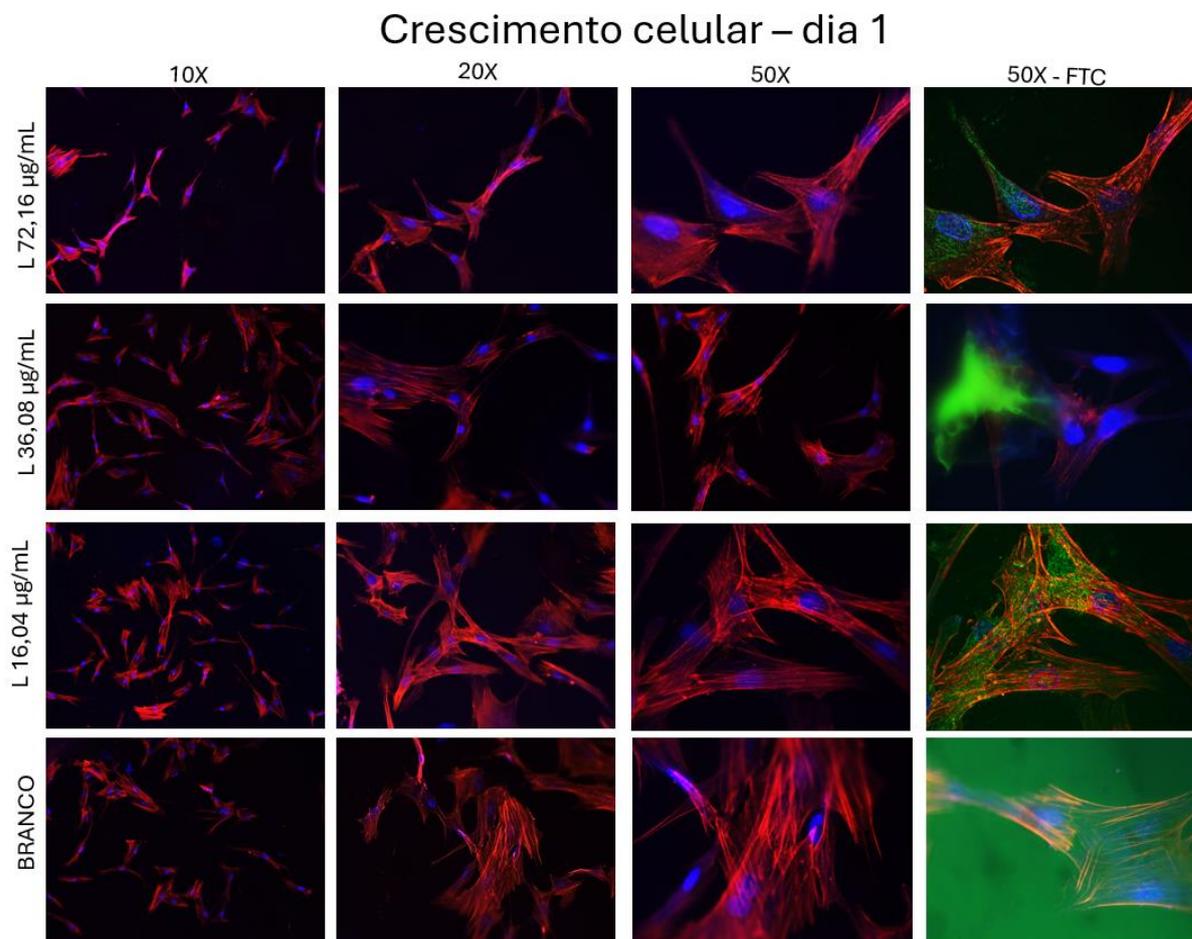


Já para o quarto dia de incubação, destaca-se que houve uma troca do meio sem nova adição de células, o lipossoma mesmo possuindo uma concentração maior de fármaco encapsulado demonstrou um comportamento similar ao do dia um, diferente do fármaco que teve redução considerável de quantidade de células.

Comprovando novamente que o lipossoma é biocompatível, não influencia significativamente no desenvolvimento celular e possui resultados melhores dos que os obtidos para fármaco puro. O resultado obtido para o teste pode ser considerado altamente satisfatório e equiparável com outras formulações de lipossomas com o fármaco ciprofloxacina na literatura (KARPUZ et al., 2023; STANCHEVA et al., 2023).

Como uma forma de entender a interação do lipossoma com as células e verificar sua fusogenicidade, foi realizado a microscopia de fluorescência, com diferentes corantes para identificação do núcleo celular, do citoplasma e do lipossoma em si. As imagens obtidas estão mostradas na Figura 26, nota-se que quanto menor a concentração de fármaco no lipossoma maior a quantidade de proliferação celular, onde o lipossoma mais diluído evidência crescimentos celulares muito parecidos com a do controle, evidenciando novamente sua alta biocompatibilidade. Já na quarta coluna com o filtro do comprimento de onda abrangente ao FITC é evidenciado que o lipossoma permeia e se distribui pelo citoplasma celular, provando sua capacidade fusogênica.

Figura 26 - Crescimento celular e fusogenicidade – dia 1



Fonte: Autor

No controle branco, sem adição de lipossoma, como esperado, a aplicação do filtro para FITC resulta em uma saturação excessiva da imagem. Isso ocorre porque, na ausência de substâncias que absorvem esse comprimento de onda, não há compostos detectáveis.

Todos os dados apresentados nesta seção são complementares entre si e indicam de forma similar que a formulação desenvolvida neste trabalho pode ser utilizada em meios biológicos com pouco ou nenhum risco de toxicidade.

5.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E BACTERICIDA CMI E CMB

5.3.1 Concentração mínima inibitória e bactericida por Resazurina

Após o preparo das placas, totalizando 24 para assegurar repetibilidade, as concentrações finais de fármaco em cada poço da placa, tanto nos lipossomas

utilizados nos ensaios quanto do fármaco puro, se encontram na Figura 27 a seguir decaindo pela metade em cada fileira de acordo com a diluição seriada realizada.

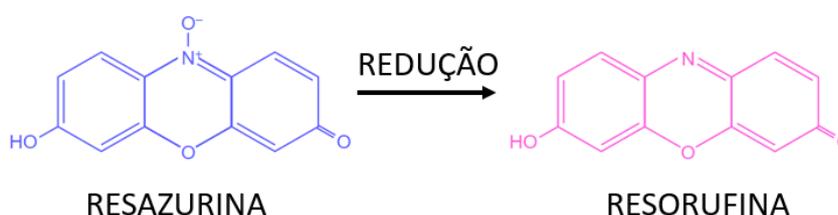
Figura 27 - Concentração de fármaco nos poços.

	TSLC			TSLB			CONTROLE					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,60 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			8,00 µg/mL
B	1,80 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			4,00 µg/mL
C	0,90 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			2,00 µg/mL
D	0,45 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			1,00 µg/mL
E	0,22 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			0,50 µg/mL
F	0,11 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			0,25 µg/mL
G	0,06 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			0,13 µg/mL
H	0,03 µg/mL			0 µg/mL			○	○	○			0,07 µg/mL

Fonte: Autor

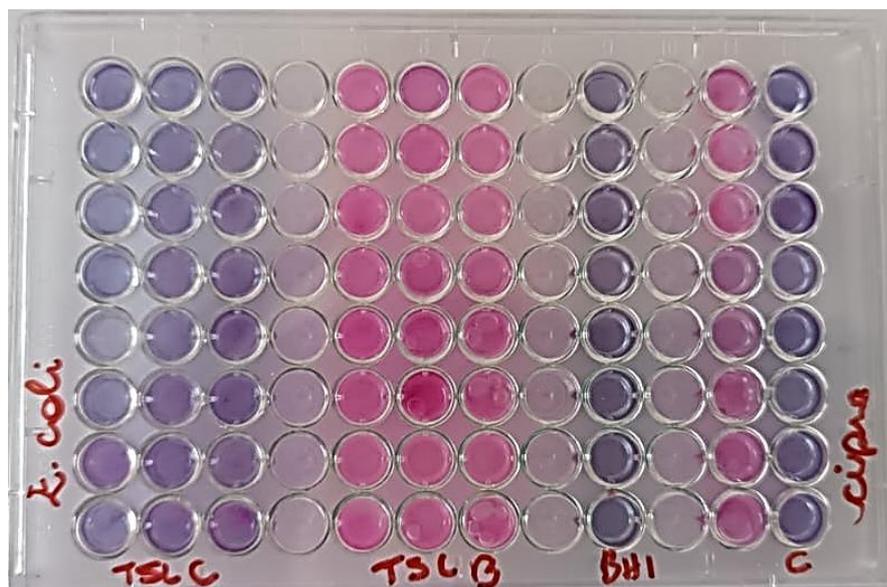
O Indicador Resazurina ou Alamar Blue permite a determinação da propriedade inibitória através da mudança de coloração. Inicialmente azul escuro quando incubado com microrganismos vivos, o reagente muda de cor de azul para rosa em condições metabólicas favoráveis, isso porque dentro das células o reagente é reduzido em Resorufina (AL-NASIRY et al., 2007) Figura 28, caso não haja alteração na coloração é possível afirmar que não há atividade metabólica, ou seja, não há microrganismos vivos. Ao se adicionar Resazurina, é possível então, por este princípio, fazer a leitura das placas e determinar a menor concentração do composto que inibe o crescimento visível das bactérias (CMI).

Figura 28 - Resazurina reduzida em Resorufina



Fonte: Gerados por ChemDraw

A Figura 29 exemplifica uma das placas obtidas, onde é possível visualizar onde ocorreu a inibição, coloração se manteve azul, e onde houve o crescimento bacteriano, Resazurina foi convertida a Resorufina, coloração rosa.

Figura 29 - Placa de ensaio de concentração mínima inibitória para *E. coli*

Fonte: Autor

Nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, é possível visualizar os valores de concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) obtidos nos ensaios. O lipossoma TSLC demonstrou-se mais eficiente que a ciprofloxacina pura ao ser comparado para cepas bacterianas Gram-positivas. Para *S. aureus* e *S. epidermidis*, a concentração mínima do fármaco encapsulado no lipossoma necessária para inibição foi 4,4 vezes menor do que a necessária para o fármaco puro. Esse cenário é ainda mais favorável para a cepa *S. aureus* HU-25, onde a menor concentração de fármaco no lipossoma requerida para inibir o crescimento bacteriano foi 10 vezes inferior à necessária para a ciprofloxacina pura. Para a cepa Gram-negativa *E. coli*, o valor de CMI obtido foi muito próximo ao do fármaco puro, apresentando-se ligeiramente superior. Em contrapartida, o lipossoma controle TSLB, como esperado, não apresentou atividade antimicrobiana, evidenciada pela redução completa da Resazurina, com todos os poços assumindo coloração rosa, o que comprova que o lipossoma por si só não possui propriedades antimicrobianas.

