

**Universidade de Brasília**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**  
**UnB – UFG – UFMS**

**CEFTAZIDIMA E CEFEPIMA ENCAPSULADAS EM  
LIPOSSOMAS UNILAMELARES: OBTENÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *in vitro* CONTRA *Pseudomonas  
aeruginosa* ATCC 27853.**

Tese apresentada ao programa de  
Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, Rede Centro-Oeste, Convênio  
UnB-UFG-UFMS como exigência para  
obtenção de título de Doutor.

**Ieda Maria Sapateiro Torres**

Orientadora:  
Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Goiânia  
2008

**IEDA MARIA SAPATEIRO TORRES**

**CEFTAZIDIMA E CEFEPIMA ENCAPSULADAS EM LIPOSSOMAS  
UNILAMELARES: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* CONTRA *Pseudomonas  
aeruginosa* ATCC 27853.**

Tese defendida no Curso de Doutorado em Ciências da Saúde, Rede Centro-Oeste, Convênio UnB, UFG, UFMS como exigência para a obtenção do título de Doutor, aprovada em 08 de fevereiro de 2008, pela Banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

---

Dra. Eliana Martins Lima  
Presidente  
Faculdade de Farmácia/UFG

---

Dra. Regina Maria Bringel Martins  
Membro  
IPTSP/UFG

---

Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Membro  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP

---

Maria José Vieira Fonseca  
Membro  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

---

Maria Teresa Freitas Bara  
Membro  
Faculdade de Farmácia/UFG

---

Clévia Ferreira Duarte Garrote  
Suplente  
Faculdade de Farmácia/UFG

*Aos meus pais, Francisco e Laura, pelo amor incondicional e por me ensinarem ter paciência, dignidade e força de vontade para atingir os meus objetivos. Obrigada pelo carinho, confiança, e por tudo que fizeram por mim.*

*Ao Fábio, pelo amor, dedicação, companheirismo e apoio em todos os momentos.*

*À minha filha Gabriela, fonte de muito amor, carinho, esperança e alegrias.*

*Agradeço a Deus, por vocês existirem e fazerem parte da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Martins Lima, pela amizade, incentivo e confiança em meu trabalho.

A meus amigos e colegas de Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Ana Lúcia, Danielle, Dione, Érika, Fabrícia, Carina, Rodinelli, Frederick, Fernanda, Taís, Rodinelli, Patrícia e Luciana, pelo companheirismo em todos os momentos.

À diretora da Faculdade de Farmácia, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clévia Ferreira Duarte Garrote, pelo apoio, amizade e incentivo, principalmente nos momentos difíceis.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Bringel Martins e Dr<sup>a</sup>. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa, pelas valiosas sugestões e pela atenção dispensada na qualificação desta tese.

Ao Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini pelo apoio, incentivo e pelas dúvidas esclarecidas.

À Waleska Fernanda Ferreira Morgado pela amizade, apoio e compreensão.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia, pela confiança e incentivo durante esta caminhada.

À D. Clélia Froes Camarano, pela valiosa colaboração na realização das análises laboratoriais.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Dr<sup>a</sup>. Maria José Vieira Fonseca, Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Bringel Martins, Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Freitas Bara e Dr<sup>a</sup>. Clévia Ferreira Duarte Garrote, pela atenção e disponibilidade dispensada na defesa deste trabalho

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo oportunista e tem a capacidade de responder a uma variedade de mudanças ambientais, apresentando alta resistência intrínseca a numerosos agentes antimicrobianos. Cefalosporinas, especialmente ceftazidima e cefepima são efetivas contra *Pseudomonas aeruginosa*, contudo sua intensa resistência tem limitado o uso desses antimicrobianos. Uma estratégia utilizada para evitar este problema é encapsular esses antimicrobianos em lipossomas unilamelares. Neste estudo, foi comparada a capacidade inibitória de ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas com a dos antibióticos na forma livre, contra a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Foram determinados diâmetro, eficiência de encapsulação, estabilidade dos lipossomas e concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos na forma livre e encapsulada. A concentração bactericida mínima (CBM) da ceftazidima e cefepima livre e encapsuladas em lipossomas unilamelares foram determinadas a 1, 2 ou 4 vezes o CIM. O diâmetro médio dos lipossomas foi de 131,88 nm, com eficiência de encapsulação da cefepima e ceftazidima de 2,29 % e 5,77 %, respectivamente. A CIM da ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas foi 50% inferior àquela do fármaco livre. Ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas foram mais eficientes quanto ao efeito bactericida sobre a *Pseudomonas aeruginosa*, não havendo recuperação microbiana após 24 horas de incubação. Isto demonstra o potencial destes sistemas transportadores de fármacos para contribuir na redução do aparecimento de resistência bacteriana a estes antibióticos.

Palavras Chave: lipossomas, ceftazidima, cefepima, *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic microorganism which is able to respond to a large variety of environmental changes and exhibits intrinsic resistance to several antimicrobial agents. Cephalosporins, particularly ceftazidime and cefepime are effective against *Pseudomonas aeruginosa*, however, its increasing resistance has limited the usage of these antibiotics. Encapsulating antimicrobial drugs into unilamellar liposomes is an approach that has been investigated in order to overcome microorganism resistance. In this study, antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was investigated and compared to that of the free drugs. Liposomal characterization included diameter, encapsulation efficiency and stability. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined for free and liposomal forms of both drugs. Minimal bactericidal concentration (MBC) was determined at concentrations 1, 2 and 4 times the MIC. Liposome average diameter was 131.88 nm and encapsulation efficiency for cefepime and ceftazidime were 2.29% e 5.77%, respectively. MIC for liposomal antibiotics was 50% lower than that for the free drugs. Liposomal ceftazidime and cefepime exhibited a more efficient bactericidal effect over *Pseudomonas aeruginosa*, with no microbial regrowth within 24 hours of incubation. This demonstrates the ability of these drug delivery systems in contributing for the reduction of the development of bacterial resistance.

Keywords: liposomes, ceftazidime, cefepime, *Pseudomonas aeruginosa*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lipossomas podem encapsular e transportar substâncias solúveis em água em sua cavidade hidrofílica e substâncias solúveis em óleo em sua cavidade hidrofóbica.....	28
Figura 2: Fosfatidilcolina - representações esquemáticas, fórmula estrutural e arranjo espacial .....	32
Figura 3: Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV).....	35
Figura 4: Representação da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico.....	37
Figura 5: Cromatografia por exclusão.....	40
Figura 6: Fórmula estrutural da ceftazidima.....	53
Figura 7: Fórmula estrutural da cefepima.....	54
Figura 8: Padronização da suspensão bacteriana da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	61
Figura 9: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 2, 3 e 4 minutos de sonicação.....	68
Figura 10: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 5, 6 e 7 minutos de sonicação.....	69
Figura 11: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 8, 9 e 10 minutos de sonicação.....	69
Figura 12: Perfil de formação de lipossomas pela técnica de espalhamento de luz frente ao tempo de sonicação: tamanho dos lipossomas e polidispersibilidade.....	71
Figura 13: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco com 10 minutos de sonicação pós-coluna de cromatografia por exclusão.....	72
Figura 14: Varredura do espectro de absorção da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS na região do ultravioleta.....	73
Figura 15: Curva de calibração da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS em NaCl a 0,9% por espectrofotometria.....	74
Figura 16: Cromatograma da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS .....	75

Figura 17: Curva de calibração da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS em NaCl a 0,9% por CLAE.....	76
Figura 18: Varredura do espectro de absorção da cefepima padrão USP na região do ultravioleta.....	77
Figura 19: Curva de calibração da cefepima padrão USP em NaCl a 0,9% por espectrofotometria.....	78
Figura 20: Cromatograma da cefepima padrão USP.....	79
Figura 21: Curva de calibração da cefepima padrão USP em NaCl a 0,9% por CLAE.....	80
Figura 22: Perfil de eluição dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 410 nm.....	81
Figura 23: Perfil de eluição em Sephadex G-50 das frações de lipossomas contendo a ceftazidima encapsulada (7-11) e livre (22-26).....	82
Figura 24: Perfil de eluição em Sephadex G-50 das frações de lipossomas contendo a cefepima encapsulada (7-11) e livre (20-24).....	82
Figura 25: Intensidade de espalhamento de luz de lipossomas de ceftazidima pela técnica de espalhamento de luz.....	83
Figura 26: Intensidade de espalhamento de luz de lipossomas de cefepima pela técnica de espalhamento de luz.....	84
Figura 27: Cromatogramas da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS (vermelho) e da ceftazidima encapsulada em lipossomas (preto).....	91
Figura 28: Cromatogramas da cefepima padrão USP e da cefepima encapsulada em lipossomas.....	92
Figura 29: Concentração inibitória mínima da ceftazidima Livre.....	94
Figura 30: Concentração inibitória mínima da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares.....	95
Figura 31: Perfil da redução de microrganismos frente a diferentes concentrações da ceftazidima livre e encapsulada em lipossomas unilamelares a diferentes tempos de incubação.....	102
Figura 32: Perfil da redução de microrganismos frente a diferentes concentrações da cefepima livre e encapsulada em lipossomas unilamelares a diferentes tempos de incubação.....	104



Figura 33: Halos de inibição do crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente à ceftazidima (a) e cefepima (b) na sua forma livre.....	107
Figura 34: Halos de inibição do crescimento bacteriano da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente à cefepima (a) e ceftazidima (b) encapsuladas em lipossomas unilamelares.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil da concentração da ceftazidima utilizada na preparação dos lipossomas (PC fosfatidilcolina de soja).....	56
Tabela 2: Perfil da concentração da cefepima utilizada na preparação dos lipossomas (PC fosfatidilcolina de soja).....	56
Tabela 3: Parâmetros da padronização da suspensão bacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	60
Tabela 4: Perfil do tamanho dos lipossomas pela técnica de espalhamento de luz.....	70
Tabela 5: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 10 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação; Ceftaz <sub>A</sub> – ceftazidima adicionada à preparação; Ceftaz <sub>E</sub> – ceftazidima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo).....	86
Tabela 6: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação; Ceftaz <sub>A</sub> – ceftazidima adicionada à preparação; Ceftaz <sub>E</sub> – ceftazidima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo).....	87
Tabela 7: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da cefepima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação; Cefep <sub>A</sub> – cefepima adicionada à preparação; Cefep <sub>E</sub> – cefepima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo).....	88
Tabela 8: Parâmetros da estabilidade (perda do fármaco encapsulado) dos lipossomas de ceftazidima constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e 10 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e sonicados por 10 minutos (Ceftaz <sub>dE</sub> – ceftazidima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; ndf – não detectado fármaco).....	90

Tabela 9: Parâmetros da estabilidade (perda do fármaco encapsulado) dos lipossomas de cefepima constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e 10 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e sonicados por 10 minutos (Cefep <sub>E</sub> – cefepima encapsulada; PDI – polidispersibilidade.; ndf – não detectado fármaco).....	90
Tabela 10: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8,16 e 32 µg/mL de ceftazidima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação.....	99
Tabela 11: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8,16 e 32 µg/mL de cefepima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação.....	100
Tabela 12: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL da ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação.....	102
Tabela 13: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação.....	103
Tabela 14: Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente à ceftazidima e cefepima livres nas concentrações de 30, 15 e 8 µg/0,2 mL (Ceftaz. = Ceftazidima; Cefep. = Cefepima).....	107
Tabela 15: Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente à ceftazidima e cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares nas concentrações de 30, 15, 8 e 4 µg/0,2 mL (Lipos. Ceftaz = Lipossoma com Ceftazidima; Lipos. Cefep. = Lipossoma com Cefepima; nhi = não houve inibição).....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7- ACA	- Ácido 7-aminocefalosporâmico
Abs	- Absorbância
CBM	- Concentração bactericida mínima
CC	- <i>Clearance de creatinina</i>
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DLS	- <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMPC	- 1,2-dimiristoyl-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPC	- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPC	- 1,2-distearoil- sn-glicero-3-fosfatidilcolina
EC	- Eficiência de encapsulação
EIV	- Vesículas de injeção em éter
IV	- Intravenosa
LUV	- Vesículas unilamelares grandes
MLV	- Vesículas multilamelares grandes
NCCLS	- <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OprM	- Porina da membrana externa
PBPs	- Proteínas ligadoras de penicilinas
PC	- Fosfatidilcolina
PCS	- <i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PDI	- Polidispersibilidade
Ph. Eur. CRS	- <i>European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance</i>

QELS	- <i>Quase Elastic Light Scattering</i>
RES	- Sistema Retículo Endotelial
SEC	- <i>Size Exclusion Chromatography</i>
SUV	- Vesículas unilamelares pequenas
Tc	- Temperatura de transição
UFC	- Unidades formadoras de colônias
ULV	- Vesículas unilamelares grandes
USP	- <i>United States Pharmacopeia</i>
UV-VIS	- Ultravioleta - Visível

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e resistência aos antimicrobianos.....	23
2.2. Lipossomas.....	27
2.2.1. Composição dos lipossomas.....	31
2.2.2. Classificação dos lipossomas.....	33
2.2.3. Mecanismos de formação dos lipossomas.....	34
2.2.3.1. Hidratação do filme lipídico (HFL).....	36
2.2.3.2. Determinação do diâmetro dos lipossomas.....	37
2.2.3.2.1. Espalhamento de luz (light scattering).....	38
2.2.3.3. Separação do fármaco encapsulado.....	39
2.3. Cefalosporinas.....	42
2.3.1. Histórico.....	42
2.3.2. Classificação das cefalosporinas.....	43
2.3.3. Cefalosporinas com ação contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
2.3.4. Mecanismo de ação.....	47
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	50
3.1. Gerais.....	50
3.2. Específicos.....	50
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	51
4.1. Material.....	51
4.1.1. Substâncias e reagentes.....	51
4.1.2. Equipamentos.....	51
4.1.3. Vidrarias e utensílios diversos.....	52

