



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Ana Sofia Fernandes Fragoso

**NANOSIZED DELIVERY SYSTEMS FOR  
FLUOROQUINOLONES: A REVIEW AND PRACTICAL CASE  
OF FORMULATION AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT  
BACTERIA**

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanosized Delivery Systems for Fluoroquinolones: a review and practical case of formulation against multidrug-resistant bacteria.” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Eng. Ricardo Grilo, da Dra. Rita Gomes e do Professor Doutor António José Ribeiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade De Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Ana Sofia Fernandes Fragoso

**NANOSIZED DELIVERY SYSTEMS FOR  
FLUOROQUINOLONES: A REVIEW AND PRACTICAL CASE  
FORMULATION IN THE SETTING OF MULTIDRUG-  
RESISTANT BACTERIA**

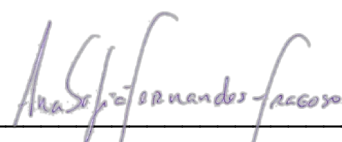
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Nanosized delivery systems for fluoroquinolones: a review and practical case formulation in the setting of multidrug-resistant bacteria.*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Eng. Ricardo Grilo, da Dra. Rita Gomes e do Professor Doutor António José Ribeiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade De Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Eu, Ana Sofia Fernandes Fragoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012138688, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Nanosized delivery systems for fluoroquinolones: a review and practical case formulation in the setting of multidrug-resistant bacteria” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 3 de Setembro de 2019.

A handwritten signature in blue ink that reads "Ana Sofia Fernandes Fragoso". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath it.

(Ana Sofia Fernandes Fragoso)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio, carinho e amor.

Ao Diogo, pela disponibilidade, paciência, apoio, amor e cumplicidade.

Às amizades construídas durante o período de faculdade e estágio, por terem tornado este  
percurso único.

Aos amigos de sempre, por estarem presentes nos bons e nos maus momentos.

A todas as pessoas extraordinárias que conheci durante os meus estágios, por tudo o que  
me ensinaram.

## **Resumo**

A resistência bacteriana apresenta-se nos dias de hoje como uma ameaça constante, com impacto não só ao nível da saúde da comunidade global como também na economia dos países. A ineficácia das quinolonas apresenta especial importância, uma vez que esta classe de antibióticos ocupa um lugar de destaque constituindo uma escolha comum de antibiotrapia.

Com este trabalho pretende-se sistematizar os melhores métodos de produção, com vista à obtenção de características físico-químicas otimizadas para produção de formulações eficazes na erradicação de resistências. Estes novos sistemas de administração de fármacos minimizam os efeitos de bombas de efluxo, a formação de biofilmes, tendo ainda a capacidade de ultrapassar diversos problemas de farmacocinética.

Para alcançar esse compromisso, foi realizada uma revisão sistemática da literatura para entender os principais usos das nanopartículas no cenário de resistência a antibióticos, bem como a integração e interpretação de uma série de dados provenientes de experiências realizadas na Universidade de Coimbra, validando as informações descritas na literatura.

Existem inúmeras classes de nanopartículas e optamos por abordar nanopartículas lipídicas, poliméricas e inorgânicas neste artigo devido à sua aplicação no contexto de resistências a antibióticos.

Entre os processos de produção de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), a técnica de microemulsão apresentou os melhores tamanhos de partículas e ainda taxas de encapsulação mais eficientes. Quanto à produção de transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC), o processo com o melhor tamanho de partícula foi a Homogeneização a Alta Pressão (HPH). Em relação às partículas poliméricas, as técnicas destacadas foram dessolvatação, coacervação e gelificação iónica. Os usos previstos de diferentes tipos de partículas nos respectivos contextos clínicos são discutidos em detalhes neste trabalho, considerando as diferenças nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

**Palavras-chave:** Quinolonas, Nanopartículas Lipídicas, Nanopartículas poliméricas, Nanopartículas Inorgânicas, Resistência Bacteriana, Antibioterapia.

## **Abstract**

The antibiotic resistance is a global threat to world's public health, encompassing several challenges to human health as well as a huge economic burden. The unmet aimed efficiency of quinolones retains crucial interest and relevance since they are a common choice in antibiotherapy.

This work aims to review the several nanoparticle production processes, in order to obtain delivery systems able to surpass bacteria's widespread resistance. These new delivery systems minimize the efflux pump effects, the formation of biofilms and have the capacity of overcome pharmacokinetic issues. To achieve such commitment a critical analysis of literature was performed to understand the main usages of nanoparticles in antibiotic resistance setting, as well as a series of experiments performed in the University of Coimbra to validate whenever possible the information described by literature.

Among numerous classes of nanoparticles, we have chosen to address lipid, polymeric and inorganic nanoparticles due to its appliance in the context of antibiotic resistances.

Among production processes for Solid Lipid Nanoparticles (SLN), the microemulsion technique presented the best particle size and the most efficient encapsulation rate. As for the production of Nanostructured Lipid Carriers (NLC), the process with the best particle size was High Pressure Homogenization (HPH). Regarding polymeric particles, the highlighted techniques were desolvation, coacervation, and ionic gelation. The foreseen usages of different types of particles in the respective clinical settings are discussed in detail in this work, namely comprising the differences in pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

**Keywords:** Quinolones, Lipid nanoparticles, Polymeric Nanoparticles, Inorganic Nanoparticles, Antibiotic Resistance, Antibiotherapy.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI

### **Parte I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

INTRODUÇÃO.....	1
PONTOS FORTES .....	3
PONTOS FRACOS.....	5
OPORTUNIDADES.....	5
AMEAÇAS .....	6
CONCLUSÃO.....	7
BIBLIOGRAFIA.....	XII

### **Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

INTRODUÇÃO.....	8
PONTOS FORTES .....	9
PONTOS FRACOS.....	10
OPORTUNIDADES.....	11
AMEAÇAS .....	12
CONCLUSÃO.....	15
BIBLIOGRAFIA.....	XIII
ANEXO I - CASO CLÍNICO .....	XIV

### **Parte III - Nanosized delivery systems for fluoroquinolones: a review and practical case formulation in the setting of multidrug-resistant bacteria**

INTRODUCTION.....	15
MATERIALS AND METHODS .....	17
QUINOLONE ANTIBIOTICS .....	18
HISTORICAL REVIEW AND ACTION MECHANISM.....	18
RESISTANCE ACQUISITION .....	18
Gene .....	19
Efflux pumps .....	19
Biofilm Production .....	19
QUINOLONES USES .....	20
ADVANTAGES OF COLLOIDAL SYSTEMS .....	21
TYPES OF COLLOIDAL SYSTEMS .....	22

<b>LIPID PARTICLES: SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS.....</b>	<b>22</b>
PRODUCTION METHODOLOGY.....	22
PARTICLE CHARACTERIZATION: PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES.....	24
<b>POLYMERIC PARTICLES.....</b>	<b>29</b>
PRODUCTION METHODOLOGY.....	29
<i>Hydrophobic polymers production methodology:</i> .....	29
<i>Hydro-soluble polymers production methods:</i> .....	30
PARTICLE CHARACTERIZATION: PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION.....	30
<b>INORGANIC PARTICLES.....</b>	<b>33</b>
PARTICLE CHARACTERIZATION: PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION.....	33
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>34</b>
COMPARATIVE PERFORMANCE OF PRODUCTION METHODS AND THEIR IMPACT IN PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES.....	34
PERFORMANCE OUTCOMES OF DIFFERENT FORMULATION AND PRODUCTION TECHNIQUES OF LIPID NANOPARTICLES.....	36
FORMULATION AND PRODUCTION VARIABLES' IMPACT ON POLYMERIC NANOPARTICLE PERFORMANCE.....	37
PHARMACOKINETIC ADVANTAGES OF NANOPARTICLES.....	38
COMPARATIVE PERFORMANCE OF NANOPARTICLES.....	40
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAPHY.....</b>	<b>XV</b>
<b>ANEXO II - SUPLEMENTO À TABELA II.....</b>	<b>XXI</b>



## Lista de Abreviaturas

### **Abreviaturas – Parte I e Parte II**

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

FSO2 - Formas Sólidas Orais 2

FLP - Formas Líquidas e Pastosas

INJ - Formas injectáveis

GMP's - Good manufacturing practices

ICH - International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

GQ - Garantia de Qualidade

CIS - *Commonwealth of Independent States*

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*

DCI – Denominação Comum Internacional

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

USF – Unidade de Saúde Familiar

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

CHLC - Centro Hospitalar Lisboa Central

IMC – Índice de Massa Corporal

### **Abreviaturas – Parte III**

MRSA - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

*E. coli* - *Escherichia coli*

*P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*

*N. gonorrhoeae* - *Neisseria gonorrhoeae*

*S. pneumoniae* - *Streptococcus pneumoniae*

*H. influenza* - *Haemophilus influenzae*

SLN - Solid Lipid Nanoparticles

NLC - Nanostructured Lipid Carriers

HPH - High Pressure Homogenization

DNA - Deoxyribonucleic Acid

QRDR - Quinolone Resistance Determining Region

gyrA - DNA gyrase (type II topoisomerase), subunit A  
gyrB - DNA gyrase, subunit B  
parC - DNA topoisomerase IV, subunit A  
EPS - Extracellular Polymeric Substance  
o/w - oil/water  
DDAB - Didodecyldimethylammonium Bromide  
SI - Solvent injection  
NA - Not Applicable  
TPP - Tripolyphosphate  
PEMA - Poly (ethylene-alt-maleic anhydride)  
AuNPs - Gold Nanoparticles  
ZnO NPs – Zinc Oxid nanoparticles  
MIC - Minimal Inhibitory Concentration  
PLGA - (Poly(d,l-lactide coglycolide)  
PCL - Policaprolactona  
F - Bioavailability  
EE - Entrapment Efficiency  
UC – University of Coimbra

## Lista de Figuras

**Figure 1** - Absorption spectrum of Ciprofloxacin used to achieve EE value on UC's laboratory.

**Figure 2** - Absorption spectrum of Levofloxacin used to achieve EE value UC's laboratory.

## Lista de tabelas

Tabela I – Análise SWOT – Estágio nos Laboratórios Atral

Tabela II – Análise SWOT – Estágio na Farmácia Mouraria

Table III – Production methods of SLN and its physical and chemical characterization

Table IV – Production methods of NLC and its physical and chemical characterization

Table V – Main production methods of polymeric particles and respective characterization results.

Table VI – Physical and chemical properties of inorganic particles

Table VII – Advantages and disadvantages of the various methods to produce lipid nanoparticles.

Table VIII – Advantages and disadvantages of various methods of production of polymeric nanoparticles

Table IX – Pharmacokinetic properties analysis on different nanoparticle classes. Adapted from (Choi e Han, 2018)(Lin, Monteiro-Riviere e Riviere, 2015)

**Parte I – Relatório de Estágio em  
Indústria Farmacêutica  
Laboratórios Atral**

## Introdução

Ao longo dos anos tem-se verificado uma contínua evolução e especialização no setor da indústria farmacêutica. A dinâmica de inovação e melhoria que ocorre nesta área encontra-se alicerçada na capacidade de intervenção do farmacêutico enquanto especialista do medicamento. Sabemos hoje que uma das grandes revoluções no setor da saúde surgiu no período após a segunda guerra mundial, com a descoberta de antibióticos. Paralelamente à descoberta destes fármacos com tanto potencial, tem surgido uma linha de investigação mais atual, cada vez mais direcionada para o combate de organismos multirresistentes.

Associado ao estágio em Farmácia Comunitária, tive a oportunidade única de realizar um estágio integrado no MICEF, nos laboratórios Atral, a convite do Engenheiro Ricardo Grilo, diretor fabril. Os laboratórios Atral constituem um grupo farmacêutico especializado na produção de medicamentos, pioneiro na produção de antibióticos, tanto a nível nacional como a nível internacional. A empresa iniciou-se como “Farmácia Atral” no ano de 1947, em Alcântara. Em 1965 surgiu o “Grupo Atral Cipan”, cuja associação se deveu à necessidade de fabrico das próprias matérias-primas do Atral. Esta parceria terminou em 2016, quando o Atral foi adquirido por um grupo peruano Medifarma, passando a coexistir os “Laboratórios Atral, S.A.” e a “Cipan” como duas empresas independentes [1].

Os Laboratórios Atral incluem uma unidade de produção de penicilinas e outra de cefalosporinas, mutuamente segregadas de modo a prevenir contaminações cruzadas. Em cada uma destas unidades são produzidas várias formas farmacêuticas podendo ser distinguidos os seguintes setores de produção: FSO2 com produção de saquetas, capsulas, comprimidos; FLP com produção de xaropes, cremes, nebulizadores, supositórios e gotas; INJ com enchimento asséptico de pó. A produção em cada um destes setores exige muitas vezes condições especiais de temperatura e humidade, com necessidade de controlo regular destes parâmetros e de muitos outros parâmetros críticos no processo de obtenção de um medicamento.