Tabela 2 - Valores de CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra *S. aureus* HU25.

<i>S. aureus</i> HU25		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,22	S/I*
Vancomicina	1,0	S/I*

Ciprofloxacina	2,0	S/I*
----------------	-----	------

*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

Tabela 3 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,45	S/I*
Vancomicina	1,0	S/I*
Ciprofloxacina	2,0	S/I*

*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

Tabela 4 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco), lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra *S. epidermidis*.

<i>S. epidermidis</i>		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,90	S/I*
Vancomicina	1,0	S/I*
Ciprofloxacina	4,0	S/I*

*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

Tabela 5 - Valores do CMI e CMB de lipossomas (Branco) e lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) contra *E. coli*.

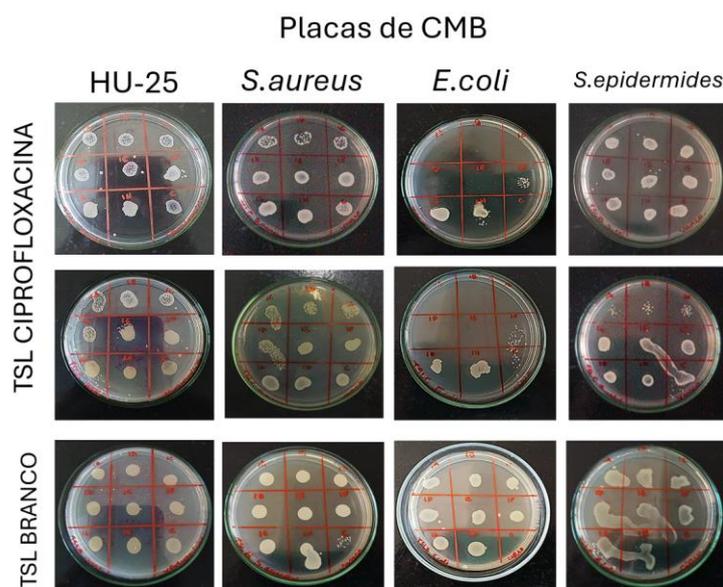
<i>E. coli</i>		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,06	0,06
Ciprofloxacina	0,07	0,07

*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

Os resultados destacam a eficácia dos lipossomas como sistemas de entrega de medicamentos para o tratamento de infecções bacterianas, enfatizando o potencial dos biomateriais em melhorar a ação antibacteriana de um fármaco.

Como um complemento a concentração mínima inibitória a concentração mínima bactericida CMB, também expressa nas tabelas anteriores, indica a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de matar a população bacteriana. Apesar de ótimos resultados quanto a atividade inibitória para o lipossoma TSLC e o fármaco, eles não apresentaram atividade bactericida para as cepas de *S.aureus*, *S.epidermidis* e *S.aureus HU-25*, como é possível visualizar na Figura 30, após maior tempo de incubação houve o crescimento bacteriano em toda placa. Já para a cepa Gram-negativa *E. coli*, ambos apresentaram propriedades bactericidas, exatamente nos poços evidenciados a atividade inibitória, concentração próxima a 0,07 µg/mL para ambos, reafirmando a maior eficiência da ciprofloxacina para controle de bactérias Gram-negativas. Como esperado, assim como CMI, o lipossoma branco TSLB também não apresentou atividade bactericida.

Figura 30 - Placas de ensaios para determinação da concentração mínima bactericida.



Fonte: Autor.

5.3.2 Concentração mínima inibitória pela leitura de absorbância

O método de leitura de absorção é útil para determinar a eficácia do lipossoma contra diferentes microrganismos de uma maneira mais quantitativa. Eles fornecem uma maneira rápida e precisa de avaliar a atividade inibitória e bactericida.

As placas montadas foram incubadas em dois diferentes tempos para uma análise da atividade do lipossoma e da ciprofloxacina em estágios diferentes do crescimento bacteriano, sendo considerada para determinação da concentração mínima inibitória a de 24 horas. Cada triplicata do ensaio foi lida no *Plate Reader* e para cada composto foi realizada a média entre as leituras para que se pudesse gerar os gráficos a seguir, cada um deles reúne leituras das fileiras de cada poço da placa de 96 de A à H, as concentrações de fármaco decaem com a fileira pela metade de acordo com a diluição seriada realizada (Figura 31), com exceção do PBS e TSA que não possuem fármaco e servem como um branco e prova de que o meio e a solução não influenciam no crescimento bacteriano nem possuem capacidades inibitórias ou bactericidas.

Figura 31 - Concentração de fármaco nos poços das placas de CMI e CMB por absorbância

	TSLC			CIPRO.			PBS			TSA		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,60 µg/mL			8,00 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
B	1,80 µg/mL			4,00 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
C	0,90 µg/mL			2,00 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
D	0,45 µg/mL			1,00 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
E	0,22 µg/mL			0,50 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
F	0,11 µg/mL			0,25 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
G	0,06 µg/mL			0,13 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		
H	0,03 µg/mL			0,07 µg/mL			0 µg/mL			0 µg/mL		

Fonte: Autor

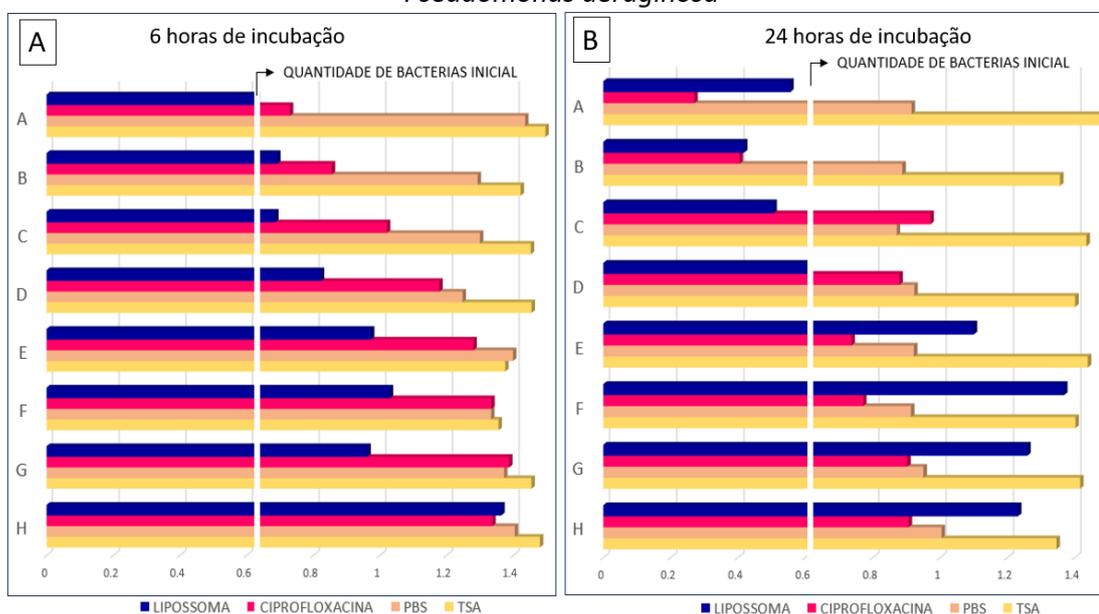
A primeira cepa lida foi a de *Pseudomonas aeruginosa*, no Gráfico 6A é possível visualizar que, utilizando o referencial de quantidade inicial de bactéria adicionada a cada placa como parâmetro, somente a primeira diluição de TSLC, poços da fileira A da placa, apresentou capacidade inibitória prevenindo que o crescimento bacteriano ocorresse. A ciprofloxacina inibiu o crescimento bacteriano, mas demonstrou um retardamento no aumento da concentração de bactérias, assim como o lipossoma. Os meios PBS e TSA não influenciaram no aumento dos valores de absorbância correlativamente ao crescimento bacteriano.

Após 24h de incubação, gráfico 6B, é possível visualizar que o lipossoma inibiu o crescimento bacteriano até a quarta diluição, e demonstrou capacidade bactericida

em duas diluições, fileira B e C, com uma redução significativa na concentração de bactérias. A ciprofloxacina apresentou a mesma capacidade que o lipossoma, porém até a segunda diluição, fileira B. As concentrações no PBS se mantiveram quase que as mesmas, acreditando-se que as bactérias tenham chegado ao seu limite de crescimento na solução dentro do período. O meio TSA se mostrou o mais favorável para o crescimento bacteriano com os maiores valores de absorbância medidos e flutuações sutis entre os valores.

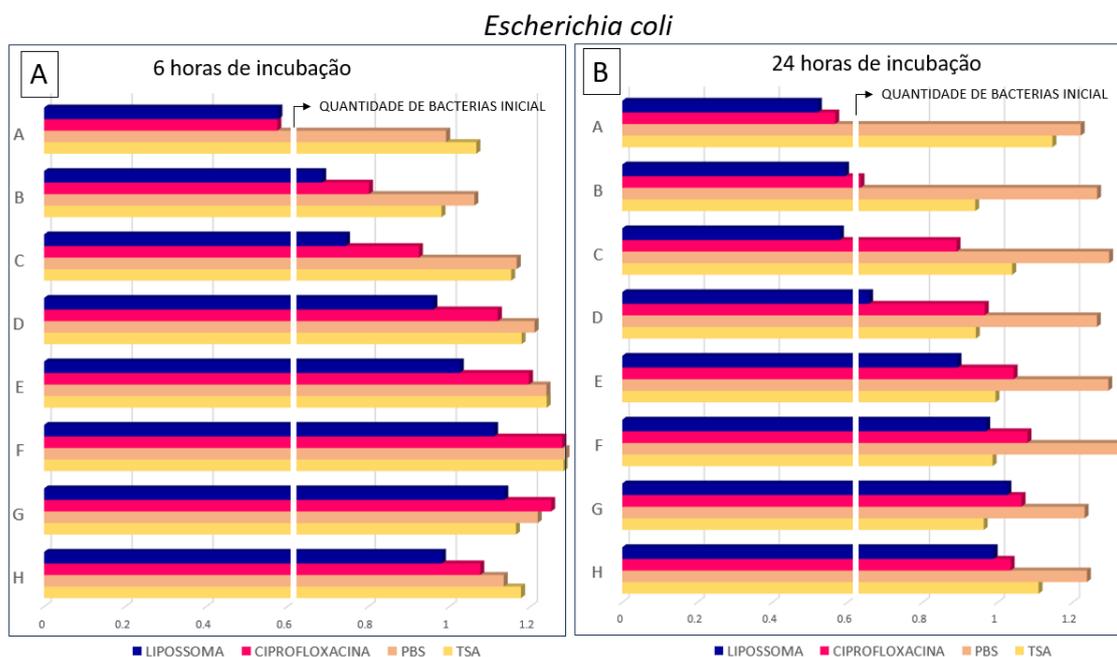
Gráfico 6 – CMI e CMB *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa



