

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE CEFALOSPORINAS ENCAPSULADAS EM LIPOSSOMAS UNILAMELARES

TORRES, Ieda Maria Sapateiro¹; **Ferreira**, Frederick Vinhal²; **Lima**, Dione Marçal¹; **DINIZ**, Danielle Guimarães Almeida¹; **LIMA**, Eliana Martins³

Palavras-chave: lipossomas, antimicrobianos, concentração inibitória mínima (MIC).

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

A descoberta e a utilização de fármacos antimicrobianos na medicina humana e veterinária contribuíram de forma decisiva para a diminuição de taxas de morbidade e mortalidade das doenças infecciosas, especialmente bacterianas. Todavia, uma das conseqüências mais importantes do uso indiscriminado de antibióticos têm sido a crescente emergência e seleção de microrganismos resistentes. Neste sentido, o conhecimento e o controle da resistência bacteriana tornam-se essenciais para a administração mais racional e coordenada de antibióticos (Silva, 2002). Um dado antibiótico deve satisfazer diversos critérios de seleção para sua ótima atividade, incluindo entrada, retenção, distribuição subcelular, expressão da atividade nos compartimentos infectados, susceptibilidade da bactéria nos sítios de infecção com atenção para a sua fase de crescimento. Pobre penetração dentro das células e diminuição da atividade intracelular são as maiores razões para a limitada atividade da maioria dos antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos) em infecções intracelulares (Silverstein, Kabbash, 1994).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista Gram-negativo, causador de sérias infecções nosocomias, incluindo fibrose cística (Drulis-Kawa, *et al.*, 2006). Como um microrganismo oportunista, *P. aeruginosa* exibe vários mecanismos de resistência aos antibióticos, incluindo inativação enzimática, alteração do sítio alvo e sistemas de efluxo aos antibióticos. Contudo, a baixa permeabilidade da membrana externa da *Pseudomonas aeruginosa* é o maior fator que contribui para a resistência aos antibióticos. (Mugabe, *et al.*, 2006).

No caso de cepas resistentes devido à baixa permeabilidade, várias formulações de fármacos em lipossomas foram desenvolvidos para aumentar a eficácia dos antibióticos. As formas lipossomais promovem uma efetiva interação entre a bactéria e o fármaco, aumentando o tempo de vida do antibiótico encapsulado, e reduzida absorção sistêmica (Drulis-Kawa, *et al.*, 2006).

Lipossomas e nanopartículas são os principais carregadores desenvolvidos para estas estratégias de liberação do fármaco em seu alvo. A encapsulação de fármacos em lipossomas pode ainda reduzir sua toxicidade aguda e resultar em um aumento da eficácia devido à sua habilidade de acumular-se no sítio da doença. Potência aumentada de antibióticos pode ocorrer como conseqüência do natural *clearance* de lipossomas a partir das células fagocíticas, as quais são freqüentemente o sítio onde os patógenos intracelulares se localizam (Maurer *et al.*, 1998). As várias preparações terapêuticas dos lipossomas têm mostrado resultados positivos, destacando-se a terapia antimicrobiana de infecção por vírus, bactérias e protozoários; terapia

genética; terapia de reposição de enzimas em disfunções metabólicas hereditárias, terapias de reposição hormonal, desintoxicação de tecidos com depósitos metálicos, tratamentos oftálmicos e dermatológicos, substituto de sangue em emergências, vacinas, etc (Gregoriadis, 1995; Sapra, Allen, 2003). O objetivo deste trabalho foi produzir uma forma farmacêutica estável de fármacos antimicrobianos em lipossomas, estabelecendo uma metodologia para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), sensível e validada às formas farmacêuticas a serem analisadas e submeter as formas farmacêuticas aos métodos acima, frente aos microrganismos previamente definidos como sensíveis aos fármacos em análise.