De modo a acompanhar o crescente volume de vendas de fármacos penicílios, em particular de fármacos do setor FSO2, surgiu a necessidade de construir uma Nova Unidade Industrial Farmacêutica (FSO2 Expansão), como extensão da Unidade de Penicilinas existente.

O meu estágio surge no contexto de construção desta nova unidade farmacêutica, tendo integrado o departamento de garantia de qualidade.

De modo a garantir qualidade, segurança e efetividade, o laboratório Atral cumpre um conjunto de GMP's estabelecidas pela *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Tendo em vista o cumprimento dessas

GMP's, o departamento de Garantia de Qualidade intervém na integração de novos equipamentos de produção e monitorização na nova unidade fabril, intervindo na qualificação de instalação de equipamentos e salas, operação e performance, bem como na validação de processos.

O presente relatório reporta-se à análise SWOT do meu estágio na área da Garantia de Qualidade do laboratório Atral. Esta ferramenta é muito utilizada por empresas, devido à facilidade de execução e à capacidade de retratar diagnósticos gerais. A análise baseia-se na identificação dos pontos fortes e fracos, que constituem os fatores internos, e das oportunidade e ameaças, que compõem os fatores externos. Com base no diagnóstico feito, é possível gerar estratégias de adaptação, planos estratégicos de gestão de risco e de aproveitamento de oportunidades (2). Ao longo desta análise vou avaliar não só a minha posição enquanto estagiária, como terei também em consideração algumas particularidades do sector.

Tabela I – Análise SWOT – Estágio nos Laboratórios Atral

<u>Análise SWOT</u>	
<u>Pontos fortes</u>	<u>Pontos fracos</u>
*Acompanhamento da construção de uma nova unidade fabril; *Diversidade de tarefas efetuadas *Relações interpessoais *Boas práticas de fabrico e orientações da ICH *Importância do trabalho na área da Qualidade	*Estágio de curta duração
<u>Oportunidades</u>	<u>Ameaças</u>
*Estrutura e funcionamento do grupo Medinfar *Contacto com empresas fornecedoras de equipamentos e laboratórios de qualificação	*Falta de formação na língua alemã e chinesa *Vistoria do INFARMED

## Pontos fortes

### Acompanhamento da construção da nova unidade fabril

Durante o meu estágio tive a oportunidade de assistir à evolução da construção da nova unidade fabril pensada para aumentar o volume de produção de formas sólidas orais penicilínicas. Este trabalho permitiu-me operacionalizar os conhecimentos teóricos a que fui recorrendo em diversas unidades curriculares ao longo do MICF. Participei ativamente e de forma independente na qualificação (de instalação, operação, performance) de equipamentos como máquinas de compressão, máquinas agrupadoras, misturadoras, máquinas de revestimento, blisteradoras e manómetros. Para além de protocolos, produzi também várias instruções técnicas (de limpeza, utilização).

### Diversidade de tarefas efetuadas

Durante o tempo que estive no laboratório Atral, tive oportunidade de perceber a complexidade e diversidade de tarefas realizadas nos diversos departamentos. Constatei que o mestrado integrado em ciências farmacêuticas está estruturado de modo a fornecer ferramentas diversas promovendo a capacidade de resposta dos alunos perante vários desafios. Deste modo, durante o meu estágio, acabei por usar conhecimentos de áreas como química (controlo de qualidade de substâncias), tecnologia farmacêutica (com o ajuste de



parâmetros na qualificação dos equipamentos), compras e vendas (com agilização da logística de compras de artigos com vista à integração na nova fábrica).

### Relações interpessoais

A minha integração na equipa de garantia de qualidade foi muito facilitada por todos os profissionais que integram o setor. A adaptação à nova dinâmica de trabalho acabou por ser muito rápida e eficiente graças à interajuda registada entre todos os profissionais da empresa. O contacto direto com pessoal dos restantes setores (controlo de qualidade, manutenção, desenvolvimento galénico, direção fabril) permitiu-me desenvolver competências técnicas e relacionais novas. Penso que todo este crescimento, técnico, científico e profissional permitir-me-á integrar diversas áreas de trabalho num futuro próximo, enquanto farmacêutica.

Deixo um agradecimento especial ao Eng. Ricardo Grilo e ao Dr. David Santos que me acompanharam durante todo este percurso.

### Boas práticas de fabrico e orientações da ICH

As boas práticas de fabrico incluem todas as operações desde a receção de material, produção, embalagem, re-embalamento, controlo de qualidade, libertação, armazenamento e distribuição do produto. No caso específico do meu estágio no departamento de GQ em contexto de criação de nova unidade fabril, o cumprimento de GMP assegura que as instalações e os equipamentos apresentam o desempenho desejado e cumprem com toda a regulamentação aplicável. Para o efeito, são elaborados planos e protocolos diversos assim como registos e relatórios no momento da instalação dos equipamentos. Todo este processo permite acreditar o laboratório, assegurando que todos os parâmetros e exigências da entidade reguladora são cumpridos.

O laboratório Atral segue as orientações sugeridas pela International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) que resultou de um entendimento entre organizações de regulamento autoritário e indústrias farmacêuticas de diversos países da Europa, EUA e Japão, acerca de aspetos técnicos e científicos de medicamentos (3). Um dos pontos focados na guideline é relativo ao controlo e previsão de potenciais problemas de qualidade durante o desenvolvimento e produção, permitindo uma gestão e capacidade de decisão melhoradas no momento do surgimento do problema (4). Uma das avaliações feitas é a Avaliação Criticidade Equipamentos. Nesta avaliação é investigada a severidade de cada consequência, a probabilidade de ocorrência, a detetabilidade, estabelecendo as especificações do processo e produto. Esta avaliação permite

identificação de pontos críticos que beneficiariam de ações preventivas de minimização de risco.

### Importância do trabalho na área da Qualidade

Ao longo deste percurso, tive oportunidade de constatar a importância que representa a área da qualidade no funcionamento de uma empresa como o laboratório Atral. O impacto deste setor começa numa fase tão precoce como a da montagem e qualificação de uma nova fábrica, garantindo que os todos os requisitos necessários e exigidos por entidades reguladoras externas (INFARMED) são cumpridos. Segue-se a qualificação dos operadores, a qualificação do ambiente de produção, o controlo das matérias primas, dos produtos finais na cadeia de pontos assegurada pela área da qualidade (garantia e controlo). Mais do que assegurar qualidade, segurança e efetividade, este departamento constitui uma ferramenta crucial para garantir a confiança e satisfação do consumidor final, constituindo um pilar primário na estrutura de toda a empresa.

## Pontos fracos

### Estágio de curta duração

Apesar da integração na dinâmica de trabalho ser rápida, o tempo de formação estende-se durante um período considerável, uma vez que os processos internos para gerar documentação são extensos e lentos. A dinâmica de instalação de equipamentos novos está dependente da rapidez de avanço da construção efetiva da fábrica, assim como da disponibilidade das empresas que fornecem os equipamentos para viajar até Portugal e dar início a uma fase primária de qualificação conjunta do equipamento. Por estes motivos, penso que teria beneficiado da extensão do período de estágio. Neste caso específico o término do estágio coincidiu com o início da produção efetiva, não tendo assistido à dinâmica pós construção e instalação da nova fábrica.

## Oportunidades

### Estrutura e funcionamento do grupo Medinfar

Após ser adquirida pelo grupo peruano Medinfar em 2016, o laboratório Atral teve oportunidade de expandir e consolidar a sua posição internacional. Acabou por se estabelecer como principal companhia exportadora do setor farmacêutico (exportando para a Europa,

África, países CIS (ex-URSS), Ásia, Médio Oriente, América do Norte e América do Sul), paralelamente à prestação de serviços e vendas de produtos que continuam a ser produzidos em Portugal. Entrar no laboratório Atral permitiu-me conhecer o modo de funcionamento do grupo, assim como as ligações existentes com o grupo.

#### Contacto com empresas fornecedoras de equipamentos e laboratórios de qualificação

O contacto com empresas e profissionais fornecedores de equipamentos diversos para instalação na nova unidade fabril constituiu, para mim, uma oportunidade ímpar de me relacionar com outras empresas da área farmacêutica. Acolhi essa oportunidade de perceber a perspetiva mecânica ligada ao mercado farmacêutico, participando ativamente na instalação, verificação de equipamentos fornecidos por empresas como a SMA Pharmatech, QuaLia ou a Clean Tech. Relativamente à questão da qualificação da unidade fabril, um dos contactos que estabeleci ao longo do estágio e que permitiu a integração de informação externa, foi com a TradeLabor. Este contacto permitiu-me perceber todos os fatores considerados por uma indústria no momento de qualificar salas limpas.

## Ameaças

#### Falta de formação na língua alemã e chinesa

Durante o meu estágio, mais especificamente durante o contacto com empresas distribuidoras de equipamentos (caso da SMA Pharmatech), senti algumas barreiras de comunicação (especialmente no contacto com grupos chineses), que penso que poderia ter sido ultrapassada com algum conhecimento das línguas principais faladas nos países onde estão estabelecidas a maioria dessas empresas. Verifiquei inclusive que essa é uma vantagem de alguns trabalhadores do grupo.

#### Vistoria do INFARMED

Durante o período de estágio os laboratórios Atral foram alvo de uma vistoria por parte do INFARMED. Durante este período a disponibilidade geral e capacidade de prestação de apoio aos estagiários ficou limitada, tendo sido importante o estabelecimento de uma atitude proactiva e independente na realização de tarefas por parte do estagiário.

## Conclusão

A qualificação e operacionalização de toda uma unidade de fábrica nova constitui um processo moroso, complexo. Existem vários fatores importantes no desenrolar deste processo, como é o caso dos materiais utilizados na construção da nova fábrica, a o estabelecimento de uma logística de trabalho e um *workflow* apropriado, a criação sistemas de controlo ambiental apropriados e de acordo com as exigências das autoridades reguladoras, a necessidade de qualificar, a instalação, operação, *performance* dos equipamentos, formar operadores.

Com o término deste estágio curricular levo, acima de tudo, uma visão mais clara do papel do farmacêutico ao nível da indústria. Faço-me acompanhar de novas ferramentas e uma visão mais ampla que poderá eventualmente ser-me útil num futuro próximo.

Ao longo deste período tive oportunidade de perceber quais as vantagens que os conhecimentos que transporto podem trazer para o setor, mas também das limitações que tenho e que devo ultrapassar no sentido de progredir e tornar-me mais competitiva e qualificada. Percebi que a necessidade de atualização constante, de criação de novas ferramentas de trabalho podem ser cruciais para melhorar a dinâmica do indivíduo enquanto especialista do medicamento, assim como para melhorar a dinâmica interna das empresas.

Relativamente à capacidade de trabalho em equipa, reconheço que esta é uma característica importantíssima, sendo mesmo um requisito colocado à integração de determinado setor. Essa capacidade permite não só melhorar a logística de trabalho como possibilita otimizar processos e recursos, tornando a equipa mais competitiva.

Por fim, agradeço a todos os elementos do laboratório Atral com quem trabalhei, uma vez que possibilitaram a passagem de um conjunto de ferramentas cruciais e indispensáveis ao meu futuro enquanto farmacêutica.

## Bibliografia

- [1] – J. Leite, (2018 Março). “Laboratórios ATRAL”. [Online]. Disponível em <http://restosdecolecao.blogspot.com/2015/07/laboratorios-atral.html>
- (2) – TechTarget – SWOT analysis – [acedido a 20 de março de 2019]. Disponível na Internet: <https://searchcio.techtarget.com/definition/SWOT-analysis-strengths-weaknesses-opportunities-and-threats-analysis>
- (3) ICH – Harmonised tripartite guideline quality risk management – [acedido a 25 de março de 2019]. Disponível na Internet: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf)
- (4) ICH – History – [acedido a 26 de Março de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ich.org/about/history.html>

**Parte II – Relatório de Estágio em  
Farmácia Comunitária  
Farmácia da Mouraria**

## Introdução

Desde há muito tempo que se reconhece a importância do papel desempenhado pelas farmácias junto das comunidades. Estas constituem muito mais do que um local de venda de medicamentos, representando um ponto essencial de recolha de informação complementar à fornecida pelos restantes profissionais de saúde. Neste espaço são integrados outros serviços francamente importantes numa sociedade atual polimedicada, como é o caso do acompanhamento farmacêutico e revisão da medicação. Há ainda espaço para integrar a venda e aconselhamento de produtos que não constituem elementos terapêuticos, mas apenas recursos com vista à melhoria da qualidade de vida das pessoas.

O estágio em farmácia comunitária encontra-se integrado no plano curricular do MICEF, proporcionando a todos os alunos uma possibilidade única de crescimento profissional e pessoal. Neste estágio os alunos têm a possibilidade de conhecer de forma mais aprofundada a forma como as farmácias comunitárias se integram numa rede de cuidados primários. Durante este período o principal objetivo é reunir competências técnicas e de comunicação que permitam desempenhar futuramente o papel de farmacêutico com reconhecimento de confiança, competência e disponibilidade por parte dos utentes.