Fonte: Autor

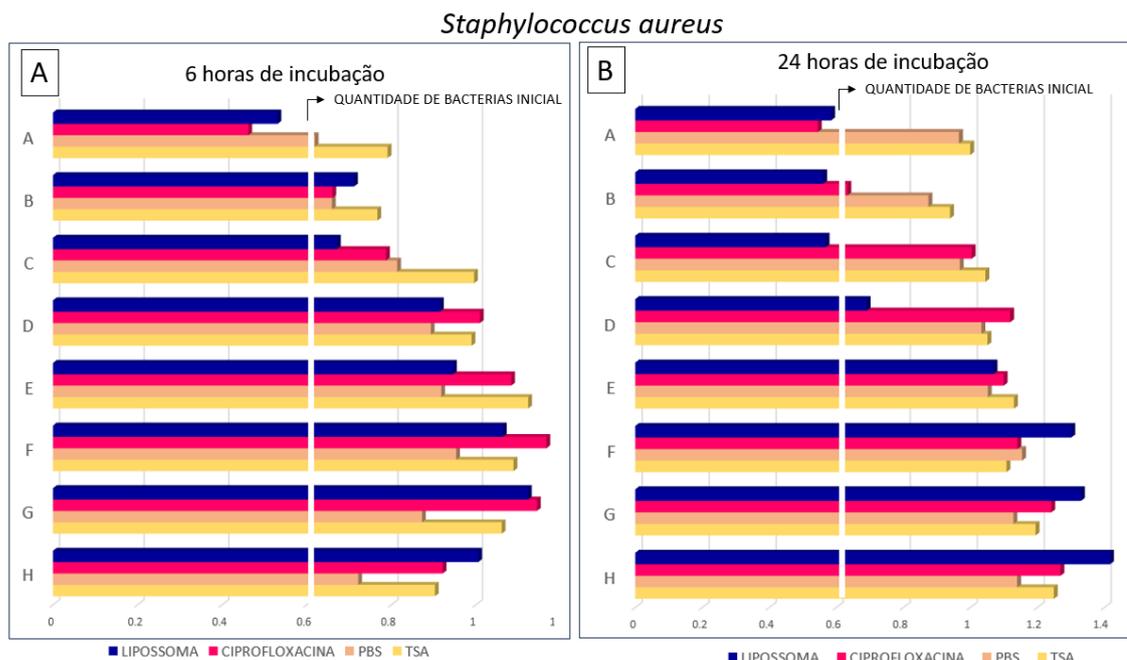
Para *Escherichia coli* os resultados, Gráfico 7 se mostraram muito similares aos obtidos para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, a maior diferença é que tanto lipossoma como a ciprofloxacina não se mostraram tão eficiente em reduzir a quantidade de bactérias após 24 horas para *E.coli* como na anterior.

Gráfico 7 – CMI e CMB *Escherichia coli*

Fonte: Autor

Como ambas são bactérias Gram-negativas é coerente que os resultados sejam parecidos, e assim como no teste anterior é observado a melhora da atividade do fármaco, que se encontra em uma menor concentração que nos lipossomas e ainda sim eles possuem melhores resultados.

Para a última cepa, a *Staphylococcus aureus*, na placa incubada por 6 horas o resultado se manteve o mesmo que das anteriores para o lipossoma com inibição somente na primeira diluição, gráfico 8A, comparando ele a ciprofloxacina em relação a valores de concentração o lipossoma tem uma vantagem em relação ao fármaco já que na primeira diluição ele tem cerca de metade da concentração da ciprofloxacina. Após as 24 horas de incubação, gráfico 8B, o lipossoma manter uma constância nas leituras de absorvância até a terceira diluição, fileira C, e a ciprofloxacina ainda se mantém na primeira diluição, fileira A, como no resultado das 6 horas de incubação.

Gráfico 8 –CMI e CMB *Staphylococcus aureus*.

A diferença entre os valores de CMI obtidos por esse ensaio, Tabelas 6, 7 e 8, para a o lipossoma e a ciprofloxacina foram bem acentuadas, reafirmando a eficácia aprimorada do lipossoma em comparação ao fármaco puro, mesmo contra cepas Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*.

A concentração mínima bactericida não foi evidenciada para nenhuma cepa bacteriana. Os meios para todas as cepas como esperado não apresentaram nenhuma atividade.

Tabela 6 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	<i>S/I</i> *	<i>S/I</i> *
TSLC	0,90	<i>S/I</i> *
Ciprofloxacina	8,0	<i>S/I</i> *

**S/I sem inibição do crescimento bacteriano*

Tabela 7 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	
CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)

Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,90	S/I*
Ciprofloxacina	4,0	S/I*

*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

Tabela 8 - Valores do CMI e CMB para lipossoma encapsulado com ciprofloxacina (TSLC) e o fármaco puro contra *E. coli*.

<i>E. coli</i>		
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
Branco	S/I*	S/I*
TSLC	0,90	S/I*
Ciprofloxacina	8,0	S/I*

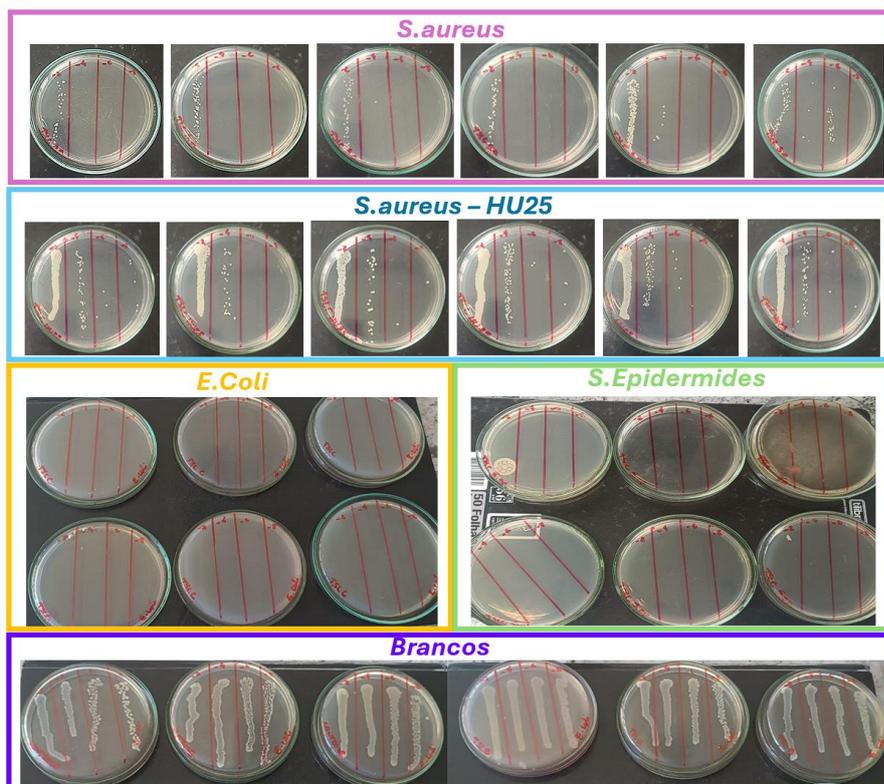
*S/I sem inibição do crescimento bacteriano

5.4 POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBIOFILME

5.4.1 Biofilme por contagem de unidades formadoras de colônias

O estudo in vitro do biofilme foi conduzido utilizando uma concentração de fármaco nos lipossomas equivalente à metade da Concentração Mínima Inibitória (CMI), com o propósito de investigar o impacto dos lipossomas na formação de comunidades microbianas. Após um período de incubação de 24 horas, a eficácia anti-biofilme foi avaliada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) utilizando a técnica de diluição em placa. As contagens de UFC foram realizadas em várias diluições (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8}) para determinar a última concentração viável para a contagem das colônias. Apesar de não apresentar atividade bactericida o lipossoma TSLC mostrou (Figura 32) bons resultados antibiofilme para a *S.aureus* e *S.aureus HU-25*, apresentando formação de UFC somente nas concentrações mais elevadas de bactérias, para *S.epidermidis* e *E-Coli* os resultados obtidos foram excelentes, não havendo nenhuma formação de UFC em nenhuma das placas montadas.

Figura 32 - Placas realizadas para contagem de UFC.

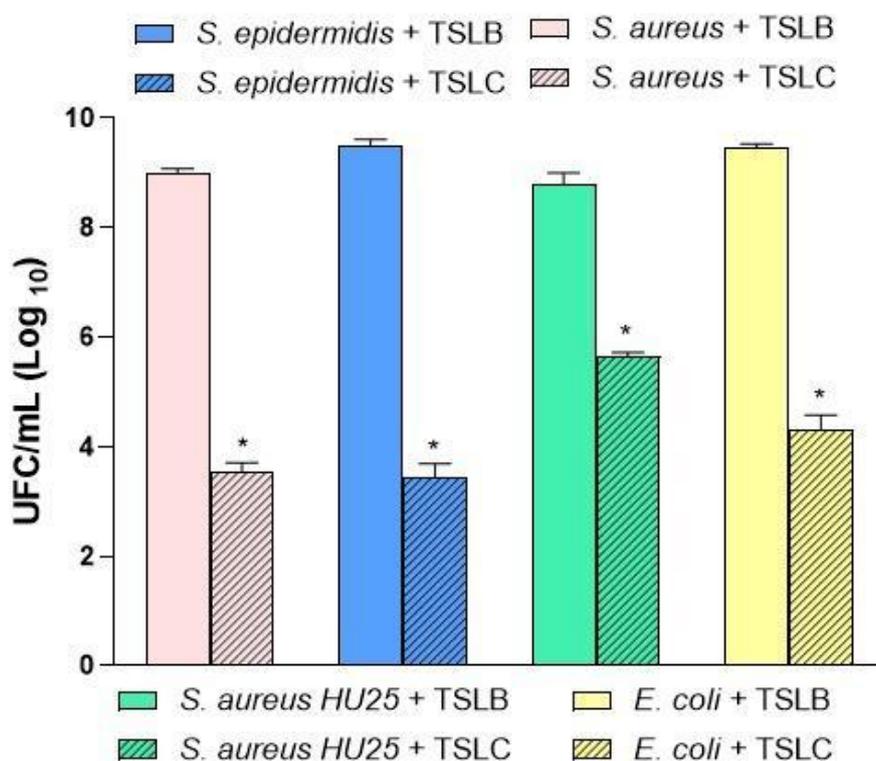


Fonte: Autor

O TSLB foi utilizado como comparativo já que ele não possui atividade bactericida nem inibidora e como esperado houve a formação de UFC em todas as placas de testes, algumas exemplificadas na Figura 32, a formação se mostrou densa impossibilitando a contagem.