4.2. Substâncias teste.....	53
4.2.1. Antimicrobianos.....	53
4.2.2. Padrões primários.....	54
4.3. Métodos.....	55
4.3.1. Preparação do filme lipídico.....	55
4.3.2. Preparação de lipossomas com ceftazidima e cefepima (Bangham et al., 1965).....	55
4.3.3. Medida do diâmetro dos lipossomas.....	56
4.3.4. Determinação dos parâmetros analíticos para a ceftazidima e cefepima.....	57
4.3.4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da ceftazidima e cefepima por espectrofotometria.....	57
4.3.4.2. Determinação da curva de calibração da ceftazidima e da cefepima por espectrofotometria.....	57
4.3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	57
4.3.4.4. Determinação da curva de calibração da ceftazidima e da cefepima por CLAE.....	58
4.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação da ceftazidima e da cefepima em lipossomas unilamelares.....	58
4.3.5.1. Separação do fármaco livre.....	58
4.3.5.2. Cálculo da eficiência de encapsulação.....	58
4.3.6. Estudo da estabilidade das preparações de ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas.....	59
4.3.6.1. Perda do fármaco encapsulado (vazamento) durante o armazenamento.....	59
4.3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (RUKHOLM et al., 2006).....	60
4.3.7.1. Preparação do inóculo.....	60
4.3.7.2. Padronização do inóculo.....	60

4.3.7.3. Preparo dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima.....	62
4.3.7.4. Preparo dos lipossomas de ceftazidima e cefepima para o ensaio microbiológico.....	62
4.3.7.5. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de macrodiluição em caldo.....	62
4.3.7.6. Determinação da concentração inibitória mínima dos lipossomas unilamelares encapsulados com ceftazidima e cefepima pelo teste de macrodiluição em caldo.....	63
4.3.7.7. Incubação dos tubos e interpretação dos resultados.....	63
4.3.8. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) (RUKHOLM et al., 2006).....	63
4.3.8.1. Preparação do inóculo.....	63
4.3.8.2. Padronização do inóculo.....	63
4.3.8.3. Preparo dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima.....	64
4.3.8.4. Preparo dos lipossomas de ceftazidima e cefepima para o ensaio microbiológico.....	64
4.3.8.5. Determinação da concentração bactericida mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de macrodiluição em caldo.....	64
4.3.8.6. Determinação da concentração bactericida mínima dos lipossomas unilamelares encapsulados com ceftazidima e cefepima pelo teste de macrodiluição em caldo.....	65
4.3.8.7. Incubação dos tubos de interpretação dos resultados.....	65
4.3.9. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de difusão em agar.....	65
4.3.9.1. Preparação do inóculo.....	65
4.3.9.2. Padronização do inóculo.....	66
4.3.9.3. Preparação do ágar Mueller-Hinton.....	66
4.3.9.4. Inoculação das placas de teste.....	66
4.3.9.5. Aplicação dos cilindros de inox com os antimicrobianos livres e encapsulados em lipossomas unilamelares.....	66



4.3.9.6. Incubação das placas e interpretação dos resultados.....	67
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1. Obtenção dos lipossomas.....	68
5.2. Determinação da eficiência de encapsulação da ceftazidima e cefepima em lipossomas unilamelares.....	72
5.2.1. Determinação dos parâmetros analíticos para a ceftazidima.....	72
5.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da ceftazidima por espectrofotometria.....	72
5.2.1.2. Determinação da curva de calibração da ceftazidima por espectrofotometria.....	73
5.2.1.3. Determinação da curva de calibração da ceftazidima por CLAE.....	74
5.2.2. Determinação dos parâmetros analíticos para a cefepima.....	76
5.2.2.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da cefepima por espectrofotometria.....	76
5.2.2.2. Determinação da curva de calibração da cefepima por espectrofotometria.....	77
5.2.2.3. Determinação da curva de calibração da cefepima por CLAE.....	78
5.3. Separação do fármaco livre.....	80
5.4. Cálculo da eficiência de encapsulação.....	84
5.5. Estudo da estabilidade das preparações de ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares.....	89
5.5.1. Perda do fármaco encapsulado – vazamento durante o armazenamento.....	89
5.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	93
5.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres.....	93
5.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares.....	94

5.7. Determinação da concentração bactericida mínima.....	98
5.7.1. Determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e cefepima Livres.....	98
5.7.2. Determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares.....	100
5.8. Determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e cefepima livres e encapsuladas em lipossomas unilamelares pelo teste de difusão em agar.....	106
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>111</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>120</b>

## 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 das bacterianas. Assim, a partir da introdução da terapêutica da penicilina e das sulfonamidas, ocorreu um crescente progresso no isolamento e no desenvolvimento de agentes antimicrobianos que pudessem ser utilizados satisfatoriamente na terapia e na profilaxia das doenças bacterianas. Todavia, uma das conseqüências mais importantes do uso indiscriminado de antibióticos tem sido a crescente emergência e seleção de microrganismos resistentes. Praticamente, para cada novo antibiótico descoberto, têm sido encontradas bactérias que lhe são resistentes, o que limita a sua utilidade terapêutica. Nesse sentido, o conhecimento e o controle da resistência bacteriana tornam-se essenciais para a administração mais racional e coordenada de antibióticos (SILVA, 2002).

Para um antibiótico ser efetivo, ele deve alcançar seu alvo e ligar-se a ele interferindo com sua função. Resistência bacteriana a um agente antimicrobiano resulta de três causas gerais: 1) o fármaco não alcança seu alvo; 2) o fármaco não é ativo; ou 3) o alvo é alterado (HARDMAN et al., 2001).

As conseqüências do uso indiscriminado de antibióticos incluem aumento do risco de efeitos adversos, alto custo do tratamento e alta resistência antimicrobiana dos patógenos. O que diferencia agentes antimicrobianos de outros fármacos é que cada agente antimicrobiano usado pode ter um potencial significativo de efeito sobre a ecologia microbiana do mundo. Antibióticos afetam tanto os microrganismos patogênicos como os microrganismos da microbiota normal. Na teoria, os antibióticos podem selecionar cepas resistentes desde que sua concentração local exceda a concentração inibitória mínima (CIM) para a população bacteriana sensível, mas abaixo da CIM para o clone resistente. A ocorrência dessas variações depende do espectro de ação do agente, da dose, via de administração, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e inativação do agente "in vivo" (CIZMAN, 2003).

A absorção incompleta dos antimicrobianos administrados oralmente pode influenciar a microbiota intestinal, e a excreção dos mesmos pela mucosa vaginal ou intestinal, bile, glândulas salivares ou glândulas sudoríparas, apócrinas e écrinas, e

pode interferir com a microbiota normal em diferentes habitats. Como uma das conseqüências, microrganismos resistentes a antibióticos podem aumentar em número, e então esses também podem servir de reservatório para genes resistentes. Um antibiótico pode desencadear o desenvolvimento de resistência a um ou mais antibióticos estruturalmente relacionados, porque a resistência pode ser geneticamente vinculada via co-seleção de plasmídios multi-resistentes (SULLIVAN et al., 2001).

Nos tecidos infectados, os microrganismos são protegidos por várias estruturas biológicas ao redor do foco da infecção. Além disso, as propriedades de adesão da bactéria são também expressadas pela secreção do glicocálix em condições patológicas ocasionando aumento da proteção e, portanto aumento na resistência para os agentes antibacterianos (ENG et al., 1995; KAPRELYANTS et al., 1993).

A atividade do antibiótico é dependente de seus parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos (TULKENS, 1991; VAN DEN BROEK, 1989). Um dado antibiótico tem que satisfazer muitos critérios de seleção para sua ótima atividade, incluindo penetração, retenção, distribuição intracelular, expressão da atividade nos compartimentos infectados, susceptibilidade da bactéria nos sítios e infecção com atenção para a fase de crescimento. A proporção entre as concentrações intracelular e extracelular ( $C_i/C_e$ ) é um parâmetro usado para classificar a habilidade para a acumulação intrafagocítica de antibióticos. Baixa 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).

Na era de crescente resistência à multidrogas, a infecção por microrganismos Gram-negativos, particularmente a *Pseudomonas aeruginosa*, é um crescente dilema terapêutico, devido à enorme dificuldade em tratar infecções causadas por este microrganismo patogênico. A emergência de resistência bacteriana é resultante de complexos fatores inter-relacionados. Na *Pseudomonas aeruginosa*, a inativação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (por exemplo, a cefepima) mediada por enzimas via  $\beta$ -lactamases e cefalosporinases destroem a integridade estrutural desses agentes, tornando-os inefetivos. Além disso, alterações na permeabilidade da membrana externa e sistemas de efluxo podem inibir a atividade desses antibióticos e drasticamente diminuir a susceptibilidade antibiótica (ONG et al., 2007).

Embora a resistência a multidrogas seja freqüentemente atribuída à associação de vários mecanismos de resistência, pesquisas indicam que a presença de bombas de efluxo pode exercer um papel crítico na resistência antibiótica da *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas (ACSCHLIMANN, 2003).

Ceftazidima e cefepima são cefalosporinas extensamente utilizadas como terapia empírica em pacientes gravemente doentes, onde um tratamento antibiótico eficaz é essencial. Cefepima é categorizada como uma cefalosporina de quarta geração porque mostra um maior espectro de atividade do que as cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima. Ambas, cefepima e ceftazidima demonstram atividade contra organismos Gram-positivos e principalmente Gram-negativos (ROBERTS et al., 2007). Entretanto vários microrganismos têm apresentado resistência a esses antimicrobianos. Pesquisas, realizadas pelo SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) sobre a atividade de  $\beta$ -Lactâmicos de amplo espectro contra cepas de *P. aeruginosa* mostraram que cerca de 17 a 34% das amostras analisadas foram resistentes a cefepima e ceftazidima (FERRARA, 2006; PFALLER et al., 2006).

Ao longo dos tempos, a utilização de certos fármacos na terapêutica tem sido sempre limitada pela impossibilidade de aumento de sua dosagem. O acúmulo no organismo ou degradação do agente terapêutico, baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais inerentes à sua utilização em concentrações elevadas, tornam muitas vezes difícil à utilização da dosagem necessária para que esse cumpra com a sua função. Na busca da solução para esses problemas, durante o século XX, e em especial no decorrer das últimas décadas, várias pesquisas foram direcionadas ao desenvolvimento de sistemas capazes de transportar um composto bioativo (fármacos, em especial os dirigidos a tumores, antibióticos, enzimas, hormônios, agentes quelantes ou compostos modificadores da célula) até um alvo específico (órgão, tecido ou célula) (SANTOS, CASTANHO, 2002; TORCHILIN, 2005).

Lipossomas e nanopartículas, as quais consistem em carregadores submicroscópicos, são os principais sistemas desenvolvidos para essas estratégias de liberação do fármaco em seu alvo. Quando administrados intravenosamente, partículas fosfolipídicas e poliméricas localizam-se preferencialmente nos órgãos com alta atividade fagocítica e em monócitos circulantes, responsáveis por seu *clearance* (ALPHANDARY et al., 2000). Monócitos circulantes são também responsáveis por atrair significantes quantidades de lipossomas. Nos pulmões,

monócitos carregados de lipossomas podem subseqüentemente migrar para os alvéolos para tornarem-se macrófagos alveolares. A captura de lipossomas pelos macrófagos ocorre por endocitose, sendo seguida por uma extensiva degradação intralisossomal de lipídeos lipossomais e liberação dos fármacos encapsulados (BAKKER-WOUDENBERG, ROERDINK, 1986).

No caso de bactérias resistentes devido à baixa permeabilidade da membrana externa, formulações lipossomais de antibióticos estão sendo desenvolvidas para aumentar a eficácia bactericida dos antibióticos. As formas lipossomais promovem a efetiva interação entre a bactéria e o antibiótico, aumentando também o tempo de vida do antibiótico encapsulado. Várias formas lipossomais de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas B demonstraram redução na CIM em comparação com o fármaco livre contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DRULIS-KAWA et al., 2006)

A função desses transportadores é aumentar o potencial terapêutico de um fármaco, impedindo que esse se perca no trajeto para um alvo específico, evitando simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos em outra parte do organismo (SANTOS, CASTANHO, 2002).

O presente trabalho foi desenvolvido visando a obtenção e a caracterização de lipossomas contendo ceftazidima e cefepima, bem como para investigar a ação desses lipossomas contendo esses antimicrobianos sobre a concentração inibitória mínima (CIM) e sobre a concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* e resistência aos antimicrobianos

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogênica oportunista Gram-negativa, não fermentadora de açúcares visando obter energia para o funcionamento celular. Possui flagelo polar e pili, os quais são responsáveis pela motilidade e aderência da bactéria às membranas celulares biológicas sendo também fatores de virulência (JAPONI et al., 2006).

Bactérias não fermentadoras são ubíquas na natureza, particularmente no solo e na água, e sobre as superfícies em contato com os mesmos. No ambiente hospitalar, elas podem ser isoladas dos umidificadores, máquinas e acessórios ventilatórios, colchões e outros equipamentos, bem como da pele dos profissionais da saúde (McGOWAN, 2006).

A baixa susceptibilidade de Gram-negativos não fermentadores à substâncias antimicrobianas é tipicamente devido, tanto à resistência intrínseca, quanto àquela rapidamente adquirida. Resistência intrínseca de Gram-negativos não fermentadores para antibióticos comuns, como ampicilina, a maioria das cefalosporinas e macrolídeos, é primariamente devida à relativa impermeabilidade de sua membrana externa para esses antibióticos, comparadas com a membrana externa de outras bactérias Gram-negativas. Por exemplo, a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas não fermentadoras tem sido descrita como sendo aproximadamente 10 a 100 vezes menor do que a permeabilidade observada na *Escherichia coli* (HANCOCK, SPEERT, 2000; HAUSER, SRIRAM, 2005).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é uma estrutura em bicamada, composta de lipopolissacarídeos e fosfolipídios e possui proteínas, em particular porinas, ancoradas nessa membrana. Os lipopolissacarídeos são responsáveis em parte, ou na maioria das vezes, pelas características de impermeabilidade para alguns antibióticos. Entretanto alguns pequenos antibióticos hidrofílicos difundem através dos poros aquosos na membrana externa que são formados pelas porinas. As porinas têm também um importante papel na impermeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas para moléculas hidrofílicas. A alteração do tamanho do poro ou a perda das porinas tem

sido implicada em um aumento na resistência bacteriana (DENYER, MAILLARD, 2002).

O número e tamanho dos poros da membrana externa são variáveis entre as diferentes bactérias Gram-negativas. Um exemplo é a *Pseudomonas aeruginosa*, a qual é intrinsecamente resistente a uma grande variedade de antibióticos em virtude da falta de porinas clássicas de alta permeabilidade (HARDMAN et al., 2001).