A farmácia da Mouraria, denominada anteriormente por farmácia Ferrão, sofreu profundas mudanças ao longo da sua história. Do ponto de vista estrutural, o edifício foi sofrendo mudanças drásticas ao longo do tempo. A última mudança registada terminou em Abril de 2019. Esta alteração estética e funcional permitiu uma nova abordagem de marketing face a um novo paradigma estabelecido no que respeita à interação dos clientes e farmacêuticos.

O presente relatório tem o seu conteúdo organizado segundo uma análise SWOT, focando os pontos fortes, as fraquezas, ameaças e oportunidades no que diz respeito à posição do farmacêutico e da farmácia na comunidade. Esta técnica recorre à análise destes quatro fatores realizando um diagnóstico geral. Este diagnóstico possibilita a criação e implementação de estratégias de adaptação, planos estratégicos de gestão de risco e de aproveitamento de oportunidades (1)

Tabela II – Análise SWOT – Estágio na Farmácia Mouraria

<u>Análise SWOT</u>	
<u>Pontos fortes</u>	<u>Pontos fracos</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>*Diversidade de tarefas efetuadas</li> <li>*Recursos humanos</li> <li>*Formação contínua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Primeiro estágio em farmácia comunitária</li> <li>*Dificuldade em associar os nomes comerciais à nomenclatura DCI</li> <li>*Formação desadequada em determinadas áreas</li> </ul>
<u>Oportunidades</u>	<u>Ameaças</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>*Localização da farmácia e heterogeneidade de utentes</li> <li>*Participação no programa nacional de HIV</li> <li>*Serviços prestados na farmácia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Venda de MNSRM em locais fora da farmácia</li> <li>*Procura de MSRM</li> <li>*Rotura de stock e alteração de participações</li> <li>*Invalidade de prescrições médicas</li> </ul>

## Pontos fortes

### Diversidade de tarefas efetuadas

Ao longo do estágio realizado em farmácia comunitária, tive oportunidade de realizar uma diversidade de tarefas desde o exercício menos especializado e mais automático da gestão de stocks e mantimento da logística de encomendas e integração das mesmas no sistema informático até à prestação de serviços mais especializados do ponto de vista clínico e farmacêutico. Estes serviços mais especializados tornaram-se parte integrante do dia-a-dia desta farmácia cujo ratio de população idosa, carecida de acompanhamento clínico, é efetivamente elevado. Por outro lado, a localização geográfica em questão, gerou um aumento de solicitação da prestação de serviços clínicos diversos junto de turistas e imigrantes com preferência de serviços hospitalares diferenciados. Para além destes serviços, de mais técnicos e de aconselhamento farmacêutico, tive oportunidade de acompanhar aspetos mais burocráticos como análise de documentos relativos a notas de crédito, notas de débito, faturas e notas de encomenda. Outras tarefas como a negociação de preços e campanhas, gestão de stocks e de prazos de validade, foram desempenhadas ao longo do tempo. Toda esta gestão documental, de serviços e ideias é importante e deve ser ativamente praticada por todos os elementos integrantes da farmácia de modo a otimizar o processo de gestão e maximizar a faturação alcançada.



## Recursos humanos

O principal fator dinamizador da estrutura de uma farmácia é a equipa que a compõe. Durante este estágio tive a oportunidade única de trabalhar com profissionais com reconhecida competência comunicacional e técnica. Estes profissionais asseguraram a minha rápida integração e uma aprendizagem contínua.

Deixo um agradecimento sincero à Dra. Rita Gomes, e à restante equipa que proporcionou durante todo o período de estágio a possibilidade de alargar o meu leque de conhecimentos nas diversas áreas farmacêuticas e de melhorar a minha capacidade de prestação de serviços.

## Formação contínua

Graças à extraordinária equipa com que trabalhei, pude desde cedo integrar programas de formação em áreas de dermocosmética, cujo acesso me permitiu não só a integração de novos conhecimentos relativos à área, mas também a aprendizagem de novas técnicas de marketing e de impulsionamento de vendas. Todas estas formações foram dinamizadas por grupos como Pierre Fabre ou a cosmética Ativa, que inclui marcas como a Vichy, Avène, La Roche de Posay, Skinceuticals, entre outras.

Outra área de formação que pude abraçar foi a área que engloba os suplementos nutricionais e suplementos à base de plantas. Estas áreas constituíram desde cedo um desafio, uma vez que as marcas implementadas no mercado e vendidos na farmácia possuem diversas linhas intervenção e ainda diversos elementos ativos apropriados a cada patologia.

Deste modo, acredito que as formações tiveram um papel de destaque no meu percurso, tendo proporcionado uma constante aprendizagem e preenchimento de lacunas em certas áreas.

## Pontos fracos

### Primeiro estágio em farmácia comunitária

O facto de este ter constituído o primeiro estágio em farmácia comunitária não constituiu um impedimento à minha capacidade de exercer as funções esperadas. Contudo, este foi um fator que limitou nos primeiros dias a minha capacidade de realizar tarefas pela falta de prática na relação com o sistema informático utilizado na farmácia

### Dificuldade em associar os nomes comerciais à nomenclatura DCI

Durante os primeiros tempos de trabalho na farmácia, senti alguma dificuldade em relacionar nomes comerciais com a respetiva nomenclatura DCI. De facto, os novos modelos de prescrição por DCI vieram a facilitar essa tarefa. Contudo, existe ainda muito conhecimento social dirigido para os nomes comerciais, que constituem ainda uma preferência entre muitos consumidores que rejeitam os medicamentos genéricos e a diversificação de marcas em regime de terapêutica crónica.

### Formação desadequada em determinadas áreas

Ao longo deste estágio senti-me efetivamente preparada para responder à maioria dos desafios colocados diariamente. Porém, sabe-se que o número de referências de produtos vendidos numa farmácia é muito grande. Assim, senti alguma dificuldade de intervenção em áreas específicas em que encontramos uma diversidade de referências e uma mutabilidade grande de produtos consoante as necessidades dos consumidores. Destaco as áreas de puericultura, cosmética, veterinária, entre as mais desafiantes e que mais exigiram investimento em investigação e atualização durante o estágio.

## Oportunidades

### Localização da farmácia e heterogeneidade de utentes

A farmácia da Mouraria encontra-se situada na praça Martim Moniz, estando muito próxima de cuidados de saúde primários, com a presença de uma USF na proximidade e ainda de cuidados de saúde diferenciados pela presença do Hospital de São José, centro de referência e Serviço de Urgência permanente do Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central. Deste modo, a farmácia recebe diariamente utentes provenientes dessas instituições, muitas vezes com necessidades especiais no contexto de integração de um plano terapêutico novo. Esta farmácia presta também serviços muito específicos junto de populações migrantes, que muitas vezes estão ainda em processo de legalização de residência ou com condições socio-económicas precárias, rejeitando o recurso a cuidados de saúde diferenciados em situações de necessidade. Por outro lado, a farmácia da Mouraria reúne diariamente um número grande de turistas e nativos que recorrem a esta para resolução de patologias mais elementares.

### Participação no programa nacional de HIV

Em colaboração com o Serviço Nacional de Saúde a farmácia está incluída numa rede que abraçou um projeto piloto integrado no Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central (CHULC), monitorizado pelo *Imperial College*, de Londres, de cedência de medicamentos hospitalares nas farmácias comunitárias portuguesas, em regime de terapêutica de HIV. Esta cedência é feita a doentes voluntários, permitindo melhorar a rapidez de acesso dos mesmos a medicação crónica imprescindível. Junto das farmácias é possível monitorizar a assiduidade de consumo destes medicamentos, sinalizar alterações comportamentais que comprometam a terapêutica e ainda assegurar um ambiente mais familiar na entrega de medicamentos e na prestação de auxílio em situações decorrentes da doença.

### Serviços prestados na farmácia

Os serviços prestados na farmácia em questão são diversos tais como a medição da pressão arterial, colesterol, IMC, vacinação. Acima de tudo, existe uma enorme procura junto da farmácia de aconselhamento em patologias específicas como diabetes, hipertensão, insuficiência venosa associada a edema de membros inferiores. Junto dos doentes procura-se estabelecer uma elevada adesão à terapêutica com correção e sinalização de situações de risco em regimes terapêuticos não integrados (com reunião de *inputs* de diferentes unidades hospitalares). De modo a melhorar a qualidade de vida dos doentes, a farmácia possui também de um aconselhamento e seguimento nutricional. Outra área de intervenção da farmácia é junto de lares de idosos, com preparação de medicação segundo o regime de prescrição de cada doente e ainda com aconselhamento em casos específicos. A farmácia presta ainda um serviço social com o fornecimento de “kits de prevenção” e recolha de material com contaminação biológica na sequência de hábitos toxifílicos.

## Ameaças

### Venda de MNSRM em locais fora da farmácia

A venda de MNSRM em locais externos à farmácia, constitui a meu ver um risco para os doentes que em muitos casos iniciam terapêuticas desadequadas na sua qualidade, dose ou duração. Para além disso, existe um incontornável risco para as restantes farmácias que não possuem uma capacidade competitiva no estabelecimento de preços face aos grandes grupos atuais que constituem as parafarmácias. Resta aos profissionais que integram equipas presentes

em farmácias fazer a diferenciação no momento da aquisição do produto, com acréscimo de informação especializada e outros serviços diferenciados.

### Procura de MSRM

A busca de medicamentos sujeitos a receita médica, sem a respetiva prescrição constitui a meu ver um problema para as farmácias. No processo de decisão do doente, cabe ao farmacêutico influenciar de modo a que o doente recorra a medicamentos de venda livre, de venda exclusiva em farmácia, suplementos à base de plantas ou ainda recurso ao médico. Este processo de influência é muitas vezes difícil de gerir, uma vez que é gerado um conflito de interesses assim como uma pressão para manter a fidelidade do cliente junto da farmácia. A meu ver, os suplementos à base de plantas constituem uma boa alternativa, muitas vezes bem acolhida por doentes, no tratamento de problemas comuns como infeções urinárias, ansiedade, distúrbios do sono.

### Rotura de stock e alteração de participações

No processo de estabelecimento da cadeia do medicamento, surgem frequentemente problemas que colocam em risco a disponibilidade de medicamentos na farmácia. Este é atualmente um problema grave que compromete muitas vezes terapêuticas crónicas de muitos doentes por tempo indeterminado, sendo uma fonte de frustração para o farmacêutico, bem como uma fonte de insegurança e incerteza para o doente. Nestes casos específicos, cabe ao farmacêutico verificar se existe outra alternativa (outro laboratório, outra dose que possa ser ajustada), ou se a única solução é aconselhar uma revisão de terapêutica junto do médico. Existe ainda o problema da alteração de participações, muitas vezes sem alteração imediata do valor associado no sistema informático presente na farmácia. Esta alteração compromete por um lado a faturação da farmácia, que muitas vezes acaba por vender o medicamento ao preço inicialmente marcado, com a validação errónea de prescrições médicas. Por outro lado, o processo de informação junto do doente da subida de preço do medicamento, nem sempre é pacificamente acolhida.

Deste modo o processo de gestão de stocks constitui uma prática muito importante, podendo algumas das situações ilustradas ser evitadas.

### Invalidez de prescrições médicas

No seguimento de uma prescrição médica inválida (rasura, falta de vinheta, falta de carimbo, falta de assinatura, entre outras), surgem muitas vezes problemas na participação de medicamentos junto da farmácia. De modo a evitar o risco de não atribuição do valor

comparticipado, cabe a cada profissional de saúde fazer verificação cuidada de cada prescrição médica que chega à farmácia. Na região do Martim Moniz esta ação tem especial importância, uma vez que ainda existem muitas clínicas a operar sem sistema informático adequado à prescrição eletrónica.

## Conclusão

Quando iniciei o estágio em farmácia comunitária, esperava encontrar uma população caracteristicamente multicultural, com necessidades variadas, tendo em consideração a localização da mesma e o contexto social que integrava. Efetivamente as minhas expectativas foram ultrapassadas e o que observei foi uma dinâmica diária com mais desafios diários do que os esperados. Esta farmácia, localizada na zona de Martim Moniz, surge como um apoio fundamental para um conjunto de utentes estrangeiros e migrantes, que pelas dificuldades de acederem a cuidados diferenciados em hospitais públicos, acabavam por fazer uma primeira abordagem ao tratamento/alívio do sintoma junto de farmacêuticos. Para além desta realidade, a farmácia abrange também uma área metropolitana na qual estão inseridas uma porção de moradores com idades mais avançadas, em situações de isolamento e mesmo de risco. Para estas pessoas é fundamental o apoio psicológico e farmacêutico.

Durante este estágio procurei apreender o maior número de competências possíveis, assumindo sempre as minhas incapacidades e dificuldades. Procurei acima de tudo, passar informações fidedignas, o mais completas possíveis, direcionando sempre situações mais complexas, para profissionais com mais experiência e capacidade de resposta.