Para melhor visualizar estes dados foram tratados para expressar o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro, Através dos cálculos foi gerado o Gráfico 9, que mostra os valores de UFC/mL para todas as cepas com o branco como comparativo.

Gráfico 9 - Número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em biofilmes de *S.aureus*, *S.aureus HU-25*, *S.epidermidis* e *E.coli*.



Fonte: Autor

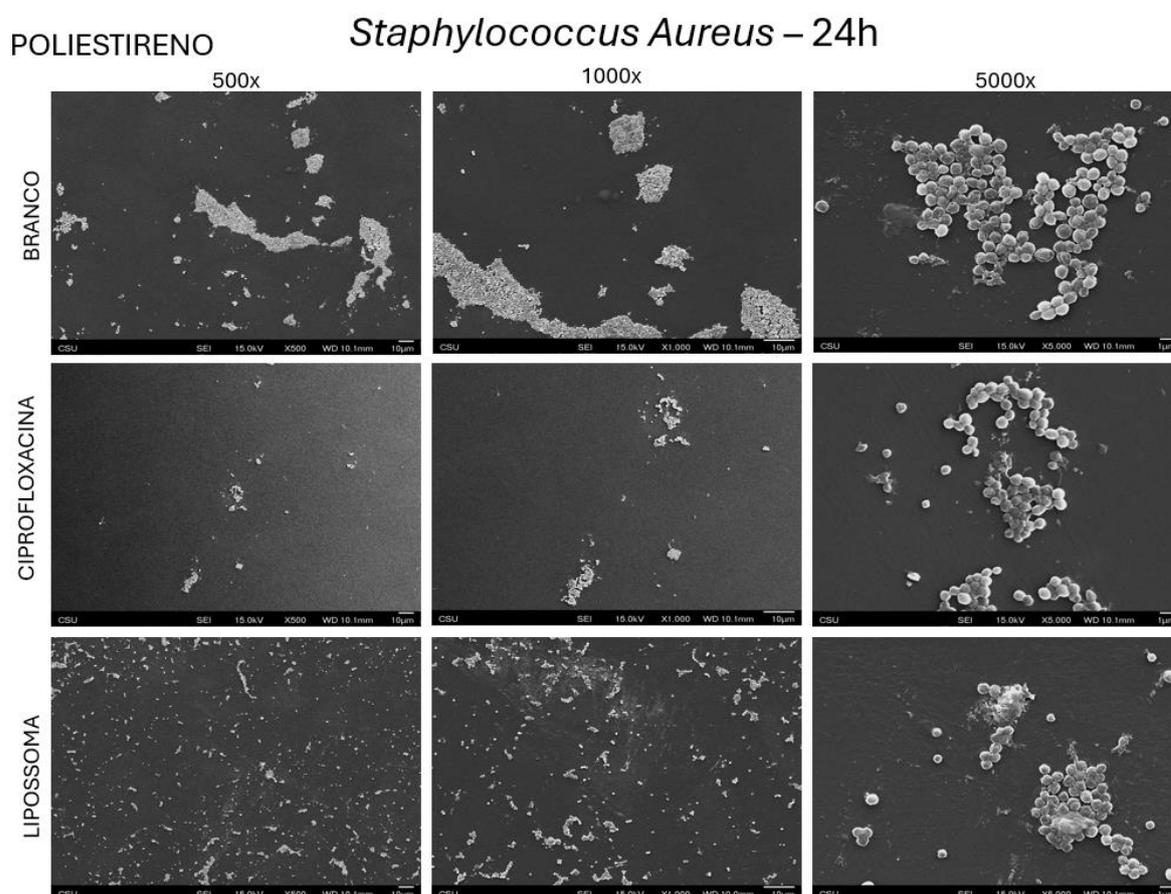
As unidades formadoras de colônias são uma medida comum de quantificar a viabilidade bacteriana após um tratamento antibacteriano. Quando avaliado a atividade antibiofilme do TSLC em comparação ao TSLB, ele se mostrou eficaz na redução de formação das UFCs e até preveniu a formação delas, isso sugere que ele pode ser capaz de penetrar no biofilme bacteriano e afetar as células bacterianas dentro dele.

5.4.2 Crescimento de biofilme em poliestireno e vidro

A avaliação do potencial anti-biofilme por este método baseia-se em uma análise integrada das imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência. A MEV oferece uma caracterização detalhada da morfologia, integridade estrutural e densidade das colônias bacterianas, além de identificar a formação de biofilmes. Paralelamente, a microscopia de fluorescência permite a discriminação entre células bacterianas viáveis e não viáveis, elucidando se as estruturas visualizadas na MEV correspondem a biofilmes metabolicamente ativos ou a células bacterianas inviáveis.

Para a *Staphylococcus aureus*, as Figuras 33 e 34, elucidam se houve a formação de biofilme em substratos de poliestireno e vidro após 24 horas de incubação. No substrato de poliestireno, o controle branco exibe uma formação densa de biofilme, com colônias bacterianas bem estabelecidas em todas as magnificações, o que indica uma proliferação sem impedimentos. No entanto, a introdução da ciprofloxacina resulta em uma diminuição significativa na densidade do biofilme, sugerindo que o antibiótico foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano. O tratamento com lipossomas também mostrou uma redução na formação de biofilme, embora colônias bacterianas ainda sejam visíveis, o que sugere que os lipossomas possuem atividade antibiofilme, mas potencialmente menos eficaz do que a ciprofloxacina.

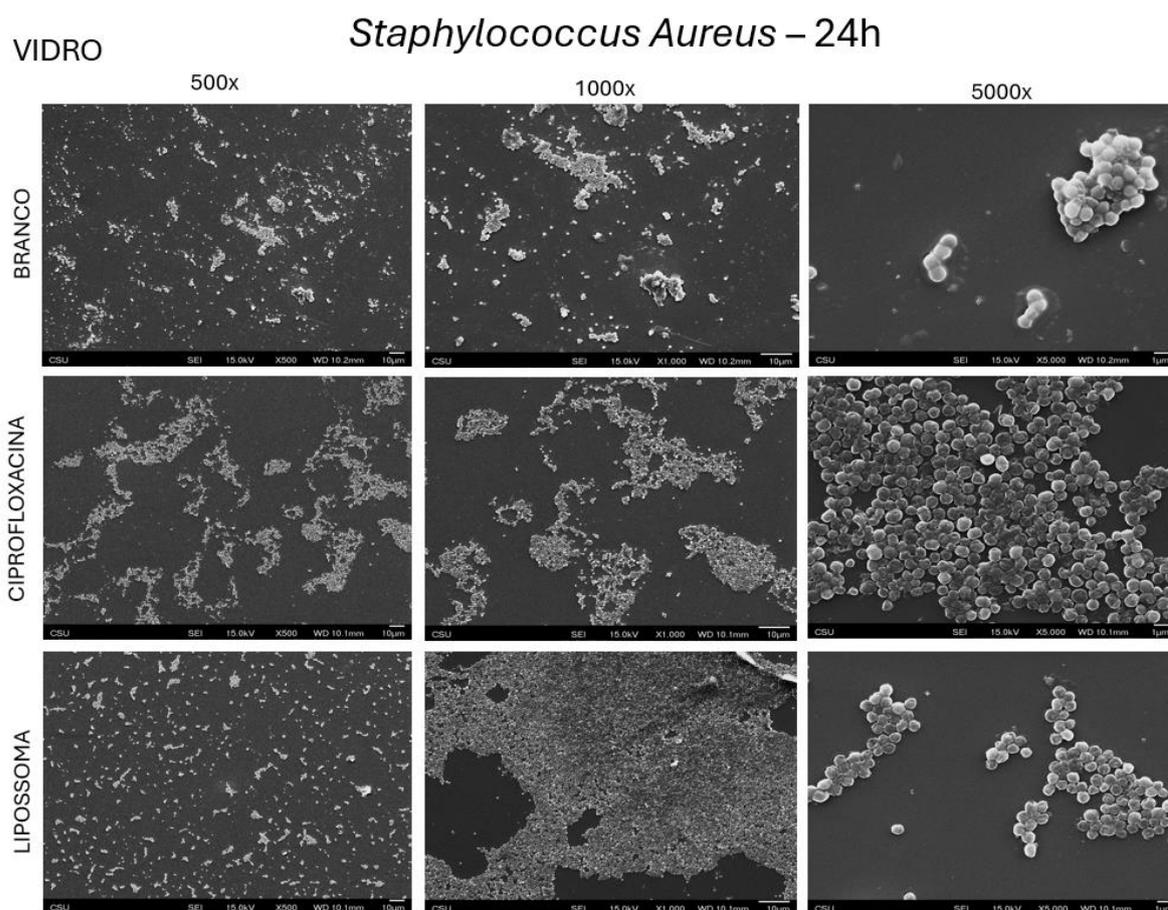
Figura 33 - Microscopia eletrônica de varredura *Staphylococcus aureus* em poliestireno.



Observações semelhantes podem ser feitas para o substrato de vidro. No controle branco, há uma presença substancial de biofilme, com colônias bacterianas bem distribuídas pela superfície. O tratamento com ciprofloxacina novamente demonstra uma redução clara na formação do biofilme, com menos colônias visíveis, reforçando a eficácia do antibiótico. No entanto, o efeito dos lipossomas no substrato

de vidro parece ser mais pronunciado do que no poliestireno, com uma dispersão maior das colônias e uma aparente redução na quantidade total de biofilme. Isso pode sugerir uma interação diferencial entre o material do substrato e a eficácia dos lipossomas.

Figura 34 - Microscopia eletrônica de varredura *Staphylococcus aureus* em vidro.