2. METODOLOGIA

2.1 - Preparação dos Lipossomas: Os lipossomas foram preparados a partir de uma mistura do fosfolípídeo fosfatidilcolina (PC), colesterol e alfa-tocoferol em proporções de 4:1:0,05 (outras proporções foram avaliadas para otimizar a encapsulação dos fármacos antimicrobianos). As etapas de preparação consistiram em: formação, hidratação e dispersão do filme lipídico (Vemuri, Rhodes, 1995; Lima, 1998).

2.2 – Determinação do diâmetro dos lipossomas: O diâmetro dos lipossomas foi determinado pela técnica de espalhamento de luz, utilizando-se o equipamento ZetaSizer Nano, Marca Malvern Instruments, UK, Modelo Zeni 600.

2.3 - Separação do Fármaco Livre: A separação do fármaco não encapsulado nos lipossomas foi efetuada por cromatografia de exclusão ou filtração em gel. Foi utilizada uma coluna de vidro de 25 cm x 1 cm de diâmetro interno, empacotada com 5g de Sephadex G50.

2.4 - Determinação Quantitativa do Fármaco Encapsulado nos Lipossomas: Esta etapa consistiu na ruptura dos lipossomas para que o fármaco encapsulado fosse liberado na solução. Esta ruptura foi feita com etanol, sendo adicionado 2 mL do álcool para cada 1 mL da preparação dos lipossomas, com posterior homogeneização. A solução obtida foi levada ao espectrofotômetro CARY 50 UV e a absorbância lida em seu comprimento de onda máximo, sendo de 254nm para ceftazidima e 255 nm para a cefepima.

2.5 - Testes de estabilidade (extravasamento do fármaco encapsulado): serão realizadas nas temperaturas de 4°C e 30°C, a intervalos iniciais de 24 em 24 horas,:

2.6 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC): As amostras a serem testadas são o Fármaco encapsulado em lipossomas, Fármaco livre, e Lipossomas brancos (sem fármaco), e serão realizadas de acordo com as normas descritas na NCCLS M07-A5 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Fifth Edition).

3. RESULTADOS PARCIAIS

3.1 – Preparação dos lipossomas: os lipossomas foram preparados com uma mistura de Fosfatidilcolina, Colesterol e Alfa-tocoferol, nas proporções molares de 4:1:0,05 e 4:2:0,05 pelo método de hidratação do filme lipídico, onde a hidratação foi realizada com solução salina acrescida de ceftazidima, na concentração de 2,4 mg/mL, verificando a otimização de encapsulação do fármaco. Os resultados são mostrados na Tabela 1. Os lipossomas com cefepima foram preparados também com uma mistura de Fosfatidilcolina, Colesterol e Alfa-tocoferol, na proporção molar de 4:2:0,05 pelo método de hidratação do filme lipídico, onde a hidratação foi realizada com solução salina acrescida de cefepima, na concentração de 100

mg/mL, sendo os resultados mostrados na tabela 2. Os resultados dos lipossomas com ceftazidima indicam que o aumento de colesterol não produziu significativo aumento da percentagem de encapsulação do fármaco. Estudos adicionais estão sendo realizados para verificar se o aumento da quantidade de colesterol produz uma maior estabilidade quanto ao extravasamento do fármaco através da membrana fosfolipídica. O fato dos lipossomas de cefepime apresentarem uma menor percentagem de encapsulação em relação ao fármaco total adicionado, deve-se à quantidade do fármaco adicionado durante a fase de hidratação do filme lipídico, uma vez que durante o desenvolvimento do mesmo, a maior quantidade encapsulada deu-se com a concentração de 100mg/mL.

Tabela1: Caracterização da encapsulação de ceftazidima em lipossomas.

Composição do Lipossoma (Fosfatidilcolina/Colesterol/Alfa-tocoferol/ceftazidima 2,4mg/mL)	Encapsulação em relação ao fármaco total adicionado(%)	Relação Fármaco (mg)/Fosfolipídio (mg)	Tamanho da Vesícula (nm)
4:1:0,05	8,28%	1,59/240	105nm
4:2:0,05	7,86%	1,51/240	124nm

Tabela 2: Caracterização da encapsulação de cefepime em lipossomas.