Este estágio permitiu-me perceber a dinâmica de trabalho existente dentro de uma farmácia, as exigências e dificuldades diárias que os profissionais que trabalham nas mesmas sentem, e a toda a rede de relações e cuidados prestados aos utentes.

Por fim quero deixar o meu agradecimento a toda a equipa, que me acolheu e acompanhou de forma próxima, empenhada, de modo a garantir e maximizar a minha formação e aquisição de novas ferramentas de trabalho.

## Bibliografia

- (1) TechTarget – SWOT analysis - [acedido a 25 de Maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://searchcio.techtarget.com/definition/SWOT-analysis-strengths-weaknesses-opportunities-and-threats-analysis>
- (2) Grupo Farmácias Portuguesas - Cartão Saúda – [acedido a 15 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/saуда>
- (3) DGS - Kit Prevenção SIDA - [acedido a 15 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.pnvihsida.dgs.pt/ficheiros-externos-geral/pts-fluxograma-de-intervencao-para-as-estruturas-de-reducao-de-riscos-e-minimizacao-de-danos1.aspx>
- (4) SNS - Medicamentos para VIH nas farmácias - [acedido a 15 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/07/13/medicamentos-para-vih-nas-farmacias/>

## Anexo I - Caso Clínico

A.P. senhora de 70 anos dirige-se à farmácia com queixas de mal-estar após a toma de celecoxib 100 mg recentemente prescrito pelo médico e do qual terá realizado apenas uma toma. A senhora em questão foi anteriormente sujeita a uma cirurgia aórtica e ainda a uma nefrectomia. Apresenta outras comorbilidades como hipercolesterolemia e hipertensão. O perfil farmacoterapêutico apresentado é o seguinte: ramipril 5mg (I.0.0), zolpidem 10 mg (0.0.1), celecoxibe 100 mg (I.0.1), bisoprolol 5 mg (I.0.0), AAS 150 mg (0.1.0), atorvastatina 20 mg (0.0.1).

Os sintomas descritos pela senhora A.P. após a toma do medicamento por volta das 13h foram: sensação de desmaio, tremores e sensação de frio. Refere melhoria dos sintomas horas depois, após descanso e ingestão de bebidas açucaradas, não cumprindo a segunda toma diária do medicamento descrito. Uma vez que os sintomas poderiam estar associados a uma hipoglicémia não relacionada com a toma do medicamento em causa, aconselhou-se a repetição da toma do medicamento no dia seguinte, segundo o esquema terapêutico, previamente definido pelo médico, de modo a reforçar uma eventual relação de causalidade entre a toma do celecoxib e o surgimento de uma eventual reação adversa.

No segundo dia de toma do medicamento, A.P. alega sentir os mesmos sintomas, que regridem. Desta vez, foi precavida a possibilidade de existir uma hipoglicémia através de uma refeição recente previamente à nova toma do medicamento. Deste modo, após discussão do caso em equipa, decidiu notificar-se o INFARMED, submetendo-se o eventual evento adverso medicamentoso ao grupo de farmacovigilância responsável.

Sabe-se que a toma do celecoxib está contraindicada em doentes hipertensos por inibição das prostaglandinas vasodilatadoras. O facto de o celecoxib ter excreção renal merece especial atenção no que concerne à escolha da dosagem, particularmente no contexto desta doente já com patologia renal conhecida e previamente submetida a uma nefrectomia.

A associação entre celecoxib e o AAS aumenta o risco de complicações gastrointestinais, pelo que a sua utilização em conjunto deve ser feita com especial cuidado, tendo em conta as particularidades de cada doente.



**Parte III – Nanosized delivery systems  
for fluoroquinolones: a review and  
practical case formulation in the setting  
of multidrug-resistant bacteria**

## Introduction

Almost a century after the invention of the first antibiotics, the world faces a new crisis related to microorganism-induced morbidity and mortality arising from resistant bacterial infections.

The antibiotic resistance is now a global threat to world's public health, encompassing several challenges to human health and to medical care. There is an urgent and widely recognized need for governmental intervention to raise awareness on the problem among the citizens and also to prevent unnecessary costs related to the more expensive antibiotic regimens required for treating multi-resistant infections, resulting in better healthcare provided to the patients and improving public health as a whole cluster, decreasing the mortality rates as a result (World Health Organization, 2009).

The magnitude of multi-resistant infections is rapidly increasing both in healthcare facilities as well as in the general community and it comprises an actually tangible risk to the population. For instance, recurrent infection caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is known to increase death rates by 64% when compared to "non-resistant" strains of *S. aureus* (World Health Organization, 2009).

The fluoroquinolones are a group of antibiotics whose performance has been progressively compromised due to its widespread use in urinary tract infections caused by *E. coli*, leading to the development of resistant strains to this group of antibiotics.

In the past, the fluoroquinolone-resistant microorganism strains were usually found in intensive care units and most of them were caused by MRSA, *P. aeruginosa*, anaerobials and other less common bacteria that arise in immunocompromised patients and in patients under several consecutive antibiotic protocols. However, there have recently been reported fluoroquinolone resistances among community acquired infections by *E. coli* and *N. gonorrhoeae*, depicting an alarming scenario of these resistance mechanisms' proliferation, extending to community infections as well as asymptomatic carriers who may serve as a reservoir to maintain the proliferation of these resistant strains (Dalhoff, 2012).

On the other hand, the bacterial capacity to develop antibiotic resistance mechanisms is the demonstration of their capacity to adapt and to evolve characteristics making them better survive in a previously hostile environment. This evolution process usually occurs through mutations which are accumulated throughout the process of bacterial division and proliferation, reaching its pinnacle with the survival of the fittest to the surrounding environment, selecting the resistant strains (Dalhoff, 2012).

These phenomena have been reported and studied in numerous types of bacterial infections and a very well-known example of this issue has been observed in upper and lower respiratory infections, where 10-30% of the infections caused by *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) and *Haemophilus influenzae* (*H. influenza*) were reported to show at least one mechanism of resistance. Prevalence of resistance mechanisms has been increasing, including the acquisition of new mutations that provide resistance to fluoroquinolones (Dalhoff, 2012).

The development of resistances is intrinsically associated with the selection of microorganisms with mutations that provide them the capability of escaping the action mechanisms of antibiotherapy. This event is often associated with inappropriate antibiotic therapies, namely comprising the lack of dosage adjustment, with courses of antibiotherapy giving less dosage than suitable to completely eradicate the infection. Shorter antibiotherapy cycles can also influence the development of resistances if the infection is not totally controlled and not all the reservoirs are subject to the therapeutic effects.

Immunocompromised individuals are more prone to be suitable environment for multi-resistant infections, since they are frequently subject to antibiotherapy for various infections and they don't have their own infection-fighting mechanisms actively eradicating the infection, lowering most antibiotic's efficiency.

Therefore, arises the need to invest in the development of new antibiotic molecules or other formulations that reinforce antibiotic efficiency or that can bypass the bacterial resistance mechanisms, enabling the previous drugs to remain active.

This work intends to review several nanoparticle drug delivery formulations towards a better understanding of the antibiotic resistance, highlighting advantages and disadvantages regarding their activity against multiresistant microorganisms. This work also encompasses a systematic analysis of the properties of nanoparticles, such as the bioavailability of the antibiotics they embrace, as well as the maintenance of their antibacterial activity. The production methods, antibiotic dosage and physical or chemical properties of nanoparticles will also be approached in this study, in order to further understand the differences among different nanoparticles and to establish a hierarchy of the interest of the several nanosystems applied, regrading bypassing bacterial resistance.

## Materials and methods

Literature data together with laboratory experimental part conducted in University of Coimbra, to create a larger database and therefore to better discussion of data and conclusions described in the literature.

The inclusion criteria for the selected articles were: (I) having one of the following keywords (ciprofloxacin, levofloxacin, NLC, SLN, fluoroquinolones or resistance); (II) published within the last 15 years. The systematic search for articles was performed from March 2018 to April 2019 and included searches in PubMed and Medline.

For the laboratory tests conducted in the University of Coimbra, experimental methodology to produce the several types of nanoparticles followed basic principles previously described (Vitorino et al., 2013) (Mendes et al., 2016).

# Quinolone Antibiotics

## Historical review and action mechanism

Fluoroquinolones are a group of antibiotics which get their basis from the nalidixic acid, with a broad action spectrum. This group of antibiotics has evolved throughout the years in order to improve their action mechanisms and pharmacokinetic properties. They were first discovered between 1970 and 1980 and they quickly became the treatment of choice for urinary tract infections, with an annual billing of 3.04 Billion dollars in 1997 (Emmerson, 2003).

Quinolones' antibacterial properties are closely related to their concentration and therefore they are described as "concentration-dependent" (Owens e Ambrose, 2000). Their action mechanism encompassed the inhibition of two bacterial enzymes involved in the DNA synthesis and replication – Topoisomerase IV and DNA gyrase. Topoisomerase IV is the mainstay for the separation of the double-stranded DNA that forms after the replication process. The DNA gyrase allows the negative torsion of the double-stranded helix of the bacterial DNA in the replication zone, enabling and catalysing the final separation of the son chromosomes in the replication process. Both these processes are of critical importance to begin the DNA replication and allow the linkage of initiation proteins (Blondeau, 2004) that will further develop the process of bacterial replication. By interfering with these mechanisms, quinolones disable the replication, reparation and transcription process, indirectly interfering with the essential functions of bacterial activity and rapidly resulting in cellular death (Owens e Ambrose, 2000).

## Resistance Acquisition

The resistance mechanisms arise in a dynamic balance throughout the time. However, it is now widely known that there are several factors which accelerate the development of new resistance mechanisms and its dissemination. The incorrect usage of drugs in the farming, the choice of sub-therapeutic dosages associated with prescription errors or the misuse of medication by patients are some of the contributing factors, as well as the environmental accumulation of substances, the incorrect disposal of medication and the lack of sanitary hygiene conditions (World Health Organization, 2009).

Between the several resistance mechanisms we would like to highlight two big groups of mechanisms: the change in the antibiotic therapeutic target, and the capacity of passing through the bacterial membrane, reaching the actual target.

The acquisition of different resistance mechanisms occurs asymmetrically between Gram positive or Negative bacteria and the clinical impact of the development of these mechanisms also depends on the original bacteria, not only on the mechanism itself (Blondeau, 2004).

## Gene

The acquisition of new genes which concede resistance capacity is a common event in Gram negative bacteria, in which the mutations of the *gyrA* and *gyrB* genes result in different DNA gyrase sub-units, preventing them from being affected by antibiotics whose action encompasses this target, as previously described for quinolones. This one of the most common resistance mechanisms in Gram negatives and these mutations classically occur spontaneously in the “Quinolone Resistance Determining Region” (QRDR) (Pignatello et al., 2018). It is thought that the mutations in this region result in an affinity decrease between the drugs and DNA gyrase, and it is known that the degree of resistance granted by mutation in *gyrA* is greater than that of mutation involving *gyrB* (Blondeau, 2004).

Differently, in Gram positive bacteria, the DNA gyrase mutation were only detected when there were concurrent topoisomerase IV mutations. The *ParC* gene mutations were the highest reported in Gram positive bacteria such as *S. aureus* and *S. pneumoniae*, and it is admitted that its activity is also due to the imbalance provoked by the decrease of affinity in the complex drug-enzyme (Blondeau, 2004).

## Efflux pumps

Most antibiotic's target are intracellular, which implies that the drugs must be able to enter the cytoplasmic membrane in order to get their targets. Even though they can get inside this membrane, sometimes the bacteria have efflux pumps. The efflux pumps actively expel the drugs before they have the opportunity to achieve their targets, therefore decreasing or restraining the antibiotic effectiveness. (Pignatello et al., 2018).

The accumulation of the drugs inside the bacterial cells might also be compromised because of diminished diffusion throughout the external membrane that covers Gram negative bacteria (Blondeau, 2004).

## Biofilm Production

The production of biofilms is another defence mechanism against external aggression as it avoids the diffusion of the antibiotics through its layers and matrix, therefore making it more difficult for drugs to reach their targets (González et al., 2018). The production of biofilm begins with the adhesion of free bacteria to a surface, whether it is a living surface or an inanimate one. After the adhesion process, these adherent bacteria secrete an extracellular polymeric substance (EPS) and they make the scaffold for the tridimensional biofilm's structure that allows the third step, the biofilm growth. The biofilm matrix is mainly compound of polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids. This matrix promotes the communication between bacterial cells, enables gene transference and protects the bacterial colony from external agents (Han et al., 2017).

The bacterial infection associated with biofilm production is a recurrent event in urinary catheters, articular prosthetics, contact lenses and other medical devices (Han et al., 2017).

The resistance granted by biofilms can mainly correlate with two factors: the decrease in antibiotic diffusion through the biofilm due to the physical barrier its matrix creates, or the inactivation of the antibiotic drug, which may connect with the polysaccharides, proteins or DNA present in the matrix (Han et al., 2017).