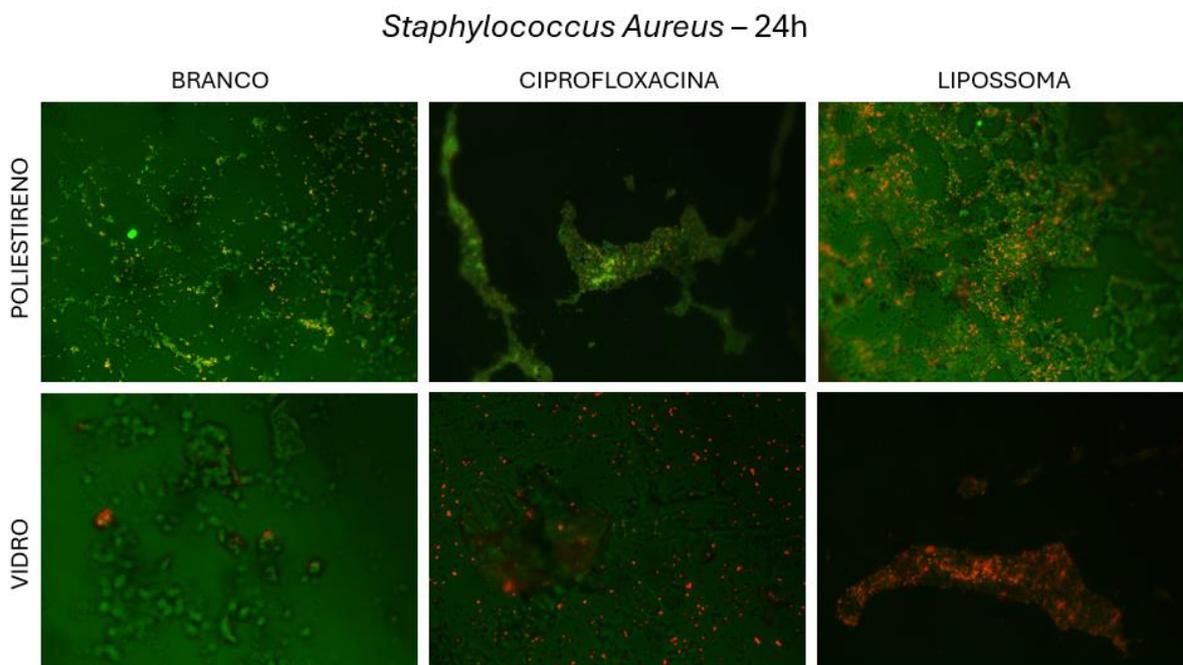


Porém, ao combinar a análise à microscopia de fluorescência, é possível obter uma perspectiva adicional. Após as 24h de incubação, Figura 35, o controle branco, tanto no poliestireno como no vidro, mostra uma predominância de células viáveis, o que é esperado devido à ausência de agentes antibacterianos. A ciprofloxacina, por outro lado, apresenta uma menor densidade de bactéria e maior quantidade de bactérias mortas do que o controle, confirmando seu efeito bactericida, porém no poliestireno a densidade de bactérias vivas pode confirmar a formação do biofilme.

Já para o lipossoma apesar da grande densidade bacteriana como visto no MEV, há uma prevalência de bactérias mortas, mostrando que apesar da evidência de alta formação da colônia bacteriana, principalmente no MEV do vidro, não

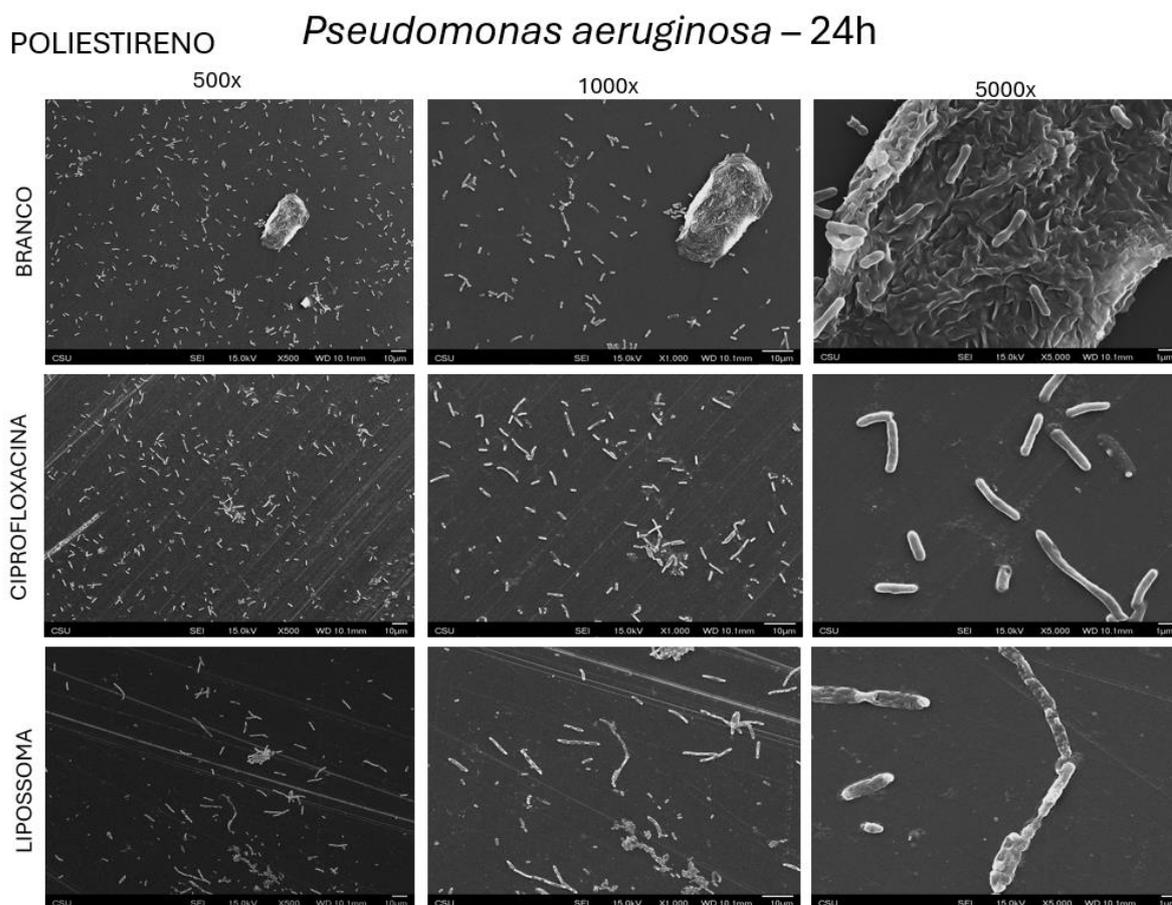
necessariamente essas colônias estão viáveis, sugerindo que, os lipossomas induzem a morte bacteriana, e possuem capacidade antibiofilme para esta cepa.

Figura 35 - Microscopia de fluorescência *Staphylococcus aureus*.



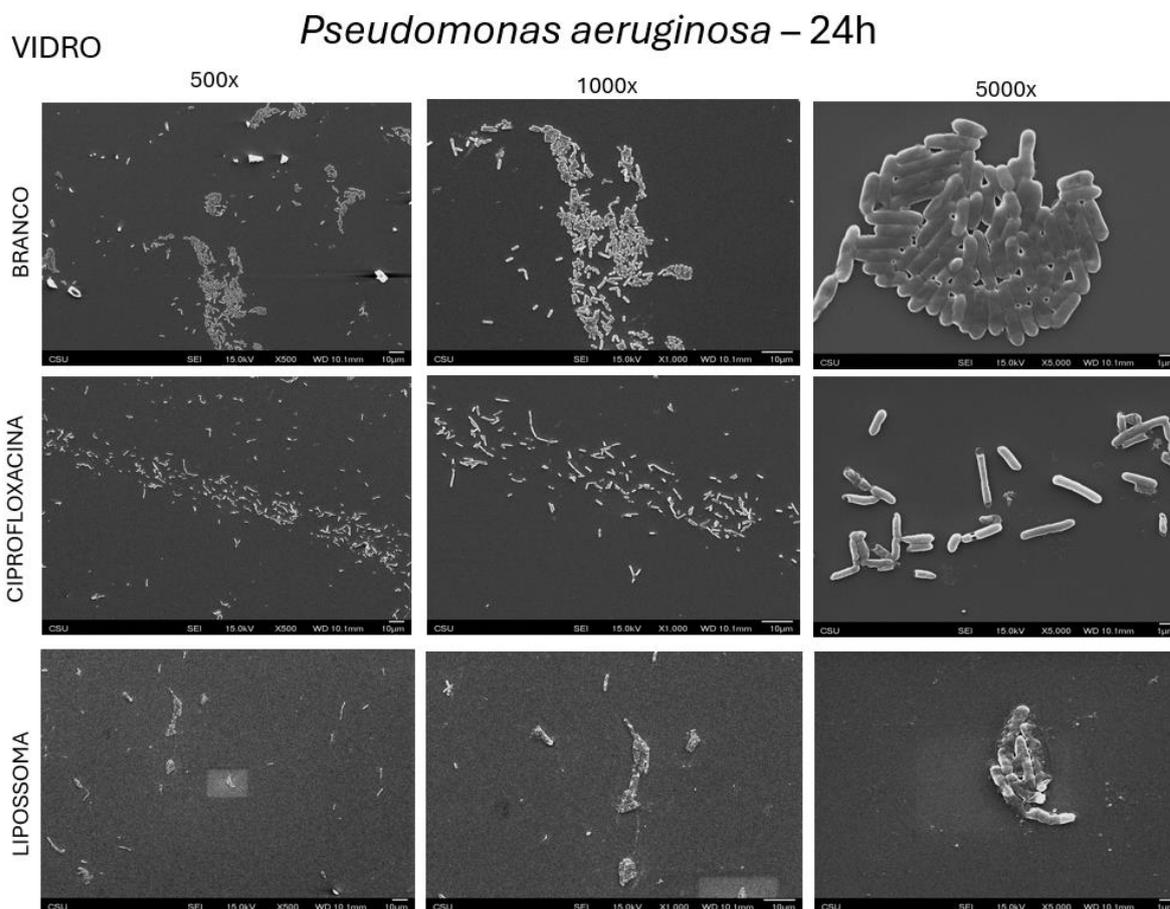
Para a *Pseudomonas aeruginosa* em substratos de poliestireno e vidro, com avaliações feitas após 24 horas de incubação, nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Figura 36, observa-se que, no controle branco sobre poliestireno, há uma significativa formação de biofilme, com presença de colônias bem distribuídas e organizadas, como indicado pelas imagens em várias magnificações. Quando a ciprofloxacina é aplicada, observa-se uma redução visível na densidade das bactérias, o que sugere a eficácia do antibiótico em diminuir a formação de biofilme. As imagens mostram menos agregados bacterianos em comparação com o controle, embora algumas células ainda sejam visíveis. O tratamento com lipossomas também apresenta uma redução na densidade bacteriana, mas com agregados dispersos, o que sugere uma atividade antibiofilme, a integridade da parede celular das bactérias também parece comprometida, o que pode indicar a morte delas.

