



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

TORRES, Ieda Maria Sapateiro¹; Lima, Eliana Martins²

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

1. INTRODUÇÃO

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 tem 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 tem que satisfazer muitos 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). Uma alternativa apropriada para a clássica distribuição de terapia antimicrobiana consiste na associação do fármaco em um carregador submicroscópico e assim deste modo escondendo e protegendo a molécula da degradação e entregando-a para seu alvo celular inacessível, de uma maneira controlada. 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 pode 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, WONG, HOPE, CULLIS, 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 é 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 serão preparados a partir de uma mistura do fosfolípídeo fosfatidilcolina (PC), colesterol e alfa-tocoferol em proporções de 4:1:0,05 (outras proporções serão avaliadas para otimizar a encapsulação dos fármacos antimicrobianos). As etapas de preparação consistirão em: formação, hidratação e dispersão do filme lipídico (VEMURI, RHODES, 1995; LIMA, 1995).

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

2.3 - Determinação Quantitativa do Fármaco Encapsulado nos Lipossomas: Esta etapa consistirá na ruptura dos lipossomas para que o fármaco encapsulado seja liberado na solução. Esta ruptura será feita com etanol ou tensoativo, sendo adicionado 5 mL do agente adequado para cada 1 mL da preparação dos lipossomas, com posterior homogeneização. A solução obtida será levada ao espectrofotômetro CARY 50 UV e a absorbância lida em seu comprimento de onda máximo, de acordo com as especificações das monografias oficiais dos fármacos utilizados.

2.4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC): As amostras a serem testadas serão o Fármaco encapsulado em lipossomas, Fármaco livre, e Lipossoma sem o 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 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. Esses resultados 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.

Tabela1: Caracterização da encapsulação de ceftazidima em lipossomas.

Composição do Lipossoma (Fosfatidilcolina/Colesterol/Alfa-tocoferol/ceftazidima 2,4mg/mL)	Encapsulação (%)	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

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, devido às suas propriedades de direcionamento intracelular dos fármacos, aumenta a eficácia do fármaco ao mesmo tempo em que reduz sua toxicidade. 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

- 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, 1998. 233 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 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.
- SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targetted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*. v.42, p.439-462, 2003.
- SILVA, P. , *Farmacologia*. 6. 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, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv*, v.70, p.95-111, 1995.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq – FINEP

¹Aluna de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio UNB/UFG/UFMS, iedamst@terra.com.br

²Orientadora/Lab. Tecnologia Farmacêutica/Faculdade de Farmácia/UFG, emlima@farmacia.ufg.br