Composição do Lipossoma (Fosfatidilcolina/Colesterol/Alfa-tocoferol/cefepime 100mg/mL)	Encapsulação em relação ao fármaco total adicionado (%)	Relação Fármaco (mg)/Fosfolipídio (mg)	Tamanho da Vesícula (nm)
4:2:0,05	1,53%	7,9340/240	138 nm

3.2. – Determinação do diâmetro dos lipossomas: A figura 1 e 2 representa a distribuição das populações lipossomais expressa pela medida de intensidade do espalhamento de luz em relação ao diâmetro das vesículas submetidas a diferentes tempos de sonicação. Estes dados permitem observar que com 3 minutos de sonicação as amostras apresentam-se distribuídas em diferentes populações, com predomínio de estruturas com elevado tamanho (lipossomas e fragmentos de bicamada). Entretanto, no decorrer do tempo de sonicação, a amostra se apresenta mais homogênea e com vesículas de menor diâmetro.

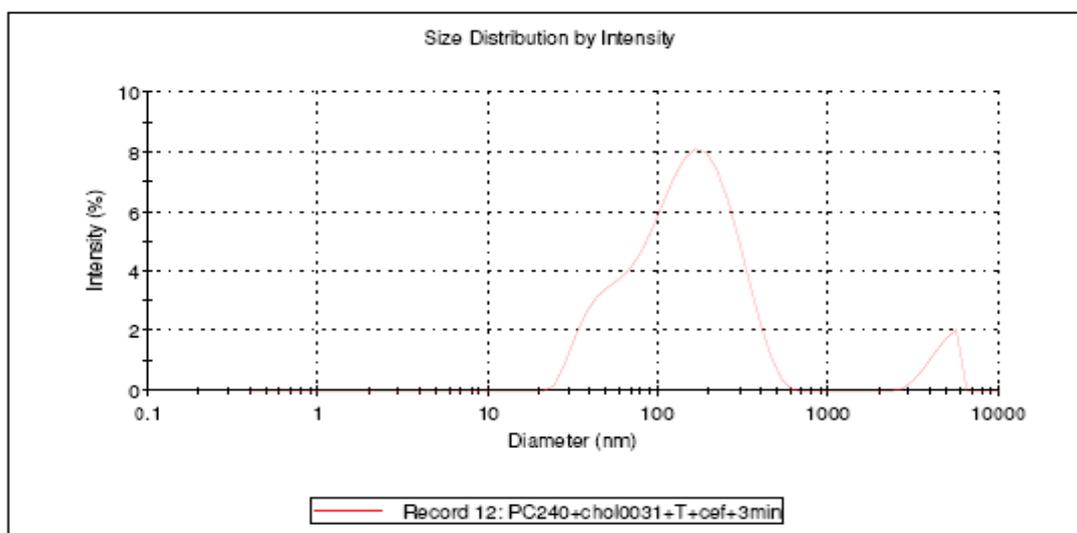


Figura 1: Distribuição do diâmetro dos lipossomas com 3 min de sonicação.