Figura 36 - Microscopia eletrônica de varredura *Pseudomonas aeruginosa* em poliestireno.

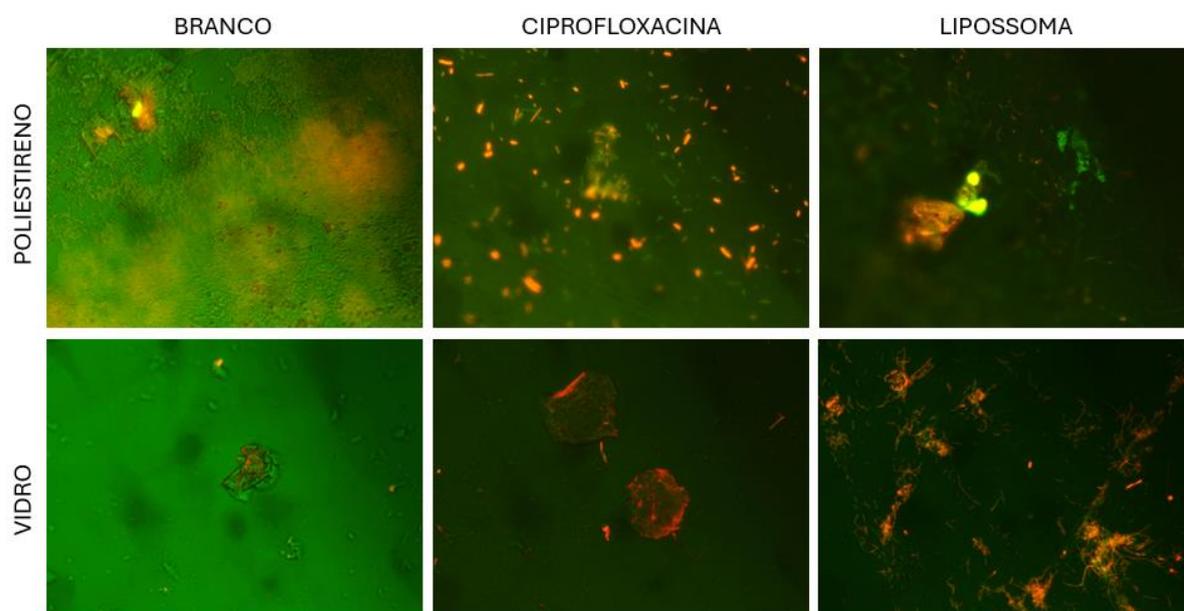


No substrato de vidro, Figura 37, a formação de biofilme novamente é notável no controle branco, com grandes agregados bacterianos bem definidos. A aplicação de ciprofloxacina, assim como no poliestireno, reduz significativamente a presença de bactérias, resultando em agregados bacterianos menores e menos numerosos. Os lipossomas, por outro lado, demonstram uma capacidade antibiofilme muito superior com poucos agregados bacterianos dispersos e novamente a parede celular bacteriana parece comprometida,

Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura *Pseudomonas aeruginosa* em vidro.



Quando analisamos as imagens de microscopia de fluorescência para a *Pseudomonas aeruginosa*, Figura 38, é reforçado que o controle branco, tanto no poliestireno quanto no vidro, predomina células viáveis com biofilmes bem formados e imagens muito saturadas devido alta densidade bacteriana. A ciprofloxacina demonstrou uma redução na densidade bacteriana e presença de bactérias mortas e inibição clara do biofilme em ambos os substratos. O tratamento com o lipossomas apresentou alta eficiência na diminuição da quantidade de bactérias e uma mistura de células viáveis e mortas e prevenção da formação do biofilme, mostrando eficácia antibacteriana e anti-biofilme.

Figura 38 - Microscopia fluorescência *Pseudomonas aeruginosa*.*Pseudomonas aeruginosa* – 24h

Por fim a análise da formação de biofilme por *Escherichia coli* em substratos de poliestireno e vidro, nas imagens de MEV, Figuras 39 e 40, o controle branco em ambos os substratos revela uma densa formação de biofilme, com colônias bem estabelecidas, especialmente visíveis nas maiores magnificações. Quando a ciprofloxacina é aplicada, resulta em uma redução no número de colônias, mas algumas áreas ainda apresentam agrupamentos bacterianos, sugerindo que a ciprofloxacina possui um efeito anti biofilme, embora menos potente que o lipossoma encapsulado com ela, que revela uma redução significativa na densidade bacteriana em ambas as superfícies, com menos colônias visíveis e uma predominância de células isoladas, indicando ser eficaz na inibição do biofilme.

Figura 39 - Microscopia eletrônica de varredura *Escherichia coli* em poliestireno.

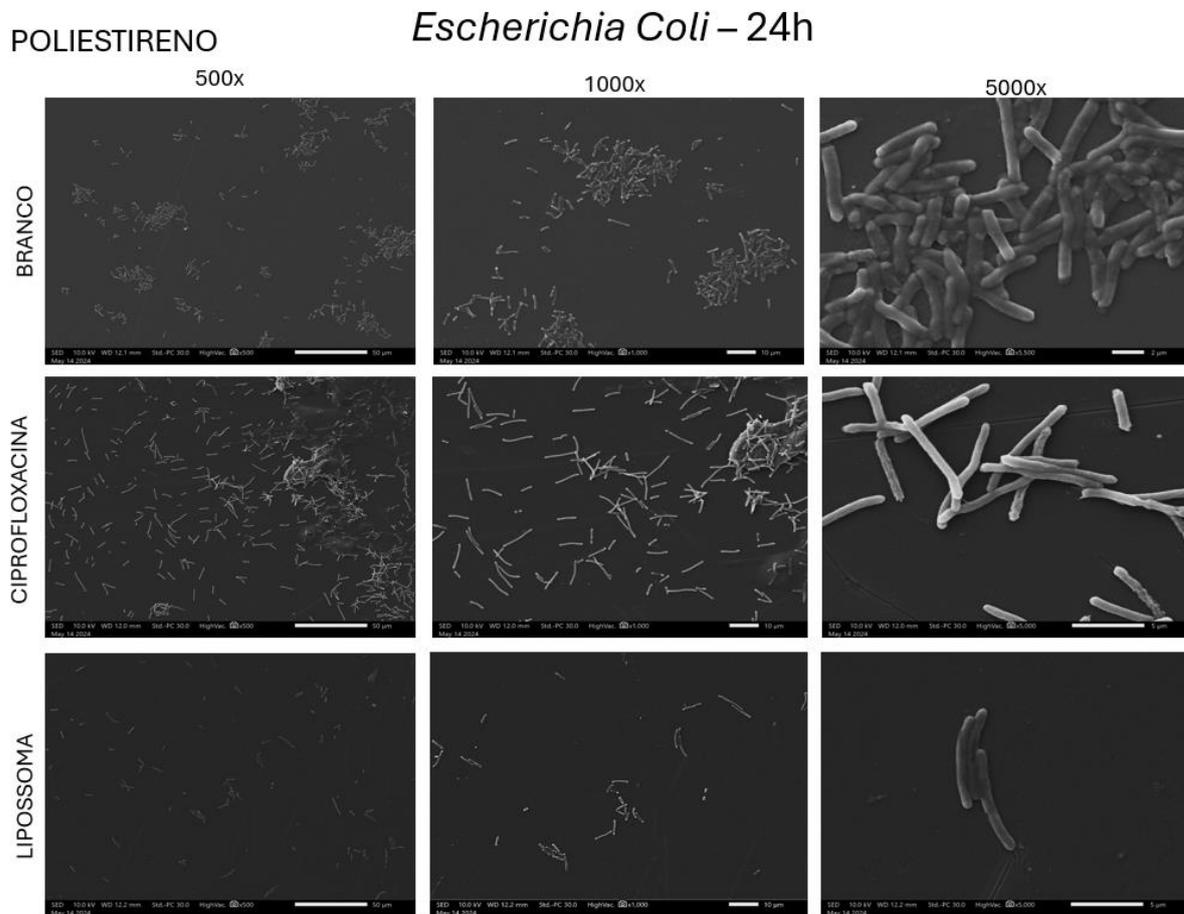
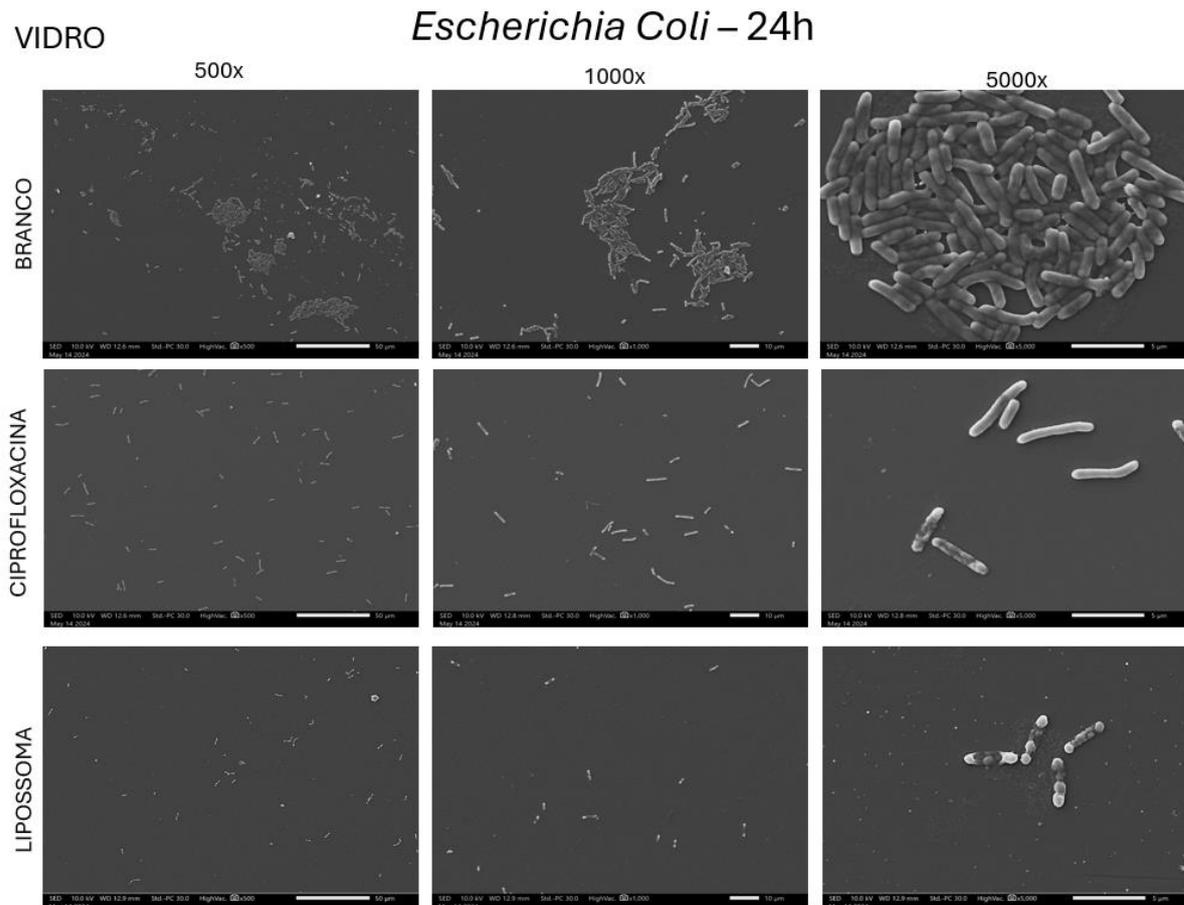
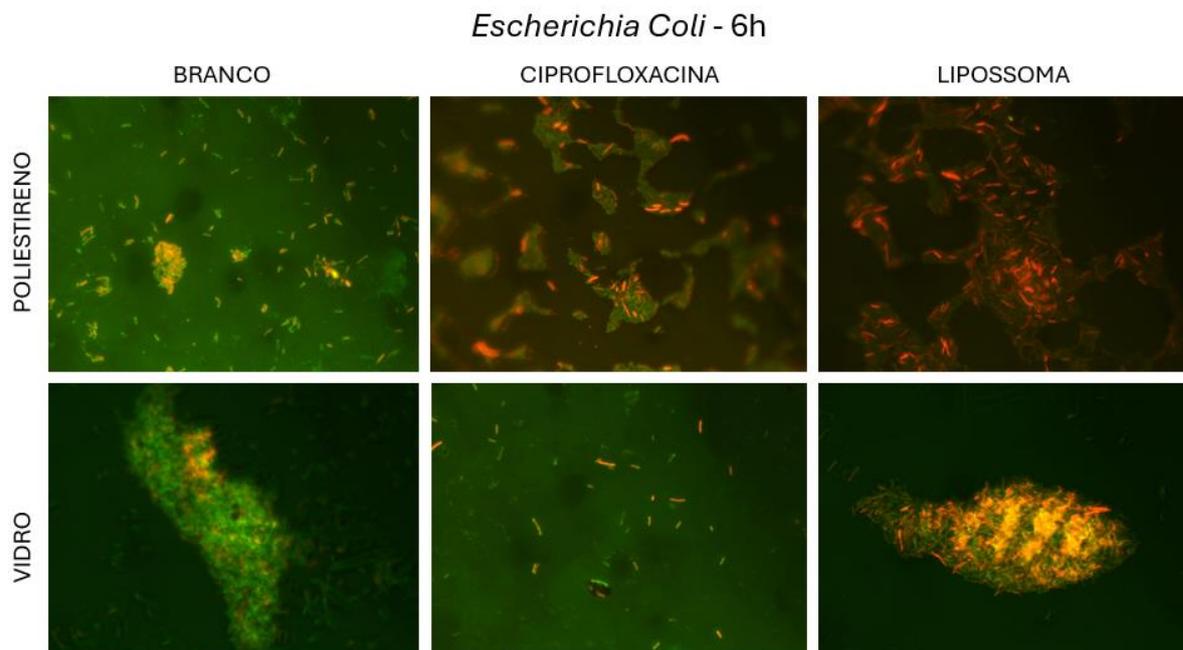