A resistência às cefalosporinas pode estar relacionada com a inabilidade que os antibióticos têm de alcançar seu sítio de ação, com a alteração nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), que são o alvo das cefalosporinas, ou com as enzimas bacterianas ( $\beta$ -lactamases) que podem hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico e inativar a cefalosporina. A hidrólise de  $\beta$ -lactâmicos por meio de  $\beta$ -lactamases periplásmicas soma seus efeitos à ação dos sistemas de efluxo e à baixa permeabilidade celular. As novas ureidopenicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos são indutores fracos e, apesar de serem susceptíveis, permanecem ativos enquanto a enzima não é induzida. No entanto, a desrepressão desta enzima ocasiona níveis elevados de resistência às ureidopenicilinas e à maioria das cefalosporinas. A quarta geração das cefalosporinas, como a cefepima, também é pobre indutora do tipo I das  $\beta$ -lactamases, sendo menos susceptível para hidrólise pelo tipo I das  $\beta$ -lactamase do que a terceira geração (HARDMAN et al., 2001)

A resistência bacteriana para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é também causada pelos sistemas de bombas de efluxo que removem o antibiótico para fora da bactéria, expulsando-os da célula antes que eles tenham a oportunidade de alcançar uma adequada concentração no sítio de ação. Esse é um importante mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos na *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae*. Os sistemas de efluxo resultam em mais altas concentrações inibitórias mínimas contra penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro, tetraciclinas e fluoroquinolonas (HARDMAN et al., 2001; THOMSON, BONOMO, 2005).

Os sistemas de efluxo a multidrogas da *P. aeruginosa* são compostos de três proteínas que estão estruturalmente e funcionalmente unidas. *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, cobrindo uma camada fina de peptidoglicano, sendo constituída de uma estrutura em bicamadas contendo fosfolípidios, com sua face apolar voltada para dentro, protegida dos meios aquosos, e a face polar voltada para fora; e uma membrana citoplasmática, onde os fosfolípidios são semelhantes aos da membrana externa, as quais dividem o espaço



periplásmico. Os três componentes do sistema de efluxo são exigidos para a efetiva remoção dos compostos através de ambas as membranas da célula. Esses três componentes incluem uma bomba dependente de energia localizada na membrana citoplasmática (MexB), uma porina na membrana externa (OprM), e uma proteína ligando-as (MexA) (NIKAIDO, 1998; TENOVER, 2006)

Os quatro maiores sistemas de efluxo da *P. aeruginosa* são MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN. Os sistemas MexAB-OprM e MexXY-OprM contribuem para a resistência intrínseca a multidrogas, enquanto a expressão exacerbada de MexXY-OprM ou MexCD-OprJ tem sido associada com resistência adquirida a multidrogas. O fato de que os sistemas de efluxo podem mediar a resistência para uma variedade de classes de antimicrobianos faz dele o mais efetivo mecanismo de resistência (POOLE, SRIKUMAR, 2001; TENOVER, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* e outros Gram-negativos não fermentadores, que são resistentes a uma classe de antibiótico, são freqüentemente resistentes a outras classes de antibióticos, resultando em resistência à multidrogas, o que tem se tornado característico dessas bactérias. McGowan (2006), em estudo sobre pneumonia associada a aparelhos ventilatórios causadas por *P. aeruginosa* resistentes ou sensíveis à piperacilina, mostrou que as cepas resistentes à piperacilina exibiram uma alta prevalência de resistência à ticarcilina, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulonato, ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina e amicacina. Ao contrário, somente 21,8% e 16,8% de cepas susceptíveis à piperacilina foram resistentes à ciprofloxacina e ticarcilina, respectivamente (comparadas com 70,6% e 91,2% das cepas resistentes à piperacilina), e menos de 15% foram resistentes para uma das classes dos outros antibióticos testados. Ressaltando que em bactérias Gram-negativas não fermentadoras, resistência à uma classe de antibióticos está freqüentemente associada à resistência a outras classes de antibióticos.

Essa tendência de Gram-negativos não fermentadores em exibir resistência à multidrogas pode ser causada em parte pela resistência cruzada e/ou pela co-resistência. Co-resistência refere-se à presença de vários mecanismos diferentes que causam resistência à uma dada classe de antibióticos em um mesmo hospedeiro bacteriano. Um mecanismo comum de coresistência a multidrogas envolve a aquisição de genes capazes de conferir resistência para uma variedade de classes de antibióticos. Embora resistência cruzada comumente refira-se a

situações nas quais um único mecanismo bioquímico confira resistência para a maioria dos membros de uma classe de antibióticos. Quando o mecanismo bioquímico é o sistema de efluxo, resistência cruzada à várias classes de antibióticos podem ser observadas. Isso pode ocorrer quando o uso de uma classe de antibióticos aumenta a probabilidade de mutações, o que leva à seleção de uma cepa mutante expressando um sistema de efluxo ativo com amplas especificidades de substratos, desse modo estabelecendo uma situação na qual várias classes de antibióticos são ativamente removidas da célula (COURVALIN, TRIEU-COUOT, 2001).

Segundo Tenover (2006), resistência à multidrogas é cada vez mais observada em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Esses isolados apresentam alto nível de resistência para piperacilina, ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina e tobramicina.

Resistência à multidrogas freqüentemente reflete não um, mas uma combinação de mecanismos de resistência. As bombas de efluxo freqüentemente trabalham juntas com a limitada permeabilidade da membrana externa da *P. aeruginosa* para produzir resistência a  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e aminoglicosídeos (TENOVER, 2006).

Como relatado anteriormente, bactérias Gram-negativas não fermentadoras exibem resistência intrínseca para macrolídeos e muitos  $\beta$ -lactâmicos, devido à relativa impermeabilidade de sua membrana externa para esses agentes, aliada à expulsão do fármaco via bombas de efluxo. Embora bombas de efluxo presentes na *Pseudomonas aeruginosa* são usualmente insuficientes para produzir resistência para fármacos anti-pseudomonas, a aquisição ou seleção de mutantes expressando bombas de efluxo tem sido implicada na resistência da maioria das classes de fármacos antimicrobianos, incluindo penicilinas e cefalosporinas, fluoroquinolonas, carbapenemas e aminoglicosídeos (HANCOCK, SPEERT, 2000).

Considerando-se a importância da barreira de penetração dos antibióticos na resistência bacteriana, o desenvolvimento de sistemas coloidais de liberação controlada de fármacos, como os lipossomas, poderia ser uma maneira de aumentar a efetividade dos antibióticos, não somente aumentando a eficácia nos tratamentos antibióticos de cepas não resistentes, mas também contribuindo para superar a resistência bacteriana. O aumentado efeito bactericida de antibióticos encapsulados em lipossomas pode ser explicado pela liberação do antibiótico encapsulado

diretamente ao alvo bacteriano pela interação direta dos lipossomas e bactérias, provavelmente por um processo de fusão (BEAULAC et al., 1998).

## 2.2. Lipossomas

Lipossomas ou vesículas fosfolipídicas (Figura 1) são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de fosfolipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD et al., 2005). Vários fosfolipídios naturais e sintéticos podem ser empregados na preparação de lipossomas, os quais, devido à sua estrutura em bicamadas, são capazes de encapsular uma grande gama de substâncias: fármacos hidrofílicos são dissolvidos em regiões aquosas e fármacos hidrofóbicos são associados com as bicamadas lipídicas. Se um fármaco apresentar caráter anfifílico, poderá se acumular em ambas às regiões ou ficar parcialmente imerso na bicamada lipídica, na região da interface. Lipossomas são estruturas úteis para transporte de fármacos, proteínas, agentes diagnósticos e outros, atuando dessa forma como potenciais transportadores de várias substâncias (GREGORIADIS, 1995; LASIC, 1989).

Segundo Frézard et al. (2005), uma vantagem dos lipossomas, com relação a outros sistemas transportadores de fármacos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando constituídos de lipídios pertencentes às famílias de lipídios naturais. Além disso, são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos.

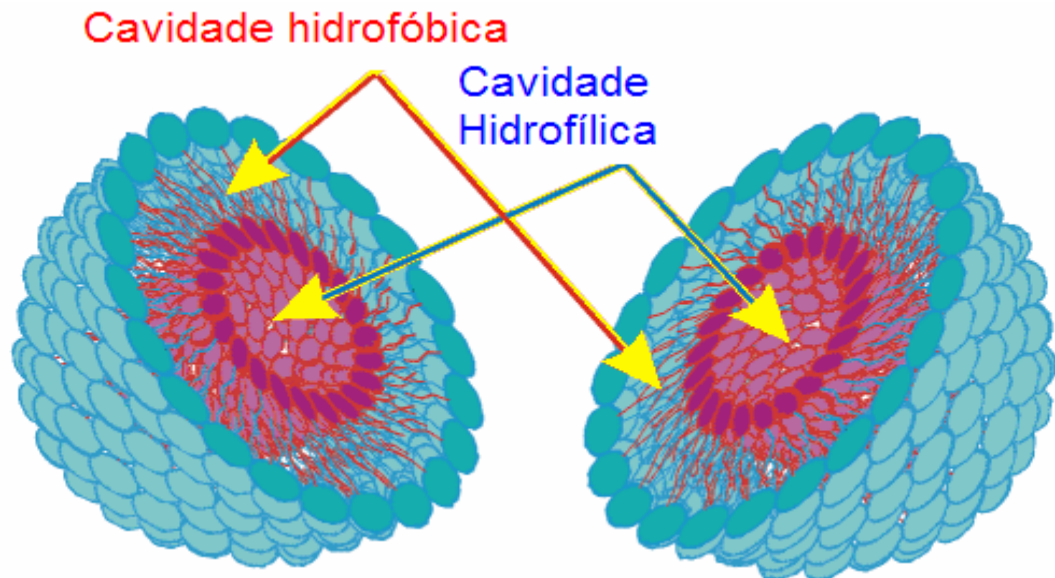


Figura 1: Lipossomas podem encapsular e transportar substâncias solúveis em água em sua cavidade hidrofílica e substâncias solúveis em óleo em sua cavidade hidrofóbica. Adaptada de [www.elsomresearch.com](http://www.elsomresearch.com) . Acesso em: 23/04/07.

Os lipossomas apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que, quando alcançam o tecido alvo, podem liberar doses concentradas de fármaco, aumentando a eficácia do tratamento (AOKI et al., 1997). Os lipossomas modificam as propriedades farmacocinéticas, o tempo de trânsito na circulação sanguínea e o metabolismo do fármaco encapsulado (AOKI et al., 1997; SHARMA E SHARMA, 1997).

Devido à similaridade entre a estrutura da bicamada lipídica e da membrana celular, lipossomas são capazes de interagir efetivamente com as células, permitindo o direcionamento do fármaco ao órgão alvo e, portanto, com menor toxicidade que o fármaco livre (FARRELL, SIRKAR, 1997; McPHAIL et al., 2000).

Além de seu papel na compreensão de vários fenômenos bioquímicos e biofísicos, os lipossomas são importantes em várias e diferentes áreas da ciência e tecnologia. Em pesquisas básicas, biofísicas e em físico-química, os lipossomas são usados como sistemas modelo para o estudo de biomembranas e suas propriedades, tais como: permeabilidade em função da composição química da membrana, presença de várias moléculas/íons, fusão de membranas/células, etc. Em bioquímica, os lipossomas possibilitam aos cientistas reconstituir e investigar proteínas de membrana em um ambiente bem definido que mimetiza fielmente o natural. Lipossomas são também usados como suporte para catalisadores,

especialmente partículas semi-condutoras e em aplicações tais como a foto-conversão de energia solar (LASIC, 1992).

Entretanto suas maiores aplicações são na área da farmacologia, medicina e biotecnologia, onde os lipossomas servem como veículo para controlar a administração de fármacos encapsulados, material genético, enzimas e outras moléculas. Lipossomas também têm sua utilidade nas indústrias alimentícia e cosmética, tornando possível transformar moléculas não hidrossolúveis em formulações à base de água. No campo das aplicações farmacêuticas, vários produtos estão sob investigação, incluindo imunomoduladores, agentes diagnósticos e terapêuticos para câncer, antibióticos, produtos oftálmicos, antiasmáticos, antifúngicos, vacinas e promotores do crescimento capilar (LASIC, 1992; TORCHILIN, 2005).

Segundo Torchilin (2005), a utilização de lipossomas como transportadores para a liberação de fármacos apresenta as seguintes vantagens:

- Podem ser programados para a liberação controlada de fármacos durante um período prolongado de tempo;
- Têm uma tendência natural a ligar-se a determinados tipos de tecidos e células; sendo pequenos o bastante para escaparem da circulação sanguínea para o tecido no qual o endotélio capilar esteja danificado;
- São quimicamente similares a outras células que circulam no sangue, de modo que são biologicamente compatíveis com outras células e também fáceis de serem metabolizados pelo organismo;
- Quando conjugados com anticorpos se ligam às células alvo com maior avidéz que a forma solúvel desses mesmos anticorpos;
- Se apresentam como um método útil para proteger produtos lábeis biologicamente ativos, como proteínas e peptídeos, frente à sua inativação ou degradação no organismo. Também podem prevenir o efeito tóxico de certas substâncias antes que elas atinjam o sítio de ação;
- Apresentam a possibilidade de direcionar seletivamente os fármacos para tipos celulares específicos através do emprego de anticorpos, hormônios, carboidratos ou outros ligantes;
- Fornecem uma oportunidade única para a liberação de medicamentos dentro das células e até dentro de compartimentos intracelulares.

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 os sítios onde os patógenos intracelulares se localizam (MAURER et al.,1998).

As principais desvantagens do ponto de vista farmacológico são um possível extravasamento, remoção pelas células do sistema retículo endotelial (no caso de a captura não ser favorável), degradação no trato gastrointestinal, estabilidade, reprodutibilidade e, do ponto de vista tecnológico, a produção em larga escala (LASIC, 1992).

Para a administração de medicamentos hidrofílicos em lipossomas é conveniente escolher lipossomas unilamelares, nos quais a cavidade aquosa é significativamente maior. Para o transporte de fármacos hidrofóbicos, que se incluem na parede fosfolipídica do lipossoma, a presença de várias membranas (lipossomas multilamelares) permite administrar a substância ativa em maior quantidade (LASIC, 1989).

A aplicação terapêutica dos lipossomas utiliza quase todas as vias de administração. A mais freqüente é a intravenosa. Podem também ser administrados pelas vias intraarterial, subcutânea, intramuscular, oral, tópica e nasal. (LASIC, 1989).