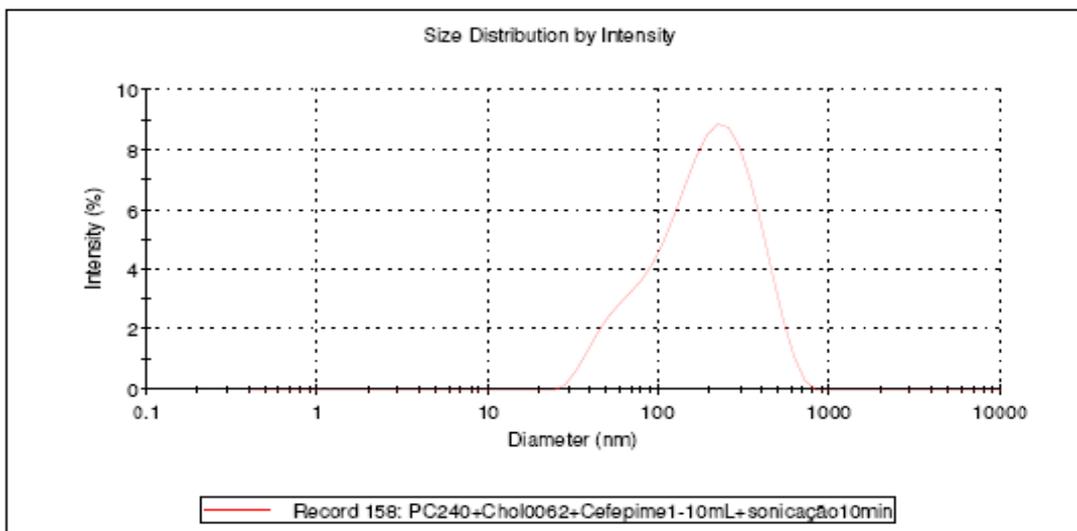


Figura 2: Distribuição do diâmetro dos lipossomas com 10 minutos de sonicação

3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC): o antimicrobiano ceftazidima foi preparado nas concentrações de 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 μ g/mL a partir de uma solução estoque com 5120 μ g/mL. Um mL das concentrações acima foi adicionado a um tubo de ensaio e a cada diluição foi acrescentado 1 mL do inoculo de *Pseudomonas aeruginosa*, onde sua turbidez foi previamente ajustada a de uma solução de Mc Farland de 0,5. A concentração inibitória mínima encontrada para a *Pseudomonas aeruginosa* foi de 8 μ g/mL.

4. PERSPECTIVAS

Os problemas mais comuns que limitam o uso de antibióticos são muitas vezes os efeitos colaterais e o aumento da resistência bacteriana. Tem sido demonstrado que a encapsulação de fármacos dentro de lipossomas, promove uma efetiva interação entre a bactéria e o antimicrobiano, promovendo um aumento do tempo de vida do antibiótico encapsulado e reduzida absorção sistêmica. Um sistema que reduz a toxicidade do fármaco, enquanto aumenta seu índice terapêutico é de grande interesse, e lipossomas podem providenciar estes benefícios. O projeto proposto vem ao encontro da necessidade do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para agentes antimicrobianos de ação comprovada, com a intenção de melhorar a terapêutica através de uma possível diminuição da dose e de uma melhor ação antimicrobiana contra os agentes patogênicos, melhorando assim as opções de terapêutica disponíveis e com impacto positivo sobre a saúde pública.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DRULIS-KAWA, Z.; GUBERNATOR, J.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; DOROSZKIEWICZ, W.; KOZUBEK, A. In vitro antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 315, p. 59-66, 2006.
- GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech December*, v.13, p.527-537, 1995.

LIMA, E. M. Estudos da encapsulação do diclofenaco sódico em lipossomas unilamelares e avaliação da toxicidade tissular após a administração intramuscular. São Paulo. P.233,1998. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas –USP).

MAURER, N., WONG, K. F., HOPE, M. J., CULLIS, P. R. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes : a ¹H-NMR study. *Bioch. Et Bioph. Acta*, v. 1374, p.9-20, 1998.

MUGABE, C., HALWANI, M., AZGHANI, A. O., LAFRENIE, R. M., OMRI, A. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped aminoglycosides against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, June, p.2016-2022, 2006.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targetted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*. v.42, p.439-462,2003.

SILVA, P. , Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1374p.

SILVERSTEIN, S.C., KABBASH, C. Penetration, retention, intracellular localization, and antimicrobial activity of antibiotics within phagocytes. *Curr. Opin. Hematol.* v.1, p.85-91, 1994.

VEMURI, SRIRAM.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv*, v.70, p.95-111,1995.

FINANCIAMENTO – CAPES, FINEP

¹Doutoranda em Ciências da Saúde (UFG/UnB/UFMS). iedamst@terra.com.br

² Acadêmico de Farmácia, Voluntário do Programa de Iniciação Científica UFG

³ Orientadora. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, F. Farmácia – UFG. emlima@farmacia.ufg.br