Figura 40 – Microscopia eletrônica de varredura Escherichia coli em vidro.



As imagens de microscopia de fluorescência, Figura 41, complementam as observações, mostrando a viabilidade das células bacterianas. No controle branco, tanto no poliestireno quanto no vidro, há uma predominância de células viáveis (verde), indicando alta atividade bacteriana. Com o tratamento de ciprofloxacina, há uma clara predominância de células mortas (vermelho), para o poliestireno, porém para o vidro a predominância é de uma densidade bacteriana viva. Nos lipossomas, observa-se uma diminuição grande na densidade bacteriana e mesmo com o aglomerado formado no vidro, todo o interior está marcado pela coloração vermelha uma mistura de células viáveis e mortas, indicando que, os lipossomas causam mortalidade celular, e seu efeito é aprimorado comparado a ciprofloxacina.

Figura 41 – Microscopia de fluorescência *Escherichia coli*.

As cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, são patógenos amplamente estudados por possuírem uma alta capacidade de formar biofilmes e serem resistentes a diversos antibióticos e devido a isso são comumente associadas a feridas crônicas. Com esse cenário em mente, os lipossomas encapsulados com ciprofloxacina apresentaram uma solução promissora para o tratamento dessas infecções bacterianas graves e contenção da formação do biofilme, permitindo com que o antibiótico seja entregue diretamente às células bacterianas, e pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de fluorescência foi possível observar que o lipossoma TSLC reduz a densidade bacteriana e a viabilidade celular provando sua propriedade antibiofilme.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos propostos neste estudo foram alcançados com êxito. O preparo dos lipossomas encapsulados com ciprofloxacina foi realizado com sucesso, com taxa de encapsulação de 28,8% do fármaco e tamanho médio de partícula de 315,7nm. A caracterização dos lipossomas confirmou sua biocompatibilidade e ausência de citotoxicidade, além de validar sua fusogenicidade. A atividade antimicrobiana dos lipossomas foi eficaz, inibindo o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas, incluindo a cepa clínica resistente *S. aureus HU25*, com maior eficiência em comparação à ciprofloxacina isolada. Adicionalmente, os lipossomas demonstraram atividade antibiofilme, inibindo a formação de biofilmes por todas as cepas bacterianas avaliadas. As análises microscópicas indicaram que os lipossomas encapsulados com ciprofloxacina se destacaram como agentes eficazes na inibição de biofilmes, promovendo a inibição do crescimento celular e reduzindo significativamente a formação de biofilmes nos substratos analisados.

Dessa forma conclui-se que com os resultados obtidos é possível destacar os lipossomas encapsulados como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções bacterianas e biofilmes em feridas crônicas.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, K. S. et al. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, Taylor and Francis Ltd, 2019.

AJEESHKUMAR, K. K. et al. Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Blackwell Publishing Inc., 2021.

AL-JIPOURI, A. et al. Liposomes or Extracellular Vesicles: A Comprehensive Comparison of Both Lipid Bilayer Vesicles for Pulmonary Drug Delivery. *Polymers*, v. 15, n. 2, p. 318, 2023.

ALMALKI, S. G. Adipose-derived mesenchymal stem cells and wound healing. *Saudi Medical Journal*, v. 43, n. 10, p. 1075–1086, 2022.

ALOTAIBI, G. F. Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *American Journal of Biomedical Science & Research*, v. 12, n. 6, p. 617–626, 2021.

ANDRADE, A. M. et al. Nursing practice in home care: the mediation of care by reflexivity. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 72, n. 4, p. 956–963, 2019.

ANON. Hipoderme: a camada mais profunda da pele. Disponível em: <https://static.biologianet.com/2023/03/epiderme-derme-hipoderme.jpg>. Acesso em 04 jun. 2024.

ARIF, S.; ATTIOGBE, E.; MOULIN, V. J. Granulation tissue myofibroblasts during normal and pathological skin healing: The interaction between their secretome and the microenvironment. *Wound Repair and Regeneration*, v. 29, n. 4, p. 563–572, 2021.

BAZSEFIDPAR, S. et al. Biomolecules for early detection of biofilms through point-of-use devices. *Microchemical Journal*, v. 207, p. 111702, 2024.

BELL, S. A guide to biofilm in veterinary wounds. *The Veterinary Nurse*, v. 15, n. Sup4, p. 1–6, 2024.

BIANCHI, A. et al. Nanoliposomes from Agro-Resources as Promising Delivery Systems for Chondrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3436, 2020.

BLANCO-FERNANDEZ, B. et al. Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 10, n. 5, p. 234–256, 2021.

CAI, W. et al. Dual osmotic controlled release platform for antibiotics to overcome antimicrobial-resistant infections and promote wound healing. *Journal of Controlled Release*, v. 375, p. 627–642, 2024.

CALDWELL, M. D. Bacteria and Antibiotics in Wound Healing. *Surgical Clinics of North America*, v. 100, n. 4, p. 757–776, 2020.

CARTER, M. J. et al. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. *Journal of Medical Economics*, v. 26, n. 1, p. 894–901, 2023.

CHAI, C.; PARK, J. Food liposomes: Structures, components, preparations, and applications. *Food Chemistry*, v. 432, p. 137228, 2024.

CHAVES, F. F. et al. Aplicativos para adolescentes com diabetes mellitus tipo 1: revisão integrativa da literatura. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 30, n. 5, p. 565–572, 2017.

CLARO, L. C. A. et al. Unidade de tratamento de feridas complexas: melhoria da qualidade de vida para os mais idosos. *RIAGE - Revista Ibero-Americana de Gerontologia*, v. 4, 2023.

COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, v. 14, n. 657, 2022.

COQUE, T. M. et al. Antimicrobial Resistance in the Global Health Network: Known Unknowns and Challenges for Efficient Responses in the 21st Century. *Microorganisms*, v. 11, n. 4, p. 1050, 2023.

COSTA, R.; SANTOS, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*, v. 322, p. 402–416, 2017.

CURTIS, A. Biofilms and their significance in veterinary wound management. *The Veterinary Nurse*, v. 11, n. 2, p. 75–81, 2020.

DANTAS, J. S. et al. Qualidade de vida relacionada à saúde de pessoas com feridas crônicas e fatores associados. *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 31, 2022.

DE DECKER, I. et al. Enzymatic debridement: past, present, and future. *Acta Chirurgica Belgica*, v. 122, n. 4, p. 279–295, 2022.

DOS SANTOS, T. L. et al. Terapia por pressão negativa no tratamento de feridas. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, n. 31, p. e1231, 2019.

DURAND, B. A. R. N. et al. Bacterial interactions in the context of chronic wound biofilm: A review. *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1500, 2022.

DYMEK, M.; SIKORA, E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – the current state. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 309, p. 102757, 2022.

ELKHOURY, K. et al. Engineering smart targeting nanovesicles and their combination with hydrogels for controlled drug delivery. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 9, p. 849, 2020.

FALANGA, V. et al. Chronic wounds. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 8, n. 1, p. 50, 2022.

FARAHANI, M.; SHAFIEE, A. Wound healing: From passive to smart dressings. *Advanced Healthcare Materials*, v. 10, n. 16, 2021.