As várias preparações terapêuticas dos lipossomas têm mostrado resultados positivos, destacando-se as terapias antimicrobianas de infecções por vírus, bactérias e protozoários; genética; de reposição de enzimas em disfunções metabólicas hereditárias, de reposição hormonal, desintoxicação de tecidos com depósitos metálicos, tratamentos oftálmicos e dermatológicos, vacinas, etc (GREGORIADIS, 1995; SAPRA, ALLEN, 2003).

A interação dos lipossomas com células do organismo é a base de sua aplicação no transporte de fármacos, que podem ser de quatro tipos: o lipossoma deve primeiramente adsorver à membrana celular, onde pode liberar alguns de seus componentes no fluido extracelular, alguns dos quais podem passar através da membrana, entrando na célula. Alguns são capturados pelo processo da fagocitose e então degradados pelos lisossomos, liberando seu conteúdo no citoplasma. O conteúdo lipossomal pode também entrar na célula diretamente se o lipossoma se

fundir com a membrana celular e os lipossomas podem ainda intercambiar seus lipídeos com os da membrana celular (LASIC, 1992).

A utilidade dos lipossomas como um eficiente sistema carregador para liberação de fármacos também demonstra sucesso quando usado para aumentar a atividade de muitos compostos de várias classes de antibióticos contra bactérias (RAVAOARINORO, TOMA, 1993). As principais razões para seu uso incluem contínua liberação do fármaco, redução da dose, possibilidade de administrar uma grande dose com toxicidade reduzida e aumento da sensibilidade da bactéria para o fármaco encapsulado nos lipossomas (OMRI et al., 1994).

### 2.2.1. Composição dos lipossomas

Para a formação dos lipossomas, vários tipos de lipídios e outros compostos anfifílicos podem ser utilizados. Os fosfolipídios são os compostos mais comumente utilizados, principalmente se as vesículas são destinadas a aplicações terapêuticas. Eles podem ser classificados em cinco grupos: fosfolipídios de fontes naturais, naturais modificados, semi-sintéticos, completamente sintéticos e com grupos polares modificados. De forma geral, lipossomas podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar (CALHEIROS, 2001; FRÉZARD et al., 2005; RUKHOLM et al., 2006; SHARMA E SHARMA, 1997; VEMURI, RHODES, 1995).

A fosfatidilcolina (PC) (Figura 2), também conhecida como lecitina, pode ser obtida de fontes naturais ou sinteticamente. Esse composto é extraído da gema do ovo, da soja e, de forma menos comum, do coração e da medula espinhal de bovinos. Como é o principal tipo de fosfolipídio presente em muitas membranas celulares, a PC é freqüentemente empregada como constituinte dos lipossomas. A PC também é muito utilizada devido a seu custo relativamente baixo quando comparado a outros fosfolipídios, além de possuir carga líquida neutra em pH fisiológico e ter baixa reatividade química. A lecitina de fontes naturais é na verdade uma mistura de fosfatidilcolina com cadeias de hidrocarbonetos de diferentes comprimentos e graus de insaturação (CALHEIROS, 2001).

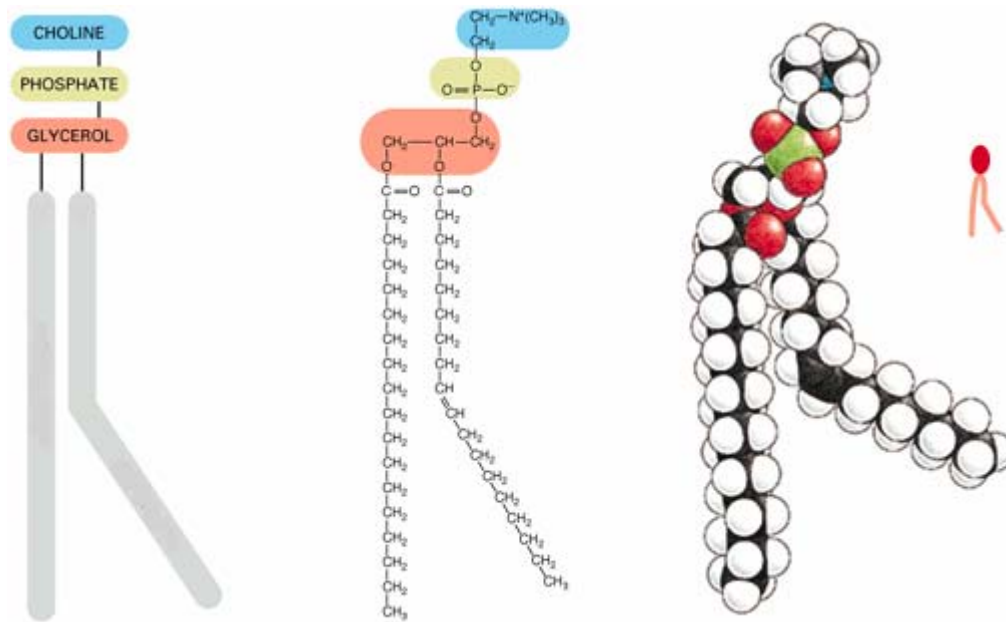


Figura 2: Fosfatidilcolina – Representações esquemáticas, fórmula estrutural e arranjo espacial. Adaptada de [www.colorado.edu](http://www.colorado.edu). Acesso em: 27/04/07.

Outros tipos de lipídios que podem ser utilizados na preparação das vesículas são os esteróis. Dentro dessa categoria, tem-se o colesterol que está presente em grandes quantidades nas membranas celulares de mamíferos. Esse lipídio, isoladamente, não é capaz de se organizar em bicamadas, mas pode ser incorporado em membranas de fosfolipídios em altas proporções (até 50%), ajustando sua estrutura e propriedades dinâmicas, o que afeta sua liberdade de movimento e hidrofobicidade, com o objetivo de melhorar as características de empacotamento da bicamada. Devido à estrutura de sua molécula e às suas propriedades de lipofilia, o colesterol modula a fluidez da membrana fosfolipídica, reduz a permeabilidade a partir da bicamada e melhora a estabilidade da membrana na presença de fluidos biológicos. Lipossomas isentos de colesterol interagem rapidamente com as proteínas do plasma, como a albumina, m-transferrina e macroglobulina. Esses componentes tendem a desestabilizar os lipossomas e reduzir sua utilidade como sistemas de liberação de fármacos, pois extraem os fosfolipídios da membrana dos lipossomas provocando sua instabilidade física (CALHEIROS, 2001; CÓCERA et al., 2003; VEMURI, RHODES, 1995).

A adição de um antioxidante na formulação dos lipossomas visa evitar a degradação oxidativa dos fosfolipídios estruturais, visto que a maioria das dispersões de fosfolipídios contém lipídios insaturados como parte da cadeia



molecular. Esses lipídios insaturados submetem-se à degradação oxidativa ou peroxidação lipídica, que podem ocorrer durante a preparação, estocagem ou uso. Estas degradações oxidativas podem ser minimizadas por várias maneiras, sendo mais comum a adição de antioxidantes como o alfa-tocoferol (Vitamina E), pois protege adequadamente os fosfolipídios da oxidação (VEMURI, RHODES, 1995).

### 2.2.2. Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados a partir do método de preparação, número de bicamadas presentes na vesícula ou pelo tamanho. Quando os lipossomas são descritos baseados no número de bicamadas, são classificados como vesículas unilamelares (ULV) ou vesículas multilamelares (MLV). Quanto ao método de preparação são descritos como vesículas de evaporação em fase reversa, vesículas de injeção de éter (EIV), dentre outros. E quanto ao tamanho, os lipossomas são classificados em vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV). A descrição dos lipossomas através do número de lamelas e tamanho é mais comum que a classificação pelo método de preparação (VEMURI, RHODES, 1995)

Uma definição mais detalhada distingue entre vesículas grandes e pequenas, no que se pode chamar de classificação dos lipossomas (SHARMA E SHARMA, 1997):

- Lipossomas multilamelares (*Multilamellar Vesicles*: MLV): são os lipossomas formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Proporcionam maior encapsulação de substâncias lipofílicas e são mais estáveis por longos tempos de estocagem. Seu diâmetro é variável de acordo com o número de lamelas, podendo ir de 400 a 3500 nm.

- Lipossomas pequenos unilamelares (*Small Unilamellar Vesicles*: SUV): são os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, constituídos por apenas uma bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso. São termodinamicamente instáveis, susceptíveis de agregação e fusão. Seu diâmetro varia de 20 a 50 nm.

- Lipossomas grandes unilamelares (*Large Unilamellar Vesicles: LUV*): são também constituídos por apenas uma bicamada, com uma grande cavidade aquosa, útil para fármacos hidrofílicos. Seu diâmetro varia de 200 a 1000 nm.

O tamanho do lipossoma é um dos principais parâmetros que determinam a fração capturada pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). Pequenos lipossomas ( $\leq 0,1\mu\text{m}$ ) são opsonizados mais lentamente e a uma menor extensão, quando comparados com lipossomas grandes ( $> 0,1\mu\text{m}$ ) (SHARMA E SHARMA, 1997).

### 2.2.3. Mecanismos de formação dos lipossomas

Alguns mecanismos de formação de vesículas foram sugeridos por Lasic, (1988). De acordo com esse autor (Figura 3), com a adição de uma fase aquosa a um filme lipídico seco, ocorre permeação dessa fase através das bicamadas de lipídeos, sendo a hidratação da monocamada mais externa maior que a das camadas internas. Dessa forma, há formação de bolhas convexas, uma vez que a área superficial das cabeças polares cresce com o aumento da hidratação. A transformação para de ocorrer quanto é atingida uma distância de equilíbrio entre as bicamadas. Agitando-se o sistema, as bicamadas se fecham, formando vesículas multilamelares ovais. Após algum tempo, essas vesículas se transformam em estruturas esféricas que retêm volumes maiores e possuem energias de curvaturas menores.

Lasic (1988) também propôs a existência de fragmentos de bicamada lipídica como estruturas intermediárias no processo de formação de vesículas. Quando há dissipação de energia no sistema, as bicamadas já existentes são rompidas, havendo formação de fragmentos de bicamada, que são instáveis devido ao contato desfavorável de suas extremidades apolares com o meio aquoso. O rearranjo das moléculas hidrofóbicas causa um arqueamento da estrutura que acaba se fechando totalmente, formando vesículas unilamelares.

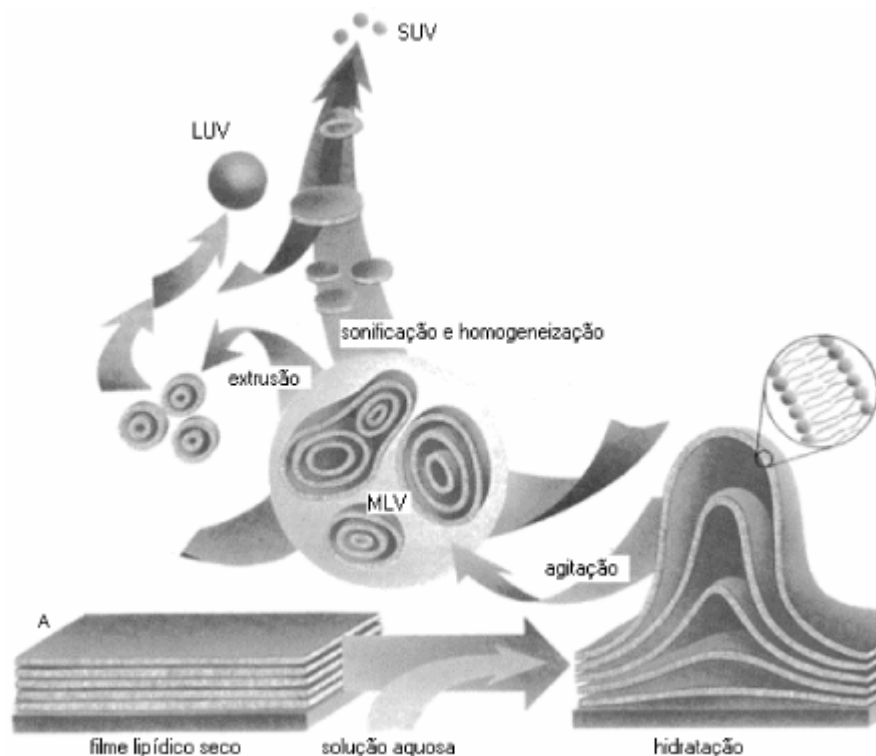


Figura 3: Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com). Acesso em: 28/04/07.

Os lipossomas também podem ser preparados por vários métodos como o da microfluidização, desidratação-reidratação, congelamento-descongelamento, injeção de etanol ou de clorofórmio, evaporação de fase reversa, infusão de éter e remoção de detergente, dentre outros (LIMA, 1995).

Geralmente, as características físico-químicas dos compostos terapêuticos definem sua localização nos lipossomas, podendo ser incorporadas seja no compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis), seja nas membranas dos lipossomas (substâncias lipofílicas ou anfifílicas). A taxa de encapsulação de uma substância em lipossomas e a relação substância encapsulada/lipídio são dois parâmetros importantes que devem ser considerados na escolha do método de preparação, sobretudo quando se procura desenvolver uma composição farmacêutica. Estes parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana. A taxa de encapsulação deverá ser maximizada, pois é inversamente relacionada à quantidade de substância não encapsulada, que é perdida na maioria das vezes. A relação fármaco/lipídio deverá também ser maximizada, visto que

determina a quantidade de lipídio a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lipídio veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (FRÉZARD et al., 2005).

#### 2.2.3.1. Hidratação do filme lipídico (HFL)

A preparação de vesículas multilamelares por hidratação de filme lipídico foi primeiramente descrita por Bangham et al., (1965) consistindo até hoje em um método básico de preparação de lipossomas contendo substâncias ativas. Esse método é baseado no conceito de formação de lipossomas por dispersão mecânica. É o mais simples e amplamente usado para a preparação de MLV (Figura 4), no qual um filme fino de lipídios é depositado nas paredes de um recipiente (balão de fundo redondo) após a evaporação do solvente orgânico. As vesículas são formadas quando a fase aquosa a uma temperatura acima da temperatura de transição do lipídio é adicionada em excesso ao sistema, sob agitação. O fármaco a ser encapsulado está incluído ou no tampão aquoso de hidratação (para fármacos hidrofílicos) ou no filme lipídico (para fármacos lipofílicos). Esse método produz uma população heterogênea de MLV (1 - 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), os quais podem ser sonicados ou extrusados através de filtros de policarbonato para produzir uma população de pequenos e mais uniformes SUV (SHARMA E SHARMA, 1997).