## **Quinolones Uses**

Although there are many quinolones, not all of them are used in the same clinical settings as their pharmacological properties help distinguishing towards a more appropriate selection regarding specific sites of application or types of infection.

Ciprofloxacin an evergreen drug which is commonly used in cutaneous, pulmonary and urinary infections, as well as in abdominal and gastrointestinal infections. It is effective against Gram negative bacteria such as *P. aeruginosa* and also against Gram positive bacteria, such as *S. aureus* (Gamal, 2017).

Ciprofloxacin is frequently used as a treatment and also in the prophylaxis of osteomyelitis caused by *P. aeruginosa* or *E. coli* (Munir et al., 2018). It is also a common choice for ocular infections in conjunctivitis settings (Jain e Banerjee, 2008).

Levofloxacin is commonly used in acute bacterial conjunctivitis (Gupta et al., 2011), *S. aureus* induced osteomyelitis (Bastari et al., 2014), and also for topical ophthalmic usage in ocular *P. aeruginosa* and *S. aureus* infections (Ameeduzzafar et al., 2018). Another clinically relevant setting for the usage of levofloxacin is the difficult management of *P. aeruginosa* pulmonary infections (Islan et al., 2016).

## **Advantages of colloidal systems**

In order to surpass antibiotic resistance, one of the ventures that has been thoroughly developed is the creation of drug delivery systems, for example nanosized colloidal systems.

Among several colloidal systems we can find lipidic, polymeric, inorganic or dendrimers. The main advantages of these nanoformulations are the increase in bioactivity and bioavailability due to higher absorption of the drug, as well as a decrease in drug metabolism, degradation and clearance of the active principle. Another important aspect to factor in is that the colloidal systems may allow an increase in solubility and an increased stability of the drug's active principle (Pignatello et al., 2018).

Drug delivery by colloidal systems may also allow a better delivery steady-states, with longer range drug delivery profiles, leading to a decrease in the needed dosage and toxicity concomitantly with an increase in efficacy (Jain e Banerjee, 2008). The enzymatic breakdown of a drug can also be inhibited by the nanoencapsulation technique (Jain e Banerjee, 2008).

Beyond the improvement in pharmacokinetics, the increase in antibacterial properties of encapsulated drugs can also be explained by the easier access to the bacterial cell, which is usually achieved with lower sized particles and is also affected by the particle's solubility (Gamal, 2017). The association of drugs with polycationic structure (dendrimers) may nurture the interactions with the bacterial membranes, thus increasing drug's effectiveness (Ameeduzzafar et al., 2018).

Another interesting characteristic of colloidal systems is the fact that they can increase the drug absorption in difficult absorption settings, such as the usage of polymeric particles in the treatment of ocular infections (Baig et al., 2016), which allows to maintain a preferable route of administration avoiding the need for systemic intervention.

Regarding the usage of inorganic nanoparticles, the choice of metallic ions such as silver may have activity on its own, presenting bactericidal capacity for interfering with bacterial structure and metabolic processes (Panáček et al., 2016). Zinc oxide is also associated with the disruption of bacterial cell membranes, the induction of oxidative stress through the production of oxygen reactive species and therefore allowing the immune system actions (Ghasemi e Jalal, 2016).



## Types of Colloidal Systems

### Lipid Particles: Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured lipid carriers

Our study will focus on Solid Lipid Particles and the Nanostructured Lipid Carriers because of their performance in the treatment of antibiotic resistant bacterial infections. These two classes have different properties that may lead to distinct pharmacokinetic profiles. Opposite to SLN, NLC have an added liquid lipid (at room temperature) that allows the formation of a disordered crystalline structure. This property leads to improved pharmacologic stability, preventing the encapsulated molecules from exiting their capsule (Li et al., 2017).

### Production Methodology

#### Hot High-Pressure Homogenization (HPH)

In this SLN production system, the drug is dispersed in lipids and then an aqueous surfactant fraction is added at the same temperature as the oily phase. Both phases are homogenized using high-speed stirring or ultrasound. The obtained pre-emulsion is then processed through High Pressure Homogenization (HPH) until particles reach the required size. The obtained nanoemulsion is stored at low temperatures in order to promote the recrystallization of the lipids (Uchegbu et al., 2013).

The control of the particle size is of utmost importance, and it can be achieved by temperature changes. Higher temperatures will generally decrease the lipids' viscosity, therefore decreasing the size of the particles. However, the increased temperatures may also influence the stability of the drug and may lead to drug degradation, as well as to the rupture of the nanoparticle if the lipid components lose too much of their viscosity. Contrary to techniques like high-shear homogenizers or ultra-sonication, HPH homogenizers are characterized by homogenous particle distribution (Souto e Müller, 2007).

This technique is not suitable to encase hydrophilic drugs and the main advantage of HPH is that it allows the avoidance of organic solvents (Li et al., 2017). It is also appropriate to large-scale production technology (Souto e Müller, 2007).

#### Ultra-Sonication Method

In this method, both the lipids and the drug are added and dispersed in an aqueous phase with a surfactant by using ultra-sonication. The mixture is cooled down to environment temperature and the nanoparticles will solidify during procedure (Islan et al., 2016).

#### Micro emulsion technique

The lipid and o/w surfactant or cosurfactant containing aqueous phase undergo heating until they reach a temperature above the fusion point of the lipid component. The next step occurs with the homogenization of both phases. The resulting microemulsion is then diluted with cold water, obtaining a nanoemulsion, with the recrystallization of the internal lipid phase. The critical step of this technique is the establishment of the adequate temperature for the homogenization process (Uchegbu et al., 2013). The quick decrease in temperature allows solidification of the particles and prevents their aggregation. The main advantage of this method is its technical simplicity, whereas its main disadvantage is the usage of high quantities of emulsion and auxiliary agents (Li et al., 2017). The requirement of water removal in the final dosage form is an inconvenient procedure (Souto e Müller, 2007).

#### Solvent emulsification-evaporation method

This technique is applied to drugs which are not lipid soluble (hydrophilic drugs such as proteins and peptides), through solvent evaporation o/w microemulsion. Both the drug and the lipid are dissolved in an organic solvent (not miscible with water – chloroform, cyclohexane). The organic phase is dispersed in an aqueous solution with surfactant by mechanical stirring, therefore producing an o/w emulsion (Uchegbu et al., 2013). The organic solvent is volatilized by heating, and this process gives origin to the nanoparticles with precipitation of lipid in aqueous medium. The disadvantages of this method comprise its unadjustment to the industrial production, as well as the contamination of the final product with residual solvents or by-products (Li et al., 2017). The quickly solvent evaporation medium is a critical step to avoid aggregation of particles (Souto e Müller, 2007).

#### Solvent injection method/ Solvent displacement technique

This method encompasses the dilution of the lipid and drug in the organic phase (water miscible solvent as ethanol, methanol, acetone). The temperature of the organic phase is increased to surpass the lipid's fusion temperature. Thereafter, the organic solution is added drop by drop to the o/w surfactant containing aqueous mixture, which is maintained in movement under agitation for several hours, to ensure the evaporation of the organic solvent. In the process occurs the formation of nanosized solvent droplets stabilized by surfactant

molecules in the o/w interface. After complete solvent diffusion and evaporation (accomplished by distillation) a lipid precipitation occurs (Souto e Müller, 2007). At last, the remaining suspension is then sonicated at environment temperature in order to produce the nanoparticles. This method presents numerous advantages such as the fast production process and the fact it does not require sophisticated or specific materials (Pignatello et al., 2018).

## Particle characterization: physical and chemical properties

Considering the focus of our analysis, following data were collected from scientific articles whose purpose was nanoparticle formulation, using different techniques. In all of the considered articles, the drug encapsulated was a quinolone and distinctive physical and chemical characteristics have been achieved. Information related to NLC produced in University of Coimbra's laboratory was also included.

Table III – Production methods of SLN and its physical and chemical characterization

Drug	Lipid	Surfactant	Method	Entrapment efficiency (%)	Zeta (mV)	Particle Size (nm)	Ref.
Ciprofloxacin	Softisan® 154 (Hydrogenated Palm Oil),	Polysorbate 80	Micro emulsion	68.95	-3.11	176	(Gamal, 2017)
Ciprofloxacin	Dynasan® 118 (Tristearin)	Polysorbate 80	Micro emulsion	71.24	-3.57	150	(Gamal, 2017)
Ciprofloxacin	Imwitor® (Glyceryl Monostearate)	Polysorbate 80	Micro emulsion	64.33	-32.99	257	(Gamal, 2017)
Ciprofloxacin	Stearic acid	Polysorbate 80	Micro emulsion	73,66	-23.47	174	(Gamal, 2017)
Ciprofloxacin	Stearic acid	Phosphatidylcholine Sodium taurocholate (co-surfactant)	Micro emulsion	38.71 - 62.38	-28 to -37	73-98	(Jain e Banerje e, 2008)

Levofloxacin	Stearic acid	Polysorbate 80, Sodium deoxycholate (co-surfactante)	solvent evaporation	60.6 - 91.8	-	237.82	(Baig et al., 2016)
Levofloxacin	Clove oil (eugenol)	Polysorbate 20 (surfactant), 2-propanol (cosurfactant)	Micro emulsion	-	-	129,7	(Nazar et al., 2017)
Ciprofloxacin SLN loaded with 100 µg/mL of drug	Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	91.1	-39.3	353.8	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 100 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 0.5 (% w/v) Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	88.7	18.7	311.7	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 100 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 1 (% w/v) Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	86.1	35.1	345	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 100 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 1.5 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	82.9	46.1	315	(Pignatello et al., 2018)

	Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)						
Ciprofloxacin SLN loaded with 500 µg/mL of drug	Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	93.0	-41.9	309	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 500 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 0.5 (% w/v) Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	90.3	32.8	272	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 500 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 1 (% w/v) Softisan® 100 (S100) 1	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	87.7	+46.7	285.9	(Pignatello et al., 2018)
Ciprofloxacin SLN loaded with 500 µg/mL of drug	DDAB (cationic lipid didecyldimethyl ammonium bromide) 1.5 (% w/v) Softisan® 100 (S100) 1 (% w/v)	Polysorbate 80	Solvent injection (SI)	89	+50.5	305.2	(Pignatello et al., 2018)
Levofloxacin	lipid myristyl myristate 0.2g	Poloxamer 188 - Nonionic surfactant)	Ultrasonication	20.1 ± 1.4	NA	NA	(Islan et al., 2016)

Table IV – Production methods of NLC and its physical and chemical characterization

Drug	Lipid	Lipid %	Surfactant	Method	Entrapment efficiency (%)	Zeta (mV)	Particle Size (nm)	Ref.
Levofloxacin	lipid myristyl myristate (0.2g) + oil (3wt%)	NA	Poloxamer 188	ultrasonication	55.9 ± 1.6	-10.2 ± 0.2	182.6 ± 3.2	(Islan et al., 2016)
Levofloxacin	lipid myristyl myristate 0.2g + oil (3%)	NA	Poloxamer 188	ultrasonication	12.2 ± 1.6	-10.2 ± 0.2	182.6 ± 3.2	(Islan et al., 2016)
Levofloxacin	Stearic acid, oleic acid	10	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	6,3	-28,7 ± 0,7	1064,9 ± 185,7	(a)
Ciprofloxacin	Stearic acid, oleic acid	10	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	67	-24,5 ± 0,32	877,9 ± 361,4	(a)
Levofloxacin	Stearic acid, oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	52,6	-27,5 ± 0,7	1321 ± 212,2	(a)
Ciprofloxacin	Stearic acid, oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	87	-28,6 ± 1,21	868,2 ± 201,8	(a)
Levofloxacin	Stearic acid, oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (5 min)	28,03	-28,3 ± 2,52	1321 ± 212,2	(a)
Ciprofloxacin	Stearic acid, oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (5 min)	52,9	-31,5 ± 0,436	1594 ± 58,62	(a)
Levofloxacin	Gelucire® (Polyethylene glycol monostearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	19	-30,4 ± 2,32	68,11 ± 0,416	(a)
Ciprofloxacin	Gelucire® (Polyethylene glycol monostearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	15,8	-16,3 ± 0,404	125,9 ± 0,252	(a)
Levofloxacin	Imwitor® (Glyceryl Monostearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	52,6	-31,2 ± 0,416	147,1 ± 1,57	(a)

Ciprofloxacin	Imwitor® (Glyceryl Monostearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	94	-28,2 ± 0,436	226,0±3,850	(a)
Levofloxacin	Precirol® (Glyceryl distearate), oleic acid	10	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	76,28	-30,2 ± 0,608	169,7±0,462	(a)
Ciprofloxacin	Precirol® (Glyceryl distearate), oleic acid	10	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	96,56	-18,6 ± 0,351	198,1±1,929	(a)
Levofloxacin	Precirol® (Glyceryl distearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	44,88	-37,3 ± 0,529	166,1±0,06	(a)
Ciprofloxacin	Precirol® (Glyceryl distearate), oleic acid	5	Polysorbate 80	HPH (2.5 min)	70,52	-16,7 ± 0,351	151,1±0,229	(a)

(a) Information from the nanoparticles produced in University of Coimbra's laboratory

## Polymeric Particles

There are several polymers used to synthesize polymeric nanoparticles: polyesters (Poly(d,l-lactide coglycolide) (PLGA), Policaprolactona (PCL), Poly(d,l-lactide)-copoly(ethylene glycol), Poly(d,l-lactide co-glycolide)-copoly(ethylene glycol), chitosan, alginate, polyamino acids (amphiphilic Poly(l-lysine) and amphiphilic Poly( $\gamma$ -glutamic acid), acrylates [e.g. Poly(n-butyl cyanoacrylate)] and hyaluronic acid (Uchegbu et al., 2013). The polymeric nanoparticles are formed through the precipitation of an organic phase with the polymer in an aqueous environment, or by the dispersion of an amphiphilic polymer in the aqueous field through sonication processes (Uchegbu et al., 2013).