FATIMA, H. et al. Fabrication and characterization of cellulose acetate-EUSOL/polyvinyl alcohol-curcumin electro spun wound dressing for diabetic foot ulcer. *Advances in Traditional Medicine*, v. 24, n. 3, p. 777–788, 2024.

GAJULA, B.; MUNNAMGI, S.; BASU, S. How bacterial biofilms affect chronic wound healing: A narrative review. *International Journal of Surgery: Global Health*, v. 3, n. 2, p. e16–e16, 2020.

D'SOUZA, G. G. M. *Liposomes - Methods and Protocols*. 2. ed. Boston, MA, USA: Methods in Molecular Biology, 2017.

GONZALEZ GOMEZ, A.; HOSSEINIDOUST, Z. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery. *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 5, p. 896–908, 2020.

GOTTFRIED, I.; SCHOTTLENDER, N.; ASHERY, U. Hyperbaric oxygen treatment—From mechanisms to cognitive improvement. *Biomolecules*, v. 11, n. 10, p. 1520, 2021.

GRAVES, N.; PHILLIPS, C. J.; HARDING, K. A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. *British Journal of Dermatology*, v. 187, n. 2, p. 141–148, 2022.

GÜVEN, E. Nanotechnology-based drug delivery systems in orthopedics. *Joint Diseases and Related Surgery*, v. 32, n. 1, p. 267–273, 2021.

HE, H. et al. Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 9, n. 1, p. 36–48, 2019.

HOU, L. et al. Targeted inhibition of autophagy in hepatic stellate cells by hydroxychloroquine: An effective therapeutic approach for the treatment of liver fibrosis. *Liver International*, v. 44, n. 8, p. 1937–1951, 2024.

HU, P. et al. Association of healthy lifestyles on the risk of hypertension, type 2 diabetes mellitus, and their comorbidity among subjects with dyslipidemia. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 2022.

IBNE SHOUKANI, H. et al. Ciprofloxacin loaded PEG coated ZnO nanoparticles with enhanced antibacterial and wound healing effects. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 4689, 2024.

CHUGUNOVA, I. Bactérias gram-positivas e gram-negativas. [S.l.: s.n.]. Disponível em: https://media.istockphoto.com/id/1214639783/pt/vetorial/gram-positive-and-gram-negative-bacteria.jpg?s=2048x2048&w=is&k=20&c=18y_YzaXapkOiFJPr7G32O8K8RYxJNQKH5Lycx99560=. Acesso em 10 mar. 2024.

JALALI, E. et al. Fixation of nanoparticles on fabric: Applications in general health management. *Materials Today Communications*, v. 41, p. 110577, 2024.

JONIDI SHARIATZADEH, F. et al. Enhancing wound healing and minimizing scarring: A comprehensive review of nanofiber technology in wound dressings. *Progress in Materials Science*, v. 147, p. 101350, 2025.

KARPUZ, M. et al. 99mTc-Labeled, Colistin Encapsulated, Theranostic Liposomes for *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *AAPS PharmSciTech*, v. 24, n. 3, p. 77, 2023.

KIM, H.; HYUN, M. R.; KIM, S. W. The effect of adipose-derived stem cells on wound healing: Comparison of methods of application. *Stem Cells International*, v. 2019, p. 1–8, 2019.

LEE, H.-J.; KIM, M. Skin barrier function and the microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 13071, 2022.

LUCENA, B. J. D. DE et al. Resistência bacteriana associada às feridas crônicas em pacientes adultos. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 5, p. e22012541688, 2023.

MA, Z. et al. A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 9, n. 1, p. 237, 2024.

MAKHLOUF, Z.; ALI, A. A.; AL-SAYAH, M. H. Liposomes-based drug delivery systems of anti-biofilm agents to combat bacterial biofilm formation. *Antibiotics*, v. 12, n. 5, p. 875, 2023.

MEGRAN, D. et al. One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. *Molecular Microbiology*, v. 113, n. 3, p. 659–671, 2020.

MORQUETTE, A. E. B. et al. The antibacterial and wound healing properties of natural products: A review on plant species with therapeutic potential against *Staphylococcus aureus* wound infections. *Plants*, v. 12, n. 11, p. 2147, 2023.

NEVES, K. J. DA S. et al. Sistemas de entrega de drogas baseados em nanotecnologia: nanopartículas poliméricas para tratamento de câncer / Nanotechnology-based drug delivery systems: review of recent nanodrug development for cancer treatment. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 4, p. 24770–24787, 2022.

NEVES, M. T. et al. Uso da tecnologia de lipossomas no encapsulamento de compostos bioativos - Revisão. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 7, n. 4, 2021.

NQAKALA, Z. B. et al. Advances in nanotechnology towards development of silver nanoparticle-based wound-healing agents. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 20, p. 11272, 2021.

NSAIRAT, H. et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, v. 8, n. 5, p. e09394, 2022.

NTENTAKIS, D. P. et al. Dissolved oxygen technologies as a novel strategy for non-healing wounds: A critical review. *Wound Repair and Regeneration*, v. 29, n. 6, p. 1062–1079, 2021.

NUSSBAUM, S. R. et al. An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value in Health*, v. 21, n. 1, p. 27–32, 2018.

PARTOAZAR, A.; KIANVASH, N.; GOUDARZI, R. New concepts in wound targeting through liposome-based nanocarriers (LBNs). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 77, p. 103878, 2022.

PASIEKA, Alfred. Drug Delivery Liposome. Disponível em: <https://images.fineartamerica.com/images-medium-large-5/drug-delivery-liposome-alfred-pasieka.jpg>. Acesso em 19 mar. 2024.

PEÑA, O. A.; MARTIN, P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024.

PEREIRA, A. VAN L. A. et al. Liposomes as drug delivery: A review of innovations in disease treatment and tumor therapy. Em: *Connections Exploring Interdisciplinarity in Health*. Seven Editora, 2024.

RODRIGUES, L. DE O. et al. Eficiência das nanopartículas poliméricas no controle de bactérias resistentes aos antimicrobianos: uma revisão. Em: *Estudos e Escrita Científica Multidisciplinar em Ciências da Saúde*. Editora Científica Digital, 2024. p. 73–90.

SALDANHA, O.; SCHILLER, L.; HAUSER, K. Calcium-induced compaction and clustering of vesicles tracked with molecular resolution. *Biophysical Journal*, v. 122, n. 13, p. 2646–2654, 2023.

SANTOS, K. T. DE A. et al. Liposomes techniques of aerosolization for the treatment of obstructive, restrictive and infectious pulmonary diseases: a review. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 1, p. e16912136950, 2023.

SBACV. Brasil bate recorde de amputações de pés e pernas em decorrência do diabetes. *Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vasculiar*, 2023. Disponível em: <https://sbacv.org.br/brasil-bate-recorde-de-amputacoes-de-pes-e-pernas-em-decorrencia-do-diabetes/>. Acesso em: 12 de out. 2024.

SCHMID, Y. R. F. et al. Calcium-mediated liposome fusion to engineer giant lipid vesicles with cytosolic proteins and reconstituted mammalian proteins. *Advanced Biosystems*, v. 4, n. 11, 2020.

SEN, C. K. Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. *Advances in Wound Care*, v. 8, n. 2, p. 39–48, 2019.

SEN, C. K. et al. Biofilm management in wound care. *Plastic & Reconstructive Surgery*, v. 148, n. 2, p. 275e–288e, 2021.

SEN, C. K. Human wound and its burden: updated 2022 compendium of estimates. *Advances in Wound Care*, v. 12, n. 12, p. 657–670, 2023.

SHARIATI, A. et al. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Frontiers in Public Health*, v. 10, 2022.

SHI, N.-Q.; QI, X.-R. Preparation of drug liposomes by reverse-phase evaporation. Em: *Liposome-Based Drug Delivery Systems*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. p. 1–10.

SILVA, N. C. DA et al. Morfofisiologia da pele e o processo de envelhecimento cutâneo. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 24, n. 4, p. e16051, 2024.

SILVA, R. A. DA et al. Resistência a antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. *Saúde em Debate*, v. 44, n. 126, p. 607–623, 2020.

SOBRINHO, M. R. et al. Feridas crônicas e cuidados paliativos: novas possibilidades e estratégias em saúde. *Caderno Pedagógico*, v. 21, n. 3, p. e3431, 2024.

STANCHEVA, R. et al. Ciprofloxacin-loaded mixed polymeric micelles as antibiofilm agents. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 4, p. 1147, 2023.

THAARUP, I. C. et al. Biofilm survival strategies in chronic wounds. *Microorganisms*, v. 10, n. 4, p. 775, 2022.

THOMAS, D. C. et al. The role of debridement in wound bed preparation in chronic wound: a narrative review. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 71, p. 102876, 2021.

THOMPSON RIVERS UNIVERSITY. TRU Human Anatomy & Physiology I. Disponível em: <https://human-anatomy-i.pressbooks.tru.ca/wp-content/uploads/sites/189/2024/05/image1-5.png>. Acesso em: 12 out. 2024.

TRIPATHI, N.; SAPRA, A. Gram Staining. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965827/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

VALENCIA, D. Y. et al. Infection-associated biofilms and statins: protocol for systematic review. *BMJ Open*, v. 11, n. 5, p. e046290, 2021.

VANEGAS, J. M. et al. Post-antibiotic era in hemodialysis? Two case reports of simultaneous colonization and bacteremia by multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 43, n. 4, p. 597–602, 2021.

VIEIRA, C. P. DE B.; ARAÚJO, T. M. E. DE. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 52, 2018.

WAHEED, I. et al. Lipid-based nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, v. 14, 2024.

WANG, M. et al. Identification of the wound healing activity peptidome of edible bird's nest protein hydrolysate and the in silico evaluation of its transport and absorption potential in skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 72, n. 22, p. 12529–12540, 2024.

WANG, W. et al. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 17, n. 1, p. 82, 2019a.

WANG, X. et al. The effect of honokiol on pulmonary artery endothelium cell autophagy mediated by cyclophilin A in hypoxic pulmonary arterial hypertension. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 139, n. 3, p. 158–165, 2019b.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, v. 10, n. 9, 2020.

YI, L. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Streptococcus suis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 20, p. 8649–8660, 2020.

ZHANG, H. et al. ZnO-incorporated chitin hydrogels for infected wound therapy. *Cellulose*, v. 31, n. 5, p. 3115–3127, 2024.

ZHU, J.; QUAN, H. Adipose-derived stem cells-derived exosomes facilitate cutaneous wound healing by delivering XIST and restoring discoidin domain receptor 2. *Cytokine*, v. 158, p. 155981, 2022