Mesmo antes da adição da fase aquosa, os lipídios que formam o filme seco já estão dispostos de forma a separar as regiões hidrofílicas das hidrofóbicas, na mesma conformação das bicamadas dos lipossomas. Sob agitação, as camadas de lipídios começam a inchar e, à medida que sofrem agitação, desprendem-se do suporte já na forma de vesículas multilamelares (CALHEIROS, 2001).

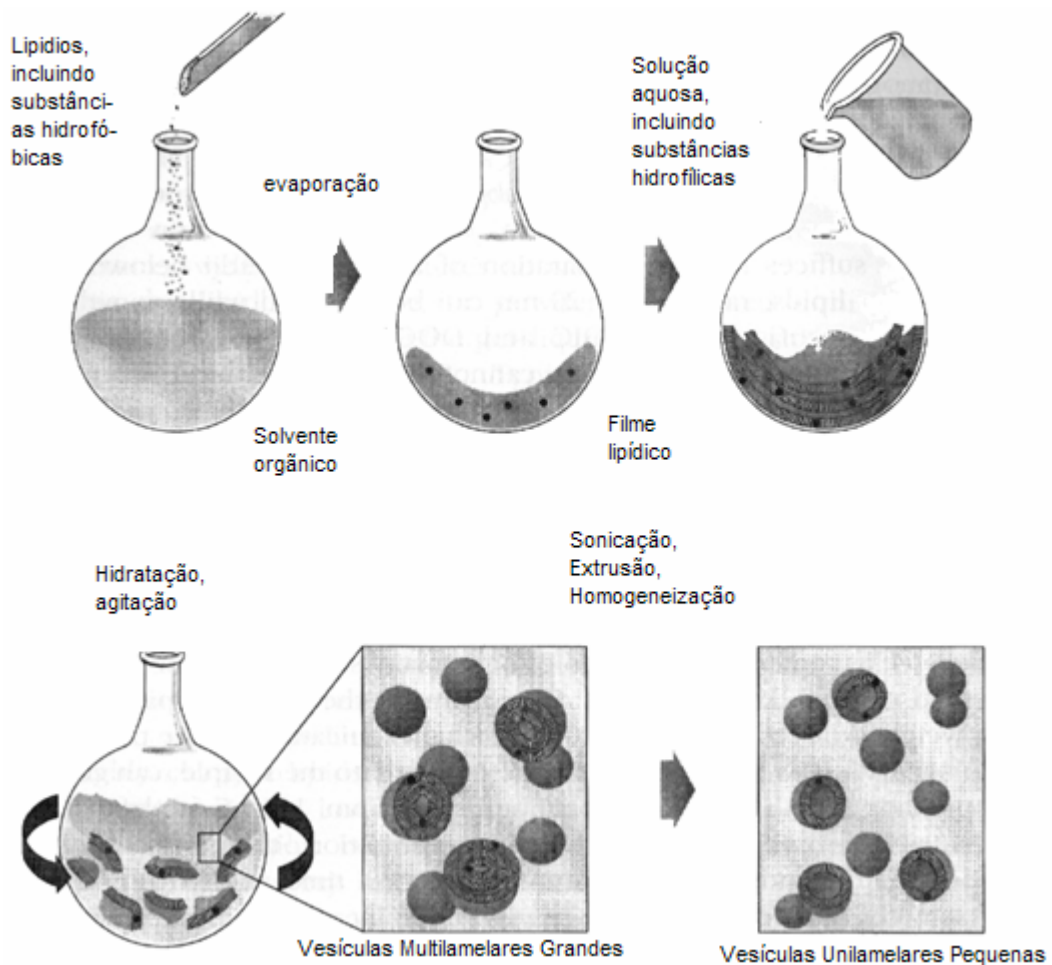


Figura 4: Representação da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico. Adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com). Acesso em: 28/04/07.

#### 2.2.3.2. Determinação do diâmetro dos lipossomas

A determinação e o controle do diâmetro dos lipossomas são importantes por várias razões. O raio do lipossoma ou curvatura é conhecido devido à significativa influência sobre as propriedades físico-químicas da bicamada lipídica. Em preparações farmacêuticas, a eficiência de encapsulação de um fármaco e o seu comportamento *in vivo* está diretamente relacionada ao tamanho das vesículas (MATSUZAKI et al., 2000).

Várias técnicas para medir lipossomas baseadas em espalhamento de luz foram introduzidas, mas, na maioria dos casos são aplicáveis apenas sob condições bem definidas. Um exemplo amplamente utilizado é o espalhamento de luz dinâmica.

### 2.2.3.2.1. Espalhamento de luz (light scattering)

O fenômeno da difusão da luz pode ser utilizado para detectar a eluição de lipossomas através de uma coluna de cromatografia de exclusão. A difusão da luz através das partículas ocorre em função do tamanho destas. Assim, a turbidez pode ser utilizada para uma estimativa do diâmetro médio de uma preparação de lipossomas. A medição do fenômeno sob um ponto de vista dinâmico, permite determinar a distribuição de uma preparação segundo o tamanho. Essa técnica é denominada por três termos diferentes que são: “Dynamic Light Scattering” (DLS), “Quasi-elastic Light Scattering” (QELS), ou ainda “Photon Correlation Spectroscopy” (PCS), e também referida como “Laser Light Scattering” (LIMA, 1995).

Esse método está baseado na propriedade das partículas em suspensão se difundirem por todas as direções e estarem em movimento permanente (movimento Browniano), espalhando o feixe de luz quando esse incide sobre elas. A intensidade do espalhamento de luz detectada está diretamente relacionada à velocidade de difusão das partículas, determinada por seu tamanho, que ocorre tanto mais rápida quanto menores forem as partículas. Em um dado ponto, a medida da luz difundida através de uma preparação de vesículas varia com o tempo, representando na verdade a soma de numerosas ondulações difundidas individualmente através das partículas. A análise de tais flutuações permite medir o coeficiente de difusão (D) das partículas, o qual pode ser utilizado para determinar diâmetro hidrodinâmico (d(H)) médio considerando-se as vesículas como esferas perfeitas (ALVES, 2005; *Dynamic Light Scattering*, em [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk); LIMA, 1995).

$$d(H) = K T / 3\pi\eta D \quad (\text{Equação de Stokes-Einstein})$$

onde:

d(H): Diâmetro hidrodinâmico;

D: Coeficiente de difusão;

K: constante de Boltzmann;

T: temperatura absoluta;

$\eta$ : viscosidade do meio

Essa técnica apresenta certas vantagens como a rapidez, ausência de tratamento prévio da amostra e precisão, uma vez que se pode efetivamente determinar as características médias de uma preparação de lipossomas, como o diâmetro ou o volume interno. Entretanto apresenta alguns inconvenientes, tornando-se menos eficiente à medida que aumenta a heterogeneidade da preparação em estudo. Além disso, em alguns casos é necessário diluir a amostra antes de levá-la ao feixe de luz. Dependendo do poder do laser, é possível medir as partículas cujo diâmetro esteja compreendido entre 3 nm e 3 µm, mas não é possível distinguir entre uma vesícula e uma massa floculada de um aglomerado de vesículas pequenas, além disso, é necessário remover quaisquer partículas micrométricas que estejam na amostra antes da análise (LIMA, 1995).

#### 2.2.3.3. Separação do fármaco encapsulado

Após a preparação dos lipossomas contendo o fármaco, é possível identificar a presença desse não só nos lipossomas (fração encapsulada), mas também dissolvido na forma livre no meio aquoso (fração não encapsulada). Para que possam ser empregados como sistemas de liberação controlada, na maioria dos casos, é necessária a remoção completa do fármaco livre. Vários métodos têm sido empregados para separação da fração livre do fármaco. Dentre esses, se destacam a cromatografia de troca iônica, a ultrafiltração e a cromatografia de exclusão por tamanho (VEMURI, RHODES, 1995).

A cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 5) é o método mais utilizado devido a sua simplicidade, adaptabilidade a vários tipos de preparações, reprodutibilidade e aspecto quantitativo. Além disso, como essa técnica não promove alterações na amostra, permite que as frações coletadas possam ser submetidas a análises posteriores (GRABIELLE-MADELMONT et al., 2003). Pode-se também determinar a fração de fármaco encapsulado tratando-se a formulação com detergente capaz de promover a ruptura dos lipossomas e completa liberação do fármaco no meio aquoso circundante, a partir do qual se realiza um ensaio quantitativo (VEMURI, RHODES, 1995).

A cromatografia de exclusão por tamanho (ou SEC – *Size Exclusion Chromatography*), também denominada permeação em gel ou filtração em gel, é um

tipo de cromatografia líquida que ao contrário dos demais, espera-se que não haja nenhum tipo de interação do fármaco com a fase estacionária, ou pelo menos que essa interação seja a menor possível para que não atrapalhe o processo de exclusão. O elemento que governa a separação na cromatografia por exclusão é a diferença de massa molecular que os compostos apresentam (SKOOG et al., 2002).

Durante o processo cromatográfico, as moléculas maiores que os poros do polímero não são capazes de penetrá-los e acabam passando por fora das partículas, sendo eluídas mais rapidamente. Já as moléculas de tamanho inferior aos poros penetram neles e percorrem em caminho mais longo e demorado e por isso acabam ficando atrasadas em relação às demais (SKOOG et al., 2002).

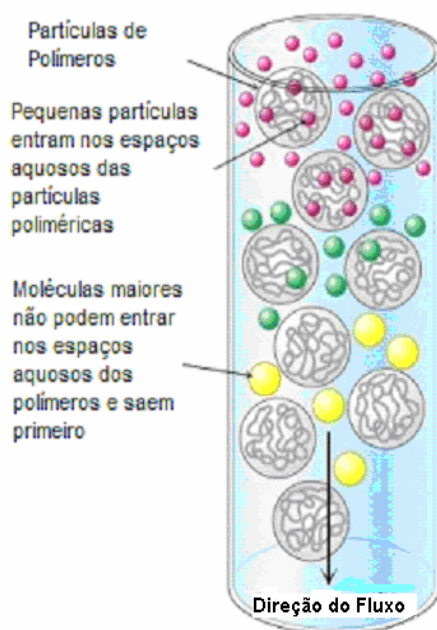


Figura 5: Cromatografia por exclusão. Adaptado de [www.dbs.umt.edu](http://www.dbs.umt.edu) . Acesso em: 29/04/07.

Existe um grande número de resinas para a cromatografia por exclusão. Eles variam de acordo com a sua rigidez e com o intervalo de tamanho dentro do qual são úteis, isso é, o material a ser utilizado na coluna dependerá do tamanho efetivo das moléculas que devem ser separadas. Os materiais utilizados na cromatografia por exclusão clássica são os chamados materiais fracos (não rígidos), constituídos de géis de polidextrano (Sephadex), poliácridamidas (Bio-Gel P) e poliagaroses



(Sephacrose e Bio-Gel A), usados quase sempre com fases móveis aquosas. Sua capacidade é elevada, mas eles não resistem a pressões superiores a 3 bar (COLLINS, BRAGA, 1988).

Alguns fatores são determinantes na cromatografia de exclusão, dentre eles o volume da amostra, a razão do volume da amostra e da coluna, as dimensões da coluna, o tamanho dos poros das partículas, o fluxo, a viscosidade da amostra e o tampão utilizado (SKOOG et al., 2002). O volume da amostra é um dos mais importantes parâmetros da cromatografia de exclusão, sendo expresso como uma porcentagem do volume total da coluna. O emprego de pequenos volumes ajuda a evitar sobreposição dos picos de separação, sendo indicado para boa resolução um volume de amostra de 0,5-5% do volume total da coluna (*Gel Filtration*, em [www.chromatography.amershambiosciences.com](http://www.chromatography.amershambiosciences.com)).

Para a obtenção de uma separação adequada é de vital importância observar as características dos materiais de exclusão. Cada tipo de material apresenta um limite mínimo de tamanho molecular capaz de ser selecionado, chamado limite de exclusão. Todos os compostos com massas moleculares menores que o limite de exclusão serão capazes de penetrar nos poros com a mesma facilidade e, portanto, não serão separados. De forma semelhante, os compostos não podem apresentar massa superior a um limite máximo de massa chamado limite de permeação. Caso esse limite não seja respeitado, os compostos não terão capacidade de adentrar nos poros e todos passarão pela porção externa das partículas inviabilizando a separação. Portanto existe a chamada região de permeação seletiva que representa uma faixa de massa onde a faixa estacionária é capaz de separar adequadamente os compostos em função das diferenças de suas massas moleculares (SKOOG et al., 2002).

## 2.3. Cefalosporinas

### 2.3.1. Histórico

A história da descoberta das cefalosporinas teve início durante a Segunda Guerra Mundial, quando o professor Giuseppe Brotzu, do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari, na Itália, desenvolvia um estudo à procura de fungos que, à semelhança do *Penicillium*, fossem dotados da capacidade de produzir substâncias antibacterianas. Em 1945, após experimentar centenas de microrganismos, Brotzu isolou das águas marítimas da costa da Sardenha, próximo à desembocadura de um cano de esgoto, um fungo identificado depois como *Cephalosporium acremonium*. Os extratos de culturas desse fungo apresentaram propriedades antibacterianas e foram até mesmo usadas no tratamento de infecções estafilocócicas e da febre tifóide (HARDMAN et al., 2001; TAVARES, 2001).

Os estudos publicados por Brotzu, em 1948, não conseguiram interessar a indústria farmacêutica italiana. Trabalhando com uma amostra de cultura do *Cephalosporium acremonium* enviada por Brotzu, Florey, juntamente com Abraham e Newton, confirmaram a atividade antibiótica do fungo, sendo verificado, em seguida, que o cogumelo produzia cerca de seis substâncias com propriedades antibacterianas, das quais foram isoladas três: cefalosporina P, cefalosporina N e cefalosporina C. A primeira era um esteróide com espectro de ação muito limitado, e a segunda foi identificada como sinematina B, uma penicilina descoberta em 1951, e que tinha atividade inferior à das demais penicilinas. A cefalosporina C foi descoberta por Newton e Abraham em 1953, mostrando-se um antibiótico de baixa ação antibacteriana; contudo, essa substância apresentava um espectro de ação amplo e não era afetada pela ação da penicilinase estafilocócica, revelando ser um antibiótico completamente novo (HARDMAN et al., 2001; TAVARES, 2001).