## Production Methodology

### Hydrophobic polymers production methodology:

#### Emulsion–solvent evaporation technique

The drug and the polymer are dissolved in an organic solvent such as dichloromethane, being then dispersed in an aqueous solution containing the hydrophilic surfactant. The emulsion is achieved through the use of sonication and it is kept in movement through agitation in order to allow the organic solvent to evaporate, allowing the precipitation of the nanoparticles out of the organic phase emulsion and stabilizing them due to the interactions they form with the surfactant contained in the aqueous phase (Uchegbu et al., 2013). This technique is easy, quick and economically profitable.

#### Nanoprecipitation Method

The nanoprecipitation method relies on the interfacial deposition of polymers followed by the displacement of a semi-polar solvent from the lipophilic solution. The drug and the polymer are dissolved in an apolar solvent (in ex. acetone) at room temperature and the resulting solution is then mixed with an aqueous solution containing poly vinyl alcohol, being added on a drop-by-drop basis while maintain a continuous magnet stirring. The final step is the evaporation of acetone, resulting in the formation of an aqueous nanosuspension. This is a quick and easily reproducible technique, avoiding toxic solvents and it may be scaled to industrial usage (Miladi et al., 2017).



## Hydro-soluble polymers production methods

### Ionotropic gelation method

The ionotropic gelation method resorts to polyelectrolytes capacity to establish crossed links in the presence of counter-ions. These polymers are prepared with the addition of a gelation agent (ex. Tripoliphosphate) to an acid solution with positive charges (ex. acetic acid solution with chitosan) (Giri, 2016). The gelation agent is added on a drop-by-drop basis to the chitosan solution with a syringe while maintaining continuous magnet stirring. The recovery of the nanoparticles is achieved through ultracentrifugation (Ameeduzzafar et al., 2018). The size and charge of the nanoparticles may be modified by changes in the ratio chitosan/stabilizer (Giri, 2016). Most of the literature reviewed used an extrusion method in association to the ionotropic gelation and the biggest pitfall of this method comprises the drug loss during the preparation process. Another common problem comprises the matrix permeability of the formed molecules, and there lacks the control of drug release. In this method, the usage of syringes to produce the nanoparticles influences the size of the particles created, which are usually bigger (Patil et al., 2010).

### Coacervation Method

In the coacervation method an aqueous protein solution is mixed with an organic solvent such as acetone or ethanol. This method uses changes in the pH of the medium according to the physical and chemical properties of the polysaccharides and the alkalisation of the mixture allows the polysaccharides to deposit (Giri, 2016). The formation of coacervates is also dependent on the addition of a crosslinking agent such as glutaraldehyde (Sundar, Kundu e Kundu, 2010). Once the nanoparticles are forms, their separation and purification are obtained through filtering and centrifuging processes followed by successive water washes. The physical and chemical properties as well as the releasing profiles of the drug can be changed through changes in two of the ionic polymer ratios – ex. chitosan:sulfane dextrosane (Giri, 2016). This method is simple and inexpensive and can therefore be applied to industrial scaling (Uchegbu et al., 2013).

## **Particle characterization: Physical and chemical characterization**

The following table provides information related to physical and chemical characterization of synthesized polymeric nanoparticles using some of the previously described

techniques in this article. Data were collected from scientific articles whose focus was the nanoencapsulation of quinolones.

Table V – Main production methods of polymeric particles and respective characterization results.

Drug	Polymer	Stabilizer	Method	Entrapment efficiency (%)	Zeta (mv)	Particle Size (nm)	Ref.
Levofloxacin	0.10% chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionotropic gelation	52.34±2.23	+30.43±1.08 to +21.87±1.87	127.23±2.31	(Ameeduz zafar et al., 2018)
Levofloxacin	0.15% chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionotropic gelation	65.57±1.54	+30.43±1.08 to +21.87±1.87	148.90±3.32	(Ameeduz zafar et al., 2018)
Levofloxacin	0.2% chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionotropic gelation	73.43±3.78	+30.43±1.08 to +21.87±1.87	189.50±4.21	(Ameeduz zafar et al., 2018)
Levofloxacin	0.25% chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionotropic gelation	81.21±5.12	+30.43±1.08 to +21.87±1.87	223.65±5.13	(Ameeduz zafar et al., 2018)
Levofloxacin	Poly(lactide-co-glycolic acid)	Poly(ethylene-alt-maleic anhydride) (PEMA)	Emulsion solvent evaporation	69.9 ± 4.4	-	25000–50000	(Bastari et al., 2014)
Levofloxacin	Poly(lactide-co-glycolic acid) (CaP) coating	Poly(ethylene-alt-maleic anhydride) (PEMA),	Emulsion solvent evaporation	49.2 ± 7.6	-	25000–50000	(Bastari et al., 2014)
Levofloxacin	Poly(lactide-co-glycolic acid)	Poly vinyl alcohol	Nanoprecipitation	85	-25	190–195	(Gupta et al., 2011)
Levofloxacin	Poly(lactide-co-glycolic acid)	Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer	Nanoprecipitation	15	-	100	(Cheow, Chang e Hadinoto, 2010)
Levofloxacin	poly(caprolactone)	Polyoxyethylene-polyoxyprop	Nanoprecipitation	5	-	100	(Cheow, Chang e

		ylene block copolymer					Hadinoto, 2010)
Levofloxacin	Poly(lactide-co-glycolic acid)	Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer	Emulsification-solvent-evaporation	16	-	200	(Cheow, Chang e Hadinoto, 2010)
Levofloxacin	Poly(caprolactone)	Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer	Emulsification-solvent-evaporation	4	-	200	(Cheow, Chang e Hadinoto, 2010)
Levofloxacin	Chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionic gelation	35.5	20	10-3	(Hadiya et al., 2018)
Ciprofloxacin	Albumin	glutaraldehyde	Coacervation	73.07± 2.32 to 25.30± 2.83	11 ± 1 to 17 ± 3	140±7 - 175±24	(Jain e Banerjee, 2008)
Ciprofloxacin	Gelatin	Glutaraldehyde	Desolvation	66.01 ± 3.09 to 21.15 ± 2.59	3 to 7	143±18 - 184 ± 27	(Jain e Banerjee, 2008)
Ciprofloxacin	Chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionic gelation	70.79± 2.49 to 11.90± 1.59	17 ± 2 to 25 ± 1	247 ± 48 - 322 ± 52	(Jain e Banerjee, 2008)
Ciprofloxacin	Chitosan	Tripolyphosphate (TPP)	Ionic gelation	99.4	42.27 ± 1.31 to 55.87 ± 1.07	36.7± 3.59	(Marei et al., 2019)

## Inorganic Particles

Metallic nanoparticles have several advantages when compared to the other nanoparticles and one of the most recognized advantages is that metallic particles may have themselves an intrinsic antibacterial activity. This type of nanoparticles can be synthesized by two different methods: top-down and bottom-up. In the first group, there is a congregation of atoms that eventually come up to form nanoparticles, whereas in the second method there is a cutting process of larger dimension particles, in order to obtain the final nanoparticles (Venkatesh, 2018).

### Particle characterization: Physical and chemical characterization

The following table will provide information related to physical and chemical characterization of synthesized metallic nanoparticles.

Table VI – Physical and chemical properties of inorganic particles

Drug	Type of nanoparticle	Entrapment efficiency (%)	Zeta (mv)	Particle size (nm)	Ref.
Ciprofloxacin	ZnO NPs	NA	NA	20	(Sharma, Jandaik e Kumar, 2016)
Ciprofloxacin	ZnO NPs	NA	NA	78±7	(Ghasemi e Jalal, 2016)
Ciprofloxacin	ZnO NPs	NA	NA	<50	(Iram et al., 2016)
Levofloxacin	AuNPs	NA	-4.16	20-30	(Pradeepa et al., 2016)
Ciprofloxacin	AuNPs	NA	-27.3	20-30	Pradeepa et al., 2016)
Ciprofloxacin	Silver nanoparticles	NA	NA	28	(Panáček et al., 2016)
Ciprofloxacin	Silver nanoparticles	NA	NA	5–30	(Naqvi et al., 2013)
Levofloxacin	AuNPs	84.8 ± 2.41	-9.01	58.65 ± 2	(Bagga et al., 2016)

## Discussion

### Comparative performance of production methods and their impact in physical and chemical properties.

Taking into account critical analysis of literature data, a systematic comparison of production methods focused on physical and chemical properties of nanoparticles was performed. This critical analysis is presented below in Table VII.

Table VII – Advantages and disadvantages of the various methods to produce lipid nanoparticles.

Method	Organic Solvents	Advantages	Disadvantages
Microemulsion	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Good polydispersity (PI) and low particle mean size.</li> <li>*Does not require organic solvents</li> <li>*Does not require energy consumption</li> <li>*Easily scalable to industrial production;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Requires high amounts of surfactant agents;</li> <li>*Requirement of water removal in the final dosage form;</li> </ul>
Solvent evaporation technique	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Suitable for thermolabile drugs;</li> <li>*High reproducibility;</li> <li>*Reduced particle size;</li> <li>*Low variation of particle size;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Not suitable for industrial production;</li> <li>*Final product may be contaminated with solvent residuals;</li> </ul>
Solvent injection (SI) procedure	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Fast production;</li> <li>* Does not require specific or sophisticated materials;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Final product may be contaminated with solvent residuals;</li> </ul>
Ultrasonication method	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Fast production;</li> <li>*Does not require specific or sophisticated materials;</li> <li>*Does not require high quantities of surfactants</li> <li>*Does not require organic solvents;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*High amount of energy expenditure;</li> <li>*High polydispersity;</li> <li>*Higher particle sizes;</li> </ul>
HPH	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Reproducible;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Requires high temperatures;</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>*Does not require organic solvents;</li> <li>*Well established method and easily scalable to industrial production;</li> <li>*Homogenous particle distribution;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*High energy demanding;</li> <li>*May degrade thermolabile drugs due to high temperatures and pressure;</li> <li>*Not suitable to hydrophilic drugs;</li> <li>*Migration of the active principle to the water phase can occur;</li> </ul>
--	--	---	--

Production methods comparison reveals that there is no technique assembling all advantages. Still microemulsion, solvent evaporation and HPH outstands when particles' PI and mean size is concerned.

Table VIII – Advantages and disadvantages of various methods of production of polymeric nanoparticles

Method	Organic solvents	Advantages	Disadvantages
Emulsion–solvent evaporation technique	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Easy, fast and economically profitable;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Toxic solvents;</li> <li>*Only applicable to lipo-soluble drugs;</li> <li>*Difficult to apply on industrial settings due to high energy consumption in homogenization;</li> </ul>
Nanoprecipitation	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Reproducible, avoids toxic solvents, easily scalable to industrial production;</li> <li>*Quick and easy to apply – one step method;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Low percentage of polymer in organic phase;</li> </ul>
Ionotropic gelation	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Size and electrical charges of particle can be modified according to the needs;</li> <li>*Avoids toxic solvents</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*May lead to drug losses during preparation;</li> <li>*Unable to control drug releasing profiles;</li> <li>*Bigger particle sizes;</li> </ul>
Coacervation	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Allows changes in physical and chemical properties and releasing profiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Toxic solvents;</li> <li>*Drug degrading in acid settings;</li> </ul>

		<p>according to the ionic polymer ratios;</p> <p>*Simple, low-cost and easily scalable;</p> <p>*Allows the usage of thermo-sensible drugs;</p>	
--	--	--	--

## **Performance outcomes of different formulation and production techniques of lipid nanoparticles**

Bearing in mind that lipid-based particles are theoretically more efficient regarding antibacterial activity, analysis of above-described methods regarding those parameters is relevant.