As propriedades da cefalosporina C despertaram o interesse dos cientistas, resultando na descoberta de seu núcleo central, o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), em 1961 por Lorder e colaboradores. A partir daí, modificações nas cadeias laterais do 7-ACA possibilitaram a descoberta de derivados semi-sintéticos, tendo os laboratórios de pesquisa e farmacêuticos se dedicado àqueles que apresentaram espectro de ação amplo, resistência às  $\beta$ -lactamases, absorção por via oral e parenteral e menor toxicidade ao homem (HARDMAN et al., 2001; TAVARES, 2001).

As cefalosporinas são, portanto, antibióticos semi-sintéticos derivados do 7-ACA, distinguindo-se entre si pelas cadeias laterais da molécula básica. Em geral, modificações na cadeia lateral ligada ao carbono 3 do 7-ACA afetam as características farmacológicas do antibiótico, ao passo que substituições no anel  $\beta$ -lactâmico, ou próximas dele, levam a uma maior ou menor resistência às  $\beta$ -lactamases bacterianas; modificações mais distantes do núcleo, na cadeia ligada ao carbono 7, tendem a alterar tanto as características farmacológicas quanto as antibacterianas (HARDMAN et al., 2001; SILVA, 2002; TAVARES, 2001).

### 2.3.2. Classificação das cefalosporinas

Embora as cefalosporinas possam ser classificadas pela sua estrutura química, farmacologia clínica, resistência à  $\beta$ -lactamase, ou espectro de atividade, o sistema de classificação pelas gerações é muito usado, contudo evidentemente um tanto arbitrário. Essa classificação é baseada nas características da atividade terapêutica (HARDMAN et al., 2001).

A primeira geração de cefalosporinas inclui a cefalotina, cefazolina, cefaloridina, cefapirina, cefacetila, cefanona, cefazaflur, ceftazol e cefazedoran, as quais são administradas por via parenteral; e a cefalexina, cefadroxila, cefradina e cefroxadina, que são administradas por via oral. Possuem boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade reduzida contra microrganismos Gram-negativos. A maioria dos cocos Gram-positivos (com exceção de enterococos, estafilococos resistentes a metilina e *S. epidermidis*) é susceptível. A maioria dos anaeróbios da cavidade oral é sensível, mas o grupo do *Bacteroides fragilis* é resistente (HARDMAN et al., 2001; USP DI, 1998).

A segunda geração de cefalosporinas apresenta um aumento na atividade contra Gram-negativos, mas é muito menos ativa do que as de terceira geração. A segunda geração de cefalosporinas inclui cefaclor, cefamandol, cefmetazol, cefonicida, cefofetam, cefoxitina, cefprozila e cefuroxima. Um subconjunto dos agentes de segunda geração (cefoxitina, cefofetam e cefmetazol) também é ativo contra o grupo do *Bacteroides fragilis* (USP DI, 1998).

A terceira geração de cefalosporinas é menos ativa do que agentes da primeira geração contra cocos Gram-positivos, mas são mais ativas contra

Enterobacteriaceae, incluindo cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases. Na terceira geração, estão incluídas a cefixima, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftizoxima e ceftriaxona. Ceftazidima e cefoperazona, também são ativas contra *Pseudomonas aeruginosa*, mas também menos ativas do que outros agentes de terceira geração contra cocos Gram-positivos (HARDMAN et al., 2001; USP DI, 1998).

A quarta geração de cefalosporinas, da qual faz parte a cefepima, tem um amplo espectro de atividade comparado à terceira geração, incluindo a grande maioria de bacilos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e é estável à hidrólise por muitas das previamente identificadas  $\beta$ -lactamases codificadas por plasmídios. É pobre indutora e relativamente resistente às  $\beta$ -lactamases do tipo I, codificadas cromossomicamente e algumas  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. Agentes da quarta geração têm ação terapêutica contra muitas Enterobacteriaceae que são resistentes a outras cefalosporinas via indução do tipo I de  $\beta$ -lactamases, mas permanecem susceptíveis à muitas bactérias expressando  $\beta$ -lactamases de amplo espectro mediada por plasmídios (HARDMAN et al., 2001; JAWETZ et al., 1998).

A reação adversa mais comum às cefalosporinas é a irritação no local de aplicação e suas conseqüências. Dor local após a injeção intramuscular é comum, sendo menor com o uso de cefalizona e cefaloridina; flebite é um achado comum após o uso intravenoso prolongado de uma cefalosporina. Desconforto epigástrico, náuseas e diarreia podem ocorrer após uso oral. A nefrotoxicidade tem sido amplamente documentada com o uso de cefaloridina, relacionada com a dose do produto (SILVA, 2002).

Depois da absorção gastrintestinal ou infusão intravenosa, elas rapidamente alcançam picos de níveis no soro e então rapidamente difundem-se para vários tecidos no corpo. As cefalosporinas são excretadas primariamente pelos rins. Então o ajuste da dose necessita ser individualizado para pacientes com disfunções renais. As cefalosporinas atravessam a placenta e são encontradas em altas concentrações nos fluídos sinoviais e pericardial. A penetração no humor aquoso dos olhos é razoavelmente eficiente depois da administração sistêmica de agentes da terceira geração, mas a penetração no humor vítreo é pobre. Concentrações na bile geralmente são altas, sendo altos níveis encontrados com a cefoperazona (HARDMAN et al., 2001).

### 2.3.3. Cefalosporinas com ação contra *Pseudomonas aeruginosa*

A ceftazidima (Figura 6, pág. 53), uma cefalosporina de terceira geração, é uma aminotiazolil-cefalosporina semi-sintética que apresenta um grupamento carboxipropil-oximino em lugar do grupamento metoximino das demais cefalosporinas modernas. Além disso, tem um radical piridino na posição 3. Essa estrutura química provoca alguma perda de atividade contra os microrganismos Gram-positivos e anaeróbios, mas aumenta a atividade contra os Gram-negativos, em particular contra a *Pseudomonas aeruginosa*. Apresenta notável estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases produzidas pelos microrganismos Gram-negativos, entretanto, é cada vez mais freqüente o isolamento de *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* que se mostram resistentes a esses antibióticos por produzirem  $\beta$ -lactamases que os inativam. Essa resistência pode ser desenvolvida durante o tratamento devido à expressão de  $\beta$ -lactamases codificadas cromossomicamente. A ceftazidima tem pequena capacidade indutora da produção de  $\beta$ -lactamases pelos microrganismos Gram-negativos, sendo que essa propriedade só se manifesta quando empregada em altas concentrações. É apresentada sob a forma de ceftazidima penta-hidratada associada ao carbonato de sódio para facilitar sua dissolução (MARTINDALE, 2007; TAVARES, 2001).

Até recentemente, a ceftazidima era o mais potente antibiótico  $\beta$ -lactâmico contra a *Pseudomonas aeruginosa*. Sua atividade contra esse microrganismo pode ser aumentada pelos aminoglicosídeos, e o antagonismo *in vitro* tem sido relatado entre ceftazidima e cloranfenicol. Sua concentração inibitória mínima situa-se entre 8 e 12  $\mu\text{g/mL}$ , superando a ação de penicilinas, monobactâmicos, carbapemenas e outras cefalosporinas. Entretanto, essa atividade hoje em dia é menor, sobretudo em hospitais terciários de grandes cidades, onde a resistência dos bacilos Gram-negativos pode atingir mais de 30% das amostras isoladas (TAVARES, 2001).

A ceftazidima é administrada por injeção como sal sódico ou em solução com arginina. Concentrações de picos plasmáticos médios entre 17 e 39  $\mu\text{g/mL}$  têm sido relatadas aproximadamente uma hora depois da administração intramuscular de 0,5 e 1 g de ceftazidima, respectivamente. Cinco minutos depois da administração intravenosa de 0,5, 1 e 2 g de ceftazidima, concentrações médias no plasma de 45, 90 e 170  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, têm sido relatadas. A meia vida plasmática é de

cerca de 2 horas, mas esse tempo é prolongado em pacientes com problemas renais e em neonatos (MARTINDALE, 2007).

A ceftazidima é extensamente distribuída nos tecidos e fluidos do corpo; concentrações terapêuticas são encontradas no líquido cérebro espinhal quando as meninges estão inflamadas. Ela atravessa a placenta, sendo ainda excretada no leite materno e pela bile, embora somente uma pequena proporção seja eliminada por essa rota. A principal via de excreção é renal, quase exclusivamente por filtração glomerular. Cerca de 80 a 90% da droga inalterada é recuperada na urina dentro de 24 horas, sendo removida por hemodiálise e diálise peritoneal (MARTINDALE, 2007).

A cefepima (Figura 7, pág. 54) é uma aminotiazolil-metoximino-cefalosporina ativa contra enterobactérias, *Pseudomonas* e bactérias Gram-positivas, por apresentar em seu carbono 3 do núcleo cefém um radical metilpirrolidino. O fármaco é ativo sobre microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamases, tanto as de origem plasmidial como cromossômica. Não tem praticamente atividade indutora de  $\beta$ -lactamases. Constitui-se no segundo representante das cefalosporinas da quarta geração. Foi desenvolvida pelo laboratório Bristol-Myers, EUA, tendo sido introduzida em 1984 por Khan e colaboradores sob o código BMY-28142. A ação da cefepima contra a *P. aeruginosa in vitro* é comparável à da ceftazidima, sendo substancialmente maior do que a da cefotaxima e ceftriaxona, apresentando CIM igual ou inferior a 8  $\mu\text{g/mL}$  para a maioria das amostras. Contudo, sua atividade *in vitro* contra *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina, é maior do que a da ceftazidima e comparável a da cefotaxima (RYBAK, 1996; TAVARES, 2001).

Cefepima é uma das cefalosporinas que foram desenvolvidas com as características de amplo espectro de ação, estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases e favorável perfil de segurança (NEU, 1996). Cefepima parece ser adequada para monoterapia empírica para pacientes hospitalizados com moderada ou grave pneumonia, incluindo aqueles com bacteriemia simultânea, infecções complicadas do sistema renal e da pele. Sua excelente atividade contra microrganismos Gram-negativos resistentes às cefalosporinas parece estar relacionada a um aumento da penetração através da membrana externa, quando comparada às da terceira geração (SINGH, ARRIETA, 1999).

A absorção da cefepima é realizada somente por via parenteral. Após a administração de 1 g por via intravenosa (IV) é alcançado o nível sérico médio de 70 µg/mL, caindo lentamente para cerca de 4 µg/mL ao final de 12 horas. Por via intramuscular, sua absorção permite manter níveis terapêuticos por tempo semelhante. Sua meia-vida sérica é de duas horas e sua ligação protéica é pequena, por volta de 15%. A cefepima mantém concentração terapêutica nos líquidos e tecidos orgânicos, sendo ativa contra a maioria dos microrganismos sensíveis, por 10 a 12 horas. Atinge a concentração terapêutica no líquido em pacientes com meningite, sendo requeridos níveis liquóricos 55 a 95 vezes superiores à concentração inibitória mínima ativa contra os microrganismos mais freqüentemente causadores de meningites (hemófilos, pneumococos, meningococos e *E. coli*). Sua eliminação é por via renal, por filtração glomerular, na maior parte, sem sofrer metabolização (somente 10% são metabolizados). Em pacientes com insuficiência renal moderada, com *clearance* da creatinina (CC) entre 10 e 30 mL/min, é sugerida a dose, em adultos, de 500 mg uma vez ao dia; nos pacientes com insuficiência renal grave, com CC inferior a 10 mL/min é recomendada a dose diária de 250 mg por dia. A cefepima é retirada em 70% por hemodiálise e somente 26% por diálise peritoneal (TAVARES, 2001).

Segundo Neu (1996), cefepima causa mínimos efeitos adversos, sendo comparável à ceftazidima. Reações alérgicas de hipersensibilidade são extremamente raras e as hematopoiéticas de natureza séria não ocorrem. Embora granulocitopenia possa ocorrer, ela é reversível e não freqüentemente observada nas terapias com cefalosporinas. Efeito tóxico pulmonar, hepático, cardiovascular ou renal não foi notado.

#### 2.3.4. Mecanismo de ação

As bactérias, assim como as leveduras, apresentam um envoltório externo à membrana citoplasmática denominado parede celular. Essa estrutura é que lhes dá forma e rigidez e, mais importante que isso, mantém a hipertonicidade do meio interno. A parede celular é uma barreira osmótica que permite às bactérias reter nutrientes, proteínas e ácidos nucléicos em seu interior e manter certas moléculas em seu exterior. A parede celular tem constituição diferente conforme a bactéria seja

Gram-positiva ou um bacilo Gram-negativo. Todas apresentam em comum um mucopeptídeo, o peptidoglicano, um polímero mucocomplexo rígido, constituído por monômeros formados pelos açúcares aminados N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligados por pontes de aminoácidos (TAVARES, 2001).

A síntese do peptidoglicano transcorre em três etapas. A primeira realiza-se no citoplasma bacteriano, resultando na formação de monômeros compostos de um dissacarídeo formado pelo ácido murâmico e a N-acetilglucosamina ligado a um pentapeptídeo; a segunda ocorre na membrana citoplasmática, onde, graças a um transportador fosfolipídico, as moléculas de aminoaçúcares-pentapeptídeo são transportadas para o meio externo; a terceira etapa realiza-se no espaço periplásmico (ou correspondente espaço extracelular nos microrganismos Gram-positivos), sucedendo a polimerização, onde os pares de aminoaçúcares-pentapeptídeos são ligados entre si, originando-se longas cadeias polissacarídicas, formando-se o polímero peptidoglicano que irá compor a parede e o septo da bactéria em divisão (HARDMAN et al., 2001).

Sendo o peptidoglicano o principal elemento que configura a rigidez da parede, responsável pela manutenção da maior pressão interna nas bactérias, as substâncias que interferem na síntese desse elemento, certamente causarão um efeito destrutivo sobre a bactéria. É o que ocorre com as penicilinas, cefalosporinas, a fosfomicina, vancomicina e outros glicopeptídeos, que inibem a síntese da parede celular por agirem em várias etapas da formação do mucopeptídeo (TAVARES, 2001).

As cefalosporinas, da mesma forma que as penicilinas, inibem a formação do peptidoglicano ao se ligarem de maneira irreversível às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) números 1b e 3, inibindo sua ação. Essas PBPs são proteínas situadas na face externa da membrana citoplasmática, que tem atividade enzimática de transpeptidases e de carboxipeptidases, participando de maneira fundamental na terceira etapa da biossíntese das novas moléculas de peptidoglicano e sua incorporação no peptidoglicano preexistente na parede celular da bactéria em divisão. Embora estes antibióticos atuem em diferentes fases da síntese, o resultado será o mesmo, havendo ausência da parede celular ou formação de uma frágil parede defeituosa ou ausência de formação dos septos que dividem as células em multiplicação. Como conseqüência, a bactéria não conseguirá sobreviver, pois, devido a hipertonicidade intracelular, entrará água do meio externo para o meio



interno e por fim ocorrerá a lise bacteriana (HARDMAN et al., 2001, TAVARES, 2001).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos da encapsulação da ceftazidima e da cefepima individualmente em lipossomas unilamelares quanto à atividade antimicrobiana do fármaco sobre a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### 3.2. Específicos

- Obter e caracterizar dispersões coloidais de lipossomas unilamelares contendo a ceftazidima e a cefepima encapsuladas individualmente;
- Determinar a eficiência de encapsulação da ceftazidima e cefepima nesses lipossomas unilamelares;
- Avaliar a ação antimicrobiana da ceftazidima e cefepima livres e encapsuladas em lipossomas unilamelares, através da determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima, frente às metodologias estabelecidas pelo CLSI/NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2005).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Material

#### 4.1.1. Substâncias e reagentes

- Fosfatidilcolina de soja (Lipoid, Gmb);
- Colesterol (Avanti Polar Lipids, lote CH-33);
- Alfa-tocoferol (Sigma, lote 45H1047);
- Clorofórmio, etanol (grau analítico);
- Sephadex G-50 Fine (Amersham Bioscience);
- Metanol, acetonitrila (grau HPLC);
- Membrana de acetato de celulose (CelluSep), MWCO: 12.000-14.000;
- Água ultra pura Milli-Q;
- Solução de NaCl 0,9%;
- Caldo Miller-Hinton e ágar Miller-Hinton (Merck);
- Agar Casoy e Caldo Casoy (Merck);
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- Bateria de Corantes para Gram.

#### 4.1.2. Equipamentos

- Processador ultrassônico, marca Misonix, modelo XL 2020;
- Espectrofotômetro Ultravioleta-Visível (UV-VIS), marca Varian, modelo Cary 50;
- Cromatógrafo líquido acoplado a detectores de massas, marca Varian, modelo 1200 L triplo quádruplo;
- Zetasizer Nano S, marca Malvern Instruments, UK, modelo ZEN1600;
- Centrífuga, marca Sigma, modelo 3-18 K;
- Balança Analítica, Marca Gehaka, modelo AG-200;
- pHmetro, marca Gehaka, modelo PG1000;
- Agitador magnético, marca Tecnal, modelo TE-085;
- Agitador tipo vórtex, marca Phoenix, modelo AP-56;

- Lavadora ultra-sônica, marca Unique, modelo USC1400;
- Geladeira;
- Freezer;
- Banho-maria termostatzado;
- Estufas Incubadoras;
- Cabine de Segurança Biológica Classe II – Tipo A2;
- Autoclave.

#### 4.1.3. Vidrarias e utensílios diversos

- Placas de Petri;
- Tubos de ensaio;
- Balão de fundo redondo de 50 mL;
- Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL;
- Pipetas volumétricas e graduadas de 1, 2, 3, 5 e 10 mL;
- Alça de platina;
- Espátulas de inox;
- Erlenmeyers;
- Macrocontroladores;
- Pipetas automáticas;
- Garras;
- Colunas cromatográficas de vidro.

## 4.2. Substâncias teste

### 4.2.1. Antimicrobianos

Ceftazidima (Figura 6): pó cristalino branco ou quase branco, sendo livremente solúvel em água e praticamente insolúvel em álcool (ADVAN PHARMA CHEM CO.,LTD, China, lote 6117CJ81J-A). Apresentando fórmula molecular  $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2 \cdot 5H_2O$ , peso molecular de 636,65 g/mol, teor de umidade de 12,0%, carbonato de sódio 118 mg/1g de ceftazidima (10,56%) e teor de ceftazidima ativa de 72,38%.

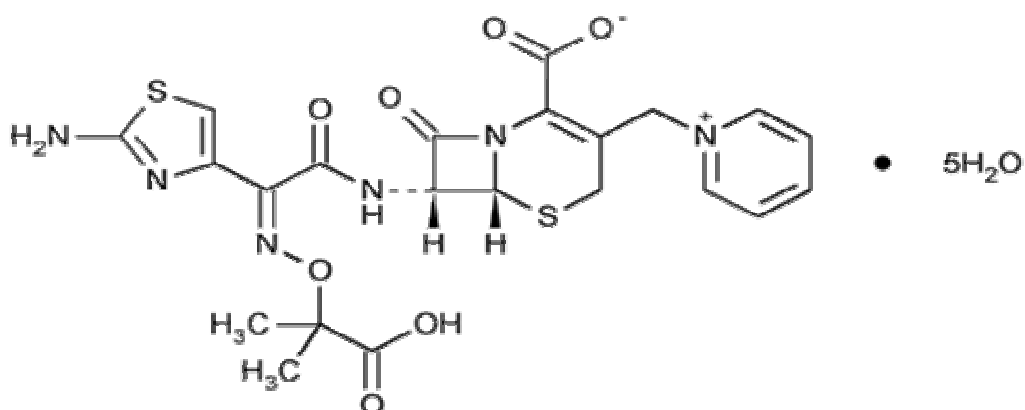


Figura 6: Fórmula estrutural da ceftazidima

Cefepima (Figura 7); pó branco ou levemente amarelado e altamente solúvel em água (Alembic- lote 10016867). Apresentando fórmula molecular  $C_{19}H_{25}ClN_6O_5S_2 \cdot HCl \cdot H_2O$  e peso molecular de 571,5 g/mol, teor de umidade de 4,0%, teor de L-arginina de 725 mg/1g de cefepima (42%) e teor de cefepima ativa de 54%.

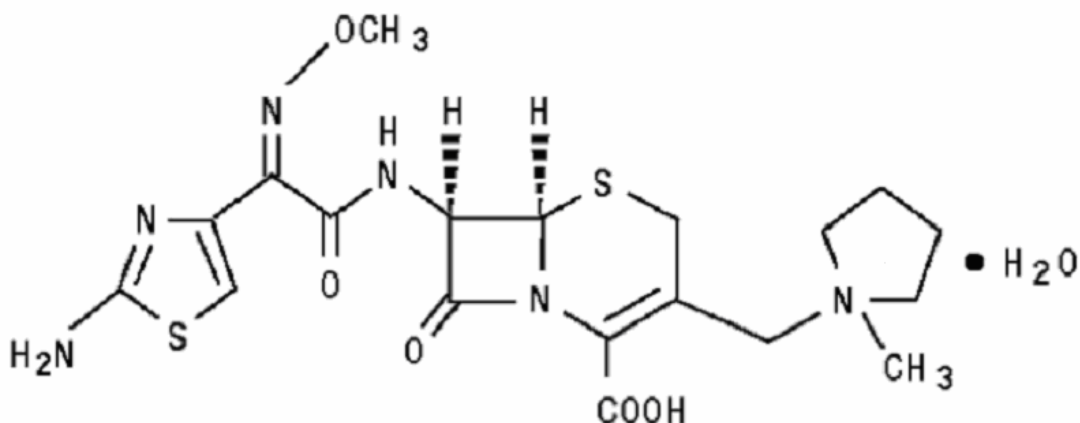


Figura 7: Fórmula estrutural da cefepima

#### 4.2.2. Padrões primários

Ceftazidima: *Official Chemical Reference Standard Ceftazidime* - Lot n°1b – *European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance* (Ph. Eur. CRS), contendo 85,5% de ceftazidima sobre a base anidra.

Cefepima (Cloridrato de cefepima): *Official Chemical Reference Standard 1097636 Cefepime Hydrochloride*: LOT G0D116 – *United States Pharmacopeia* (USP), contendo 860 µg de cefepima por mg de cloridrato de cefepima sobre a base anidra.

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Preparação do filme lipídico

Os lipossomas foram preparados empregando a metodologia de hidratação do filme lipídico (BANGHAM et al., 1965).

Na preparação dos lipossomas, foi utilizada fosfatidilcolina de soja na concentração de 40 mM, colesterol na concentração de 10 mM e 20 mM e  $\alpha$ -tocoferol na concentração de 0,04 mM.

Os filmes lipídicos secos para a obtenção dos lipossomas foram preparados da seguinte maneira: a fase orgânica, constituída da fosfatidilcolina de soja, colesterol e alfa-tocoferol dissolvidos em clorofórmio, foi colocada em um balão de fundo redondo, onde se formou um filme por evaporação do clorofórmio induzida por atmosfera de nitrogênio.

#### 4.3.2. Preparação de lipossomas com ceftazidima e cefepima (BANGHAM et al., 1965)

Foram preparadas soluções de ceftazidima e cefepima em solução de NaCl a 0,9% em concentrações decrescentes para se determinar em qual concentração se obtinha melhores eficiências de encapsulação (Tabelas 1 e 2). Após a hidratação por 30 minutos, os balões foram levados ao agitador tipo vórtex, obtendo-se uma dispersão leitosa formada por uma mistura heterogênea de vesículas multilamelares (MLV) e fragmentos de bicamadas que, após 10 minutos de sonicação em processador ultrassônico resultou em uma preparação semitransparente contendo vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de tamanho uniforme.

Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 05 minutos, para promover a remoção de qualquer vestígio de titânio oriundo da sonda de sonicação.

Tabela 1: Perfil da concentração da ceftazidima utilizada na preparação dos lipossomas (PC fosfatidilcolina de soja).

Formulação	Componentes				
	Ceftazidima		PC (mM)	Colesterol (mM)	Solução de NaCl 0,9%
	mg	Ceftazidima ativa (72,38%)			
1	300	217,14	40	10	4 mL
2	300	217,14	40	20	4 mL
3	200	144,76	40	10	4 mL
4	200	144,76	40	20	4 mL
5	120	86,86	40	10	4 mL
6	120	86,86	40	20	4 mL
7	80	57,90	40	10	4 mL
8	80	57,90	40	20	4 mL

Tabela 2: Perfil da concentração da cefepima utilizada na preparação dos lipossomas (PC fosfatidilcolina de soja).

Formulação	Componentes				
	Cefepima		PC (mM)	Colesterol (mM)	Solução de NaCl 0,9%
	mg	Cefepima Ativa (54,0%)			
1	500	270	40	20	4 mL
2	400	216	40	20	4 mL
3	320	172,8	40	20	4 mL
4	160	86,4	40	20	4 mL

#### 4.3.3. Medida do diâmetro dos lipossomas

A determinação do tamanho das vesículas foi realizada empregando a técnica de espalhamento de luz em equipamento ZetaSizer Nano, técnica não invasiva, que permite a análise da distribuição e medida do tamanho das vesículas formadas neste processo de interação (*Dynamic Light Scattering*, em [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk); LIMA, 1995).

Uma alíquota (1,5 mL) de cada amostra foi introduzida na cubeta do equipamento e analisada a 25°C. Em cada leitura, foi obtido o diâmetro médio, que



corresponde ao diâmetro médio aproximado dos lipossomas. A distribuição do tamanho das vesículas foi determinada utilizando o índice de polidispersibilidade, o qual é medido pela extensão da distribuição do tamanho das vesículas na amostra (MÜLLER et al., 2004).

#### 4.3.4. Determinação dos parâmetros analíticos para a ceftazidima e cefepima

##### 4.3.4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da ceftazidima e cefepima por espectrofotometria

Foram realizadas varreduras de espectros de absorção no intervalo de comprimento de onda de 200 a 450 nm de soluções de ceftazidima e de cefepima (individualmente) em NaCl a 0,9% na concentração de 0,005 mg/mL.

##### 4.3.4.2. Determinação da curva de calibração da ceftazidima e da cefepima por espectrofotometria

Foram preparadas soluções estoques individuais de ceftazidima (Ph. Eur. CRS), e cefepima padrão USP nas concentrações de 1,0 mg/mL em solução de NaCl a 0,9%. Estas soluções foram diluídas seqüencialmente, obtendo-se as concentrações de 100 µg/mL; 50 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL e 1 µg/mL. A leitura no espectrofotômetro foi realizada separadamente e em duplicata no comprimento de onda de 254 nm para a ceftazidima e de 255 nm para a cefepima.

##### 4.3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica em CLAE foi realizada em equipamento Varian modelo ProStar 240, com injetor automático e detector UV/VIS. A coluna utilizada para a ceftazidima e cefepima foi a C18 250 x 4,6 mm, sendo que a fase móvel para a ceftazidima foi constituída de 2% de acetonitrila e 98% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector a 254 nm, e a fase móvel para a cefepima foi constituída

de 10% de acetonitrila e 90% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector a 255 nm.

#### 4.3.4.4. Determinação da curva de calibração da ceftazidima e da cefepima por CLAE

Foram preparadas soluções estoque individuais de ceftazidima (Ph. Eur. CRS), e cefepima (padrão USP) nas concentrações de 1,0 mg/mL em NaCl a 0,9%. Estas soluções foram diluídas seqüencialmente, obtendo-se as seguintes concentrações: 100 µg/mL; 50 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL e 1 µg/mL, as quais foram injetadas separadamente, de modo isocrático e em duplicata, conforme as condições descritas em 4.3.4.3.

#### 4.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação da ceftazidima e cefepima em lipossomas unilamelares

##### 4.3.5.1. Separação do fármaco livre

A separação do fármaco não encapsulado nos lipossomas (ceftazidima e cefepima) foi efetuada por cromatografia de exclusão por tamanho (GABRIELLE-MADELMONT et al., 2003). Foi utilizada uma coluna de vidro de 25 cm x 1 cm de diâmetro interno, empacotada com 5 g de Sephadex G50.

Quinhentos microlitros das preparações lipossomais foram aplicadas sobre a coluna de sephadex, e a eluição foi promovida pela solução de NaCl 0,9%. Após a aplicação, frações de aproximadamente 1,0 mL foram coletadas e cada fração foi submetida à leitura de absorvância em espectrofotômetro para monitoramento da eluição dos lipossomas e do fármaco. A quantidade do fármaco livre foi calculada com base na curva de calibração feita previamente.