The chosen lipid for the encapsulation process is one the factors which can mostly influence the antibacterial activity of the final formulation. On the other hand, the encapsulation of very lowly lipophilic drugs can lead to efficiency problems. However, these challenges can be surpassed by formulation adjustments such as selection of the best method and the variation of the chosen lipid and its percentage in the formulation all those upon experimental design.

The usage of cationic lipids enhanced the zeta potential (positive) whilst decreased the minimal inhibitory concentration (MIC) against certain bacterial species. The relationship may be related to the increased interaction between the nanoparticle (positively charged on the surface) and the Gram-negative bacterial wall, which embeds an external membrane with high phospholipid contents (negatively charged). Overall this increased interaction has been responsible for the antibacterial activity of such nanoparticles (Pignatello et al., 2018).

In our laboratory experiments with NLC's (Table IV, Ref. (a)), the lipid with the highest EE for ciprofloxacin was the stearic acid using the microemulsion technique. Such result can be influenced by the chosen surfactant as we can see in table IV.

Solvent evaporation technique allows high encapsulation efficiency as well as small particle sizes when used for levofloxacin encapsulation, whereas the solvent injection technique usually results in bigger particle sizes, in spite of keeping high encapsulation efficiency.

When comparing SLN to NLC properties (shown in tables III and IV) it is possible to understand that the EE greatly increases with the presence of a liquid lipid. However, such benefit is intrinsically associated with lower stability of the nanoparticle and therefore the

encapsulation efficiency may paradoxically decrease if higher percentages of liquid lipid are used.

Regarding the formulation parameters, when comparing the three solid lipids, we observed that the encapsulation efficiency progressively and gradually increases from Gelucire® (Polyethylene glycol monostearate) to Imwitor® (Glyceryl Monostearate) and Precirol® (Glyceryl distearate).

For NLCs, lipid component stearic acid produced higher sized particles. In particles incorporating this component, a decrease in lipid percentage apparently increased EE, an opposite effect to what can be observed in NLCs formulated with Precirol® (Glyceryl distearate).

Regarding the effect of process parameters on particle size an increase in the HPH time did not improve the nanoparticle size and lead to lower EE.

The antibacterial performance of nanoparticles may be due to their lipophilic properties, which enables bacterial membrane to permeation (Gamal, 2017). These phenomena can be explained by the diffusion of lipid molecules in a matrix with similar properties such as the bacterial membrane.

## **Formulation and production variables' impact on polymeric nanoparticle performance**

There are several variables (formulation and production) to control, when developing enhanced performance polymeric particles in order to achieve lower particle sizes and higher encapsulation efficiency.

In the first group it is represented the effect of varying polymer percentage in the formulation, and the results are shown in table V. As we can see, higher amounts of chitosan led to higher EE but it also led to higher particle size.

Another important variable that can influence these parameters is the type of surfactant. Results of the formulations by using poly vinyl alcohol were better when compared to Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer. Among the tested polyesters, we've noticed that the Poly(lactic-co-glycolic acid) seems to present better EE when compared to polycaprolactone.

The methods allowing higher EE for levofloxacin and ciprofloxacin are desolvation, coacervation and ionic gelation, which use oligopeptides and polysaccharides as monomers to produce the nanoparticles. In the comparison between different quinolones, ciprofloxacin has



shown higher encapsulation efficiency than levofloxacin when using the above mentioned techniques.

## Pharmacokinetic advantages of nanoparticles

One of the advantages of using nanoparticle as delivery system is the possibility of modelling the drug delivery profile. Steady drug delivery has been achieved with albumin nanoparticles, gelatine, chitosan and SLN nanoparticles, with the latter being the most promising (Jain e Banerjee, 2008). Other polymeric nanoparticles with PLGA have also shown interesting drug delivery profiles and these polymers are very well taken into consideration when formulating nanoparticles for drug delivery modelling (Bastari et al., 2014).

Prolonged drug delivery profiles have shown effectiveness in the eradication of biofilms (Gupta et al., 2011) and can possibly be very useful in this setting. It is also known that coating of nanoparticles with CaP may mitigate the burst release phenomena (Bastari et al., 2014). Drug delivery systems can improve the efficacy by protecting the drugs from chemical and enzymatic in vivo degradation, while decreasing the number and amount of prescribed doses, potentially decreasing toxicity issues (Jain e Banerjee, 2008).

When it comes to ocular delivery chitosan polymeric nanoparticles have shown great interest because it may solve problems in the administration route and drug clearance. This nanoparticles allow a decrease in drug's clearance and in its drainage through the naso-lacrimal ridge, therefore increasing the time of drug retention and ocular action (Ameeduzzafar et al., 2018). The same effect has been reported in the stearic acid containing SLNs. These nanoparticles are not irritant when delivered by ocular route and they have shown sustained drug delivery, most likely due to their lipophilic nature (Baig et al., 2016).

Table IX – Pharmacokinetic properties analysis on different nanoparticle classes. Adapted from (Choi e Han, 2018)(Lin, Monteiro-Riviere e Riviere, 2015)

Colloidal system type	Pharmacokinetic Advantages	Permeability	Metabolism	Toxicity
Lipidic	*Drug degradation control	*Increased hemato-encephalic permeability	*Fast removal by endoplasmic reticulum	*Low toxicity and immune response

	<p>*Clearance reduction (higher systemic exposure)</p> <p>*Increased Absorption</p>	<p>*Increased transdermal absorption</p>		<p>*Cytotoxicity (surfactants)</p>
Polymeric	<p>* Pegylated particles decrease drug linking to plasma protein</p> <p>*Increased drug stability (in circulation)</p> <p>*Increased duration activity</p> <p>*Increased retention time</p>	<p>Increasing bioavailability (F) in the case of ethylcellulose/casein nanoparticles and PLGA and alginate nanoparticles;</p>	<p>*Requires removal after use (non - degradable polymers)</p>	<p>*Low immune response</p> <p>*Porous biodegradable and non-toxic nanoparticles</p> <p>*Drug accumulation in heart, liver, and kidneys diminished after administration of nanosystems.</p>
Inorganic	<p>* Absorbed fraction may be modulated with coatings and by varying particle size</p> <p>* inorganic metal oxides are stable and safe</p>	<p>*Primarily accumulated in the liver, spleen and lymph nodes. Total body permanency &gt; 6 months</p> <p>*Metallic nanoparticles can surpass the hemato-encephalic barrier. Neuropeptide coatings can enhance this phenomenon.</p>	<p>*Low biliary and renal excretion. Renal excretion may be increased with lower particle sizes (&lt;10nm) and specific coatings (glutathione).</p>	<p>*Organ accumulation is possible</p> <p>* inorganic metal oxides are stable and safe</p>

## Comparative performance of nanoparticles

Different nanoparticles present different properties that can lead to the creation of antibacterial capacities by the activation of distinct mechanisms.

Among the lipid particles, the SLNs are able to encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs, they are biodegradable and non-toxic, being stable against coalescence (Jain e Banerjee, 2008). The SLNs may prevent the crystallization of free drug, therefore decreasing the risk of drug induced nephropathy (Islan et al., 2016). However, the SLN's formulations present an issue with overall drug loss when stored over long periods of time, due to its lipids polymorphic transitioning (Kalam et al., 2010). A way to overcome this issue is by using a different lipid matrix towards the production of NLCs.

The protein-based polymeric nanoparticles (ex. Albumin or gelatine based) or polysaccharides (ex. chitosan) are promising for their biocompatibility, biodegradability and production feasibility (Jain e Banerjee, 2008). Chitosan nanoparticles have shown antibacterial properties mostly in lower particle sized formulations. This property seems to be related to the higher bacterial penetration capacity (Marei et al., 2019). In ocular delivery applications, the polyester polymers have shown to be biodegradable higher protection to drug hydrolysis (Gupta et al., 2011) upon tear dilution, less absorption, short residence time and corneal relative permeability (Kalam et al., 2010).

Zinc oxide metal nanoparticles seem to increase the uptake and accumulation of antibiotic, therefore producing cell membrane damage, as well as generating oxidative stress and furthermore recruiting immune system phagocytes (Ghasemi e Jalal, 2016).

Another metallic nanoparticle widely referenced in the literature for its antibacterial properties are gold nanoparticle. Its activity may mediate an increase in drug penetration, cytoplasmic content loss or direct cytolysis. The silver nanoparticles also get highlighted for their low cellular toxicity when compared to other metallic nanoparticles (Pradeepa et al., 2016).

The silver-containing nanoparticles have several antibacterial mechanisms attributed such as cellular membrane destruction, transport channel blockage (through interaction from cationic particles with the negatively charged surface proteins) and the disruption of cellular activity (protein synthesis and transport), as well as the denaturation of DNA (Naqvi et al., 2013). The silver nanoparticles present as an interesting solution, but there are already some reported resistances through efflux pumps (Panáček et al., 2016).

The use of these metallic nanoparticles with intrinsic antibacterial activity would be an advantage to fight drug resistance pandemics because it combines several cell death mechanisms.

## Conclusion

Nanoparticles are a mean of delivering drug to specific settings, taking advantage of the carrier properties. Several classes of nanoparticles can be distinguished based on its clinical applicability, as well as on its pharmacokinetic, toxicologic and pharmacodynamic properties.

The efficacy, safety and pharmacokinetic profiles can be modulated with different formulation parameters (adequate selection of formulation parameters such as lipid, polymer and surfactants) as well as different production methods (synthesis method, HPH time and lipid fusion temperatures).

Lipid based nanoparticles can be recommended in clinical settings where a sustainable drug delivery is required, improving the efficacy, the drug compliance or the eradication of bacterial biofilms.

Polymeric nanoparticle formulations offer pharmacokinetic advantages such as retention time, being mostly used in ocular infections, where the drug maintenance is crucial for therapeutic success. In this particular case, the increase in ocular permanency and reduced clearance clearly reflect an evident advantage to eradicate the infection.

Regarding the experimental work developed in the laboratory of the University of Coimbra, it was proved the higher performance of the NLCs when compared to SLNs. This differential performance is concerned to physical-chemical properties of the nanoparticles strictly related to formulation parameters. The chosen lipid for the encapsulation process is one the factors which can mostly influence the antibacterial activity of the final formulation. Indeed, these formulations have a small particle size, with high EE, consistent with the existing literature, bringing together two fundamental characteristics to overcome bacterial resistance.

Remains undone the demonstration of antibacterial activity of these formulations. Nevertheless, these formulations are expected to successfully eradicate resistant bacteria with efflux pump mechanisms. These nanoparticles are also effective in the transport and protection of drugs against Beta-lactamases, being able to overcome related resistance's mechanisms.

The immediate benefit of using these therapies is that they allow to overcome bacterial resistances, one of the biggest challenges worldwide in antibiotherapy.

Some of the essential steps in assuring these nanoparticles can reach the clinical settings have already been assured, such as endothelial barrier permeation, circulating time and blood concentration, tissue accumulation as well as the essential phases of metabolism (absorption, distribution and excretion).

Although there is still a long path to be walked in the investigation and improvement of nanoparticle carriers, the future usage of these nanoparticles seems to be a robust hypothesis to help us overcome the critical and urgent problem of antibacterial resistances.

## Bibliography

- A AMEEDUZZAFAR; IMAMB, S. S.; BUKHARIA, S.N.A.; AHMADC, J.; ALI, A. - Formulation and optimization of levofloxacin loaded chitosan nanoparticle for ocular delivery: In-vitro characterization, ocular tolerance and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. ISSN 18790003. Vol. 108 (2018), p. 650–659.
- BAGGA, P.; ANSARI, T.M.; SIDDIQUI, H.H.; SYED, A.; BAHKALI, A. H.; RAHMAN, M.A.; KHAN, M. S. - Bromelain capped gold nanoparticles as the novel drug delivery carriers to aggrandize effect of the antibiotic levofloxacin. **EXCLI journal**. ISSN 1611-2156. Vol. 15 (2016), p. 772–780.
- BAIG, M.S.; AHAD, A.; ASLAM, M.; IMAM, S.S.; AQIL, M.; ALI, A. - Application of Box-Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. ISSN 18790003. Vol. 85 (2016), p. 258-270.
- BASTARI, K.; ARSHATH, M.; NG, Z.H.M.; CHIA, J.H.; YOW, Z. X.D.; SANA, B.; TAN, M.F.C.; LIM, S.; LOO, S.C.J. - A controlled release of antibiotics from calcium phosphate-coated poly(lactic-co-glycolic acid) particles and their in vitro efficacy against *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. . ISSN 15734838. Vol. 25 (2014), p. 747–757.
- BLONDEAU, J.M. - Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**. ISSN 00396257. Vol. 49, n°2 (2004), p. S73–S78.
- CHEOW, W.S.; CHANG, M.W.; HADINOTO, K. - Antibacterial efficacy of inhalable levofloxacin-loaded polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells: The effect of antibiotic release profile. **Pharmaceutical Research**. ISSN 07248741. Vol. 27, n°8 (2010), p. 1597–1609.

- CHOI, Y. H.; HAN, H.K. - Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical Investigation**. ISSN 20936214. Vol. 48, n°1 (2018), p. 43–60.
- DALHOFF, A. - Global fluoroquinolone resistance epidemiology and Implications for clinical use. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2012 ; Article ID 2120734. 9 pages
- EMMERSON, A.M.; JONES, A. - The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. ISSN 18790003.Vol. 51, n°1 (2003), p. 13–20.
- GAMAL, A. S.- Ciprofloxacin Controlled-Solid Lipid Nanoparticles: Characterization, In Vitro Release, and Antibacterial Activity Assessment. **BioMed Research International**, 2017; Article ID 2120734. 9 pages
- GHASEMI, F.; JALAL, R. - Antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles in combination with ciprofloxacin and ceftazidime against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** . ISSN 22137173. Vol. 6 (2016), p. 118–122.
- GIRI, T. K. - Nanoarchitected Polysaccharide-Based Drug Carrier for Ocular Therapeutics. **Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting**. 1st. ed. In Kolkata: Elsevier, 2016. ISBN 9780323477222. p. 119–141.
- GONZÁLEZ, B.; COLILLA, M.; DÍEZ, J.; PEDRAZA, D.; GUEMBE, M.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGÍ, M. - Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment. **Acta Biomaterialia**. ISSN 18787568. Vol. 68 (2018), p. 261–271.
- GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R. K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.
- MITTAL, G. - Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Journal of Drug Targeting**. ISSN 1061186X. Vol. 19 n°6 (2011), p. 409–417.



- HADIYA, S.; LIU, X.; ABD EL-HAMMED, W.; ELSABAHY, M.; ALY, S.A. - Levofloxacin-Loaded Nanoparticles Decrease Emergence of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**. ISSN 1076-6294. Vol. 24, n°8 (2018), p. 1098–1107.
- HAN, C. - Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms. **Nanotechnology Reviews**. ISSN 21919097. Vol 6, n°5 (2017), p. 1–17.
- IRAM, S.; KHAN, J.A.; AMAN, N.; NADHMAN, A.; ZULFIQAR, Z.; YAMEEN, M.A. - Enhancing the anti-enterococci activity of different antibiotics by combining with metal oxide nanoparticles. **Jundishapur Journal of Microbiology**. ISSN 20084161. Vol. 9, n°3 (2016) e31302
- ISLAN, G.A.; TORNELLO, P.C.; ABRAHAM, G.A.; DURAN, N.; CASTRO, G.R. - Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. ISSN 18734367. Vol.143 (2016), p. 168–176.
- JAIN, D.; BANERJEE, R. - Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid, and chitosan nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**. ISSN 15524973. Vol. 86, n°1 (2008), p. 105–12.
- KALAM, M.A.; SULTANA, Y.; ALI, A.; AQIL, M.; MISHRA, A.K.; CHUTTANI, K. - Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**. ISSN 1061186X. Vol. 18, n° 3 (2010), p. 191–204.
- LI, Q.; CAI, T.; HUANG, Y.; XIA, X.; COLE, S.; CAI, Y. - A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNP, and PLN. **Nanomaterials**. Vol. 7, n°6 (2017), 122.

- LIN, Z.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; RIVIERE, J.E. - Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**. ISSN 19390041. Vol. 7, n° 2 (2015), p. 189–217.
- MAREI, N.; ELWAHY, A.H.M.; SALAH, T.A.; EL SHERIF, Y.; EL-SAMIE, E. A. - Enhanced antibacterial activity of Egyptian local insects' chitosan-based nanoparticles loaded with ciprofloxacin-HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**. ISSN 18790003. Vol. 126 (2019), p. 262–272.
- MENDES, M.; SOARES, H.T.; ARNAUT, L.G.; SOUSA, J.J.; PAIS, A.A.C.C.; VITORINO, C. - Can lipid nanoparticles improve intestinal absorption? **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 18733476. Vol. 515, n°1–2 (2016), p. 69–83.
- MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.; MILADI, K. - Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. In. France: PONCHEL, CHRISTINE VAUTHIERGILLES (Ed.) - Springer, Cham, 2016. ISBN 978-1-4614-9163-7. cap II, p. 17–53.
- MUNIR, M.U.; IHSAN, A.; SARWAR, Y.; BAJWA, S.Z.; BANO, K.; TEHSEEN, B.; ZEB, N.; HUSSAIN, I.; ANSARI, M. T.; SAEED, M.; LI, J.; IQBAL, M. Z.; WU, A.; KHAN, W.S. - Hollow mesoporous hydroxyapatite nanostructures; smart nanocarriers with high drug loading and controlled releasing features. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 18733476. Vol. 544, n°1 (2018), p. 112–120.
- NAQVI, S.Z.H.; KIRAN, U.; ALI, M.I.; JAMAL, A.; HAMEED, A.; AHMED, S.; ALI, N. - Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11769114. Vol. 8, n°1 (2013), p. 3187—3195.
- NAZAR, M.F.; SALEEM, M.A.; BAJWA, S.N.; YAMEEN, B.; ASHFAQ, M.; ZAFAR, M.N.; ZUBAIR, M.- Encapsulation of antibiotic levofloxacin in biocompatible microemulsion formulation: Insights from microstructure analysis. **Journal of Physical Chemistry A**. ISSN 15205215. Vol. 121, n°2 (2017), p. 437–443.

- OWENS, R.C.; AMBROSE, P.G. - Clinical use of the fluoroquinolones. **Medical Clinics of North America**. ISSN 00257125. Vol. 84, n°6 (2000), p. 1447–1469.
- PANÁČEK, A.; SMÉKALOVÁ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; BOGDANOVÁ, K.; RÖDEROVÁ, M.; KOLÁŘ, M.; KILIANOVÁ, M.; HRADILOVÁ, Š.; FRONING, J.P.; HAVRDOVÁ, M.; PRUCEK, R.; ZBOŘIL, R.; KVÍTEK, L. - Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. ISSN 18734367. Vol. 142 (2016), p. 392–399.
- PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.C.; KADAM, D.V. - Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. . ISSN 18423582. Vol. 5 (2010), p. 241 – 248.
- PIGNATELLO, R.; LEONARDI, A.; FUOCHI, V.; PETRONIO, G.; GRECO, A.; FURNERI, P. - A Method for Efficient Loading of Ciprofloxacin Hydrochloride in Cationic Solid Lipid Nanoparticles: Formulation and Microbiological Evaluation. **Nanomaterials**. Vol. 8, n°5 (2018), 304.
- PRADEEPA; VIDYA, S.M.; MUTALIK, S.; UDAYA BHAT, K.; HUILGOL, P.; AVADHANI, K.; - Preparation of gold nanoparticles by novel bacterial exopolysaccharide for antibiotic delivery. **Life Sciences**. ISSN 18790631. Vol. 153 (2016), p.171–179.
- SHARMA, N.; JANDAİK, S.; KUMAR, S. - Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: Ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**. ISSN 16782690. Vol. 88, n°3 (2016), p. 1689–1698.
- SOUTO, E.; MÜLLER, R. - Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery. **Nanoparticles for pharmaceutical applications**. In. Germany: J. DOMB, Y. TABATA, M. N. V. RAVI KUMAR, AND S. FARBER (Ed.) - American Scientific Publishers, 2007. ISBN 1588830896. cap. V, p. 103–22.

- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S.C. - Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**. . ISSN 1468-6996. Vol. 11, n°1 (2010), 014104.
- UCHEGBU, I.F. - Solid Lipid Nanoparticles. **Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience**. In. New York : IJEOMA F. UCHEGBU, CHENG, WOEI PING, ANDREAS G. SCHÄTZLEIN, AIKATERINI LALATSA (Ed.) - Springe, 2013. ISBN 9781461491644. cap. I, p. 91–116.
- VENKATESH, N. - Metallic Nanoparticle: A Review. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**. Vol:4, n°2 (2018), p. 3765–3775.
- VITORINO, C.; ALMEIDA, J.; GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, A. J.; SOUSA, J. J.; PAIS, A. A.C.C.; - Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. **Journal of Controlled Release**. ISSN 01683659. Vol. 167, n°3 (2013), p. 301–314.
- WHO - First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. **WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care**. (2009) ISBN 9789241597. cap. I, p. 2–48.

Anexo II - Suplemento à tabela II

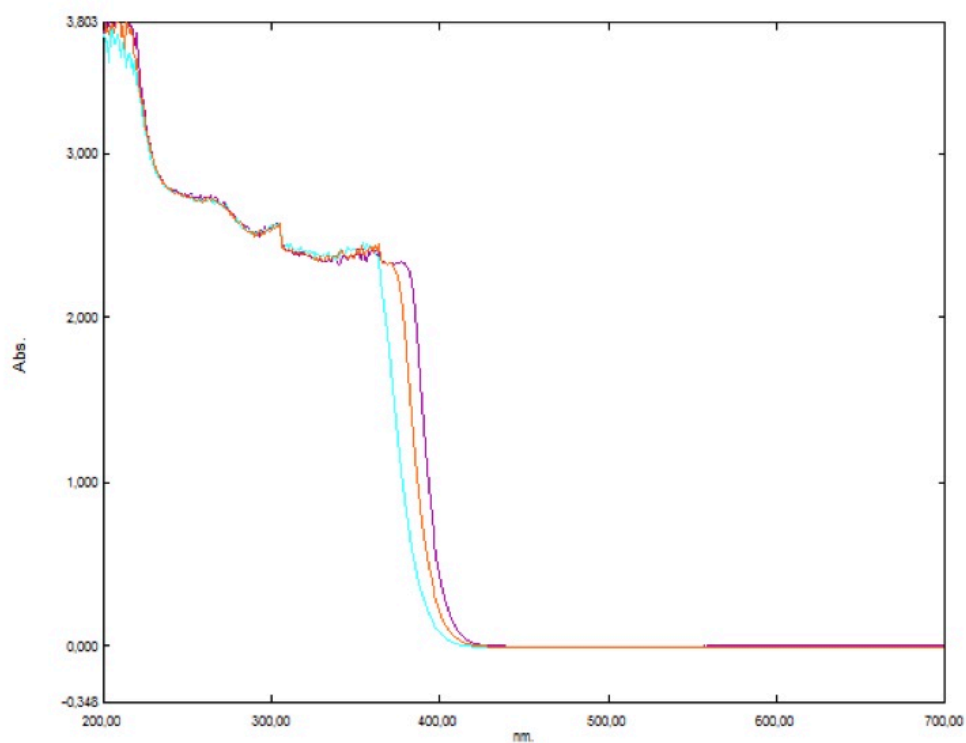


Figure 3- Absorption spectrum of Ciprofloxacin used to achieve EE value on UC's laboratory.

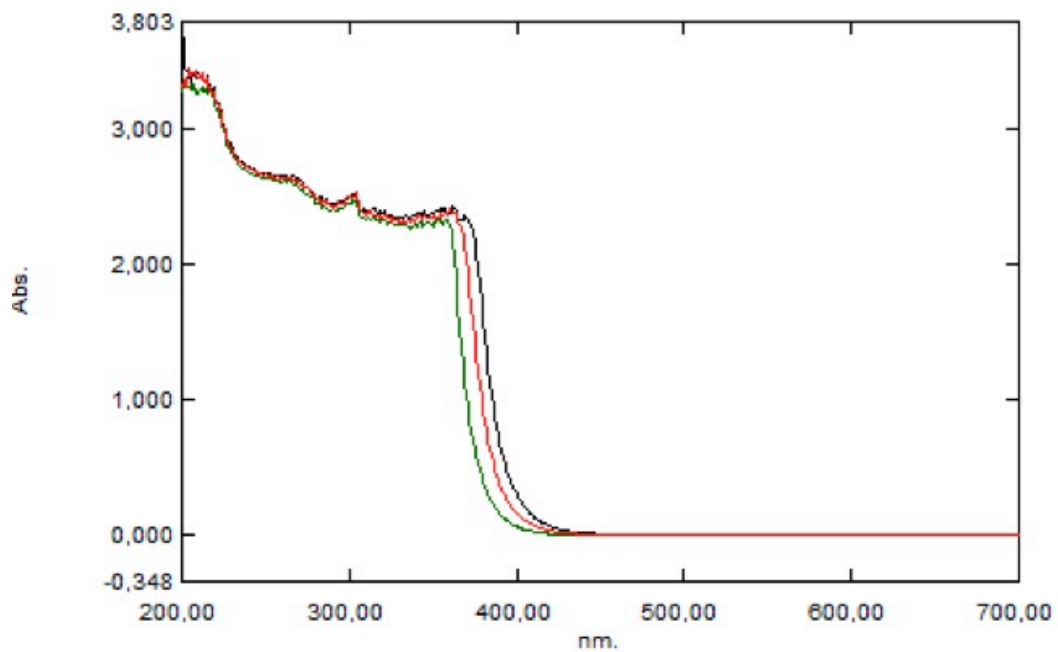


Figure 4 - Absorption spectrum of Levofloxacin used to achieve EE value UC's laboratory.