##### 4.3.5.2. Cálculo da eficiência de encapsulação

A quantificação da ceftazidima e da cefepima encapsuladas foi efetuada pelas técnicas de espectrofotometria e por cromatografia líquida de alta eficiência. Os

cálculos foram efetuados com base nas respectivas curvas de calibração, através das leituras das amostras resultantes do rompimento dos lipossomas presentes nas frações contendo o fármaco encapsulado.

Para a determinação espectrofotométrica, o rompimento dos lipossomas foi realizado com etanol, sendo adicionados 2 mL de etanol para cada 1 mL da fração de lipossomas eluída da coluna de Sephadex, com posterior homogeneização. A solução obtida foi levada ao espectrofotômetro e a absorvância lida em seu comprimento de onda de máxima absorção, sendo o branco constituído de 2 mL de etanol e 1 mL de solução de NaCl a 0,9%.

Para a determinação cromatográfica, a amostra foi injetada diretamente no cromatógrafo nas condições especificadas anteriormente.

A eficiência de encapsulação (EC) foi determinada em função da quantidade total de ceftazidima e cefepima adicionadas na preparação dos lipossomas, como também pela razão da quantidade de fármaco encapsulado por miligrama de fosfatidilcolina.

#### 4.3.6. Estudo da estabilidade das preparações de ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas

##### 4.3.6.1. Perda do fármaco encapsulado (vazamento) durante o armazenamento

Para verificar possível perda do material encapsulado, a preparação de lipossomas foi avaliada quanto à sua eficiência de encapsulação para a ceftazidima e para a cefepima, imediatamente após a preparação e após 24, 48, 72 e 96 horas de acondicionamento a 4°C. A eficiência de encapsulação foi determinada por CLAE.

#### 4.3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (RUKHOLM et al., 2006)

##### 4.3.7.1. Preparação do inóculo

A bactéria utilizada foi a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, preconizada pelo NCCLS M7-A6 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition*, 2003), a qual foi repicada em ágar caseína-soja inclinado e incubado a 35°C por 24 horas. Algumas colônias, desenvolvidas em ágar caseína-soja, foram transferidas para salina estéril até a obtenção de uma turbidez óptica comparável à metade da escala 1,0 de McFarland, as quais foram observadas contra um cartão de fundo branco e linhas contrastantes pretas.

##### 4.3.7.2. Padronização do inóculo

A fim de se verificar que a concentração final do inóculo obtida rotineiramente no teste de macrodiluição em caldo, para a determinação da CIM e CBM, foi de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, e no teste de difusão em ágar foi de  $5 \times 10^8$  UFC/mL, foram realizadas anteriormente à realização dos ensaios e a cada ensaio, a partir da suspensão padronizada à metade da escala 1,0 de McFarland, diluições seriadas até a  $10^{-8}$ , as quais foram semeadas e enumeradas pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se o ágar caseína-soja, com incubação a 35°C por 24 horas, as quais estão descritas na Tabela 3 e demonstradas na Figura 8.

Tabela 3: Parâmetros da padronização da suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Contagens Média das Diluições ( $10^{-1}$ a $10^{-5}$ )	Média
$3,1 \times 10^6$	
$5,1 \times 10^6$	
$4,7 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$
$5,8 \times 10^6$	
$4,8 \times 10^6$	

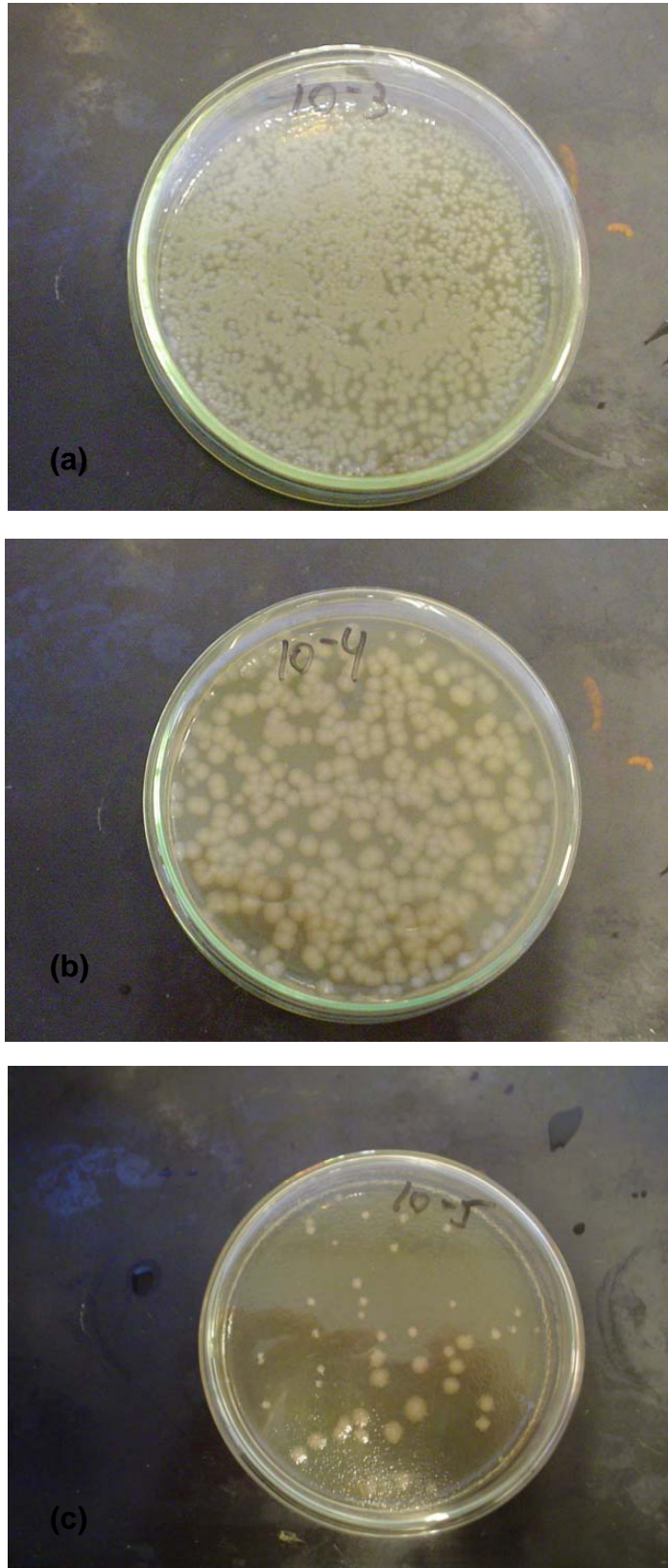


Figura 8: Padronização da suspensão bacteriana da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
(a) Plaqueamento da suspensão bacteriana na diluição a  $10^{-3}$   
(b) Plaqueamento da suspensão bacteriana na diluição a  $10^{-4}$   
(c) Plaqueamento da suspensão bacteriana na diluição a  $10^{-5}$

#### 4.3.7.3. Preparo dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima

Os antimicrobianos ceftazidima e cefepima foram pesados individualmente e diluídos em solução de NaCl a 0,9% e quantificados por espectrofotometria para que se encontrasse concentração de 5120 µg/mL, as quais foram filtradas em membrana de 0,22 µm, e transferidas para tubo de ensaio estéril. A partir desta solução estoque foram realizadas, assepticamente, diluições em caldo Mueller-Hinton, as quais apresentaram as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL.

#### 4.3.7.4. Preparo dos lipossomas de ceftazidima e cefepima para o ensaio microbiológico

As suspensões dos lipossomas de ceftazidima e cefepima foram filtradas em membrana de 0,22 µm e transferidas para tubo de ensaio estéril. Foram quantificadas por espectrofotometria e então diluídas assepticamente em caldo Mueller-Hinton para que apresentassem as concentrações de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL.

#### 4.3.7.5. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de macrodiluição em caldo

Volumes correspondentes a um mililitro das diluições dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima em caldo Mueller-Hinton, com as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, foi transferido para tubos de ensaio estéreis de 13 x 100 mm, onde foi acrescentado 1 mL da suspensão bacteriana padronizada para se obter uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após a adição da suspensão bacteriana, cada tubo resultou em uma diluição de 1:2 de cada agente antimicrobiano. Foram utilizados também um tubo controle positivo, contendo somente o caldo e a suspensão bacteriana, e um tubo controle negativo contendo somente o caldo Mueller-Hinton.

#### 4.3.7.6. Determinação da concentração inibitória mínima dos lipossomas unilamelares encapsulados com ceftazidima e cefepima pelo teste de macrodiluição em caldo

Volumes correspondentes a um mililitro das diluições dos lipossomas contendo ceftazidima e cefepima em caldo Mueller-Hinton, com as concentrações de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL, foi transferido para tubos de ensaio estéreis de 13 x 100mm, aos quais foram acrescentadas 1 mL da suspensão bacteriana padronizada para se obter uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após a adição da suspensão bacteriana, cada tubo resultou em uma diluição de 1:2 de cada agente antimicrobiano. Foram utilizados também um tubo controle positivo, contendo somente o caldo e a suspensão bacteriana, e um tubo controle negativo contendo somente o caldo Mueller-Hinton.

#### 4.3.7.7. Incubação dos tubos e interpretação dos resultados

Os tubos foram incubados a 35°C por 18 a 24 horas, nos quais foi verificada a menor concentração, tanto dos padrões primários, quanto dos lipossomas contendo os antimicrobianos, capazes de inibir o crescimento bacteriano.

#### 4.3.8. Determinação da concentração bactericida mínima (RUKHOLM et al., 2006)

##### 4.3.8.1. Preparação do inóculo

Foi preparado como descrito em 4.3.7.1

##### 4.3.8.2. Padronização do inóculo

Foi padronizado como descrito em 4.3.7.2.

#### 4.3.8.3. Preparo dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima

Foram preparados como descrito em 4.3.7.3.

#### 4.3.8.4. Preparo dos lipossomas de ceftazidima e cefepima para o ensaio microbiológico

As suspensões dos lipossomas de ceftazidima e cefepima, após quantificação por espectrofotometria, foram filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e transferidas para tubo de ensaio estéril. Foram então diluídas assepticamente em caldo Mueller-Hinton para que apresentassem as concentrações de 32, 16, 8  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.3.8.5. Determinação da concentração bactericida mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de macrodiluição em caldo

Volumes correspondes a um mililitro das diluições dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima em caldo Mueller-Hinton, com as concentrações de 2 vezes a CIM, 4 vezes a CIM e 8 vezes a CIM, foi transferido para tubos de ensaio estéreis de 13 x 100 mm, onde foi acrescentado 1 mL da suspensão bacteriana padronizada para se obter uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. A adição da suspensão bacteriana cada tubo resultou em uma diluição de 1:2 de cada agente antimicrobiano, correspondendo às concentrações finais de 1 vez a CIM, 2 vezes a CIM e 4 vezes a CIM de ambos os antibióticos. Foram utilizados também um tubo controle positivo, contendo somente o caldo e a suspensão bacteriana, e um tubo controle negativo contendo somente o caldo Mueller-Hinton.



#### 4.3.8.6. Determinação da concentração bactericida mínima dos lipossomas unilamelares encapsulados com ceftazidima e cefepima pelo teste de macrodiluição em caldo

Volumes correspondentes a um mililitro das diluições dos lipossomas contendo ceftazidima e cefepima em caldo Mueller-Hinton, com as concentrações de 2 vezes a CIM, 4 vezes a CIM e 8 vezes a CIM, foi transferido para tubos de ensaio estéreis de 13 x 100 mm, aos quais foi acrescentado 1 mL da suspensão bacteriana padronizada para se obter uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após a adição da suspensão bacteriana cada tubo resultou em uma diluição de 1:2 de cada agente antimicrobiano. Foram utilizados também um tubo controle positivo, contendo somente o caldo e a suspensão bacteriana, e um tubo controle negativo contendo somente o caldo Mueller-Hinton.

#### 4.3.8.7. Incubação dos tubos e interpretação dos resultados

Os tubos foram incubados a 35°C, e nos intervalos de 2, 6 e 24 horas de incubação, foi retirado 1 mL de cada uma das concentrações e realizada diluição até  $10^{-5}$  com posterior plaqueamento em duplicata pela técnica de semeadura em profundidade, a fim de se determinar qual concentração e em que tempo, tanto dos antimicrobianos livres, quanto dos lipossomas contendo os antimicrobianos, haveria a redução dos microrganismos inoculados em 99,9%.

#### 4.3.9. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres pelo teste de difusão em agar

##### 4.3.9.1. Preparação do inóculo

Foi preparado como descrito em 4.3.7.1.

#### 4.3.9.2. Padronização do inóculo

Foi padronizado como descrito em 4.3.7.2.

#### 4.3.9.3. Preparação do Ágar Mueller-Hinton

O ágar Mueller-Hinton foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente conforme as instruções do fabricante. Imediatamente após autoclavação, o mesmo foi resfriado em banho-maria entre 45 e 50°C, e cerca de 25 a 30 mL foram distribuídos em placas de Petri de 100 mm de diâmetro. O meio foi resfriado em capela de fluxo laminar. As placas foram testadas quanto à sua esterilidade, incubando-se uma amostra representativa do lote manipulado em estufa bacteriológica entre 30 e 35°C por 24 horas. As placas não utilizadas no mesmo dia foram armazenadas em geladeira (de 2 a 8°C), e foram utilizadas somente até sete dias após a sua preparação.

#### 4.3.9.4. Inoculação das placas de teste

Um swab de algodão estéril foi mergulhado na suspensão microbiana padronizada, e a seguir pressionado na parede interna do tubo, acima do nível do líquido, retirando-se assim o excesso do líquido. A superfície do ágar Mueller-Hinton foi inoculada com o microrganismo pela fricção do swab em várias.

A tampa da placa foi deixada entreaberta de três a cinco minutos, permitindo assim que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os cilindros com os antimicrobianos.

#### 4.3.9.5. Aplicação dos cilindros de inox com os antimicrobianos livres e encapsulados em lipossomas unilamelares

Os cilindros de inox, previamente esterilizados, foram colocados sobre o ágar inoculado, sendo respeitado um número máximo de 5 cilindros por placa de Petri

com 100 mm de diâmetro. Após o posicionamento dos cilindros, foram colocados 0,2 mL das soluções dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres com a concentração de 30 e 15 µg e 0,2 mL dos lipossomas de ceftazidima e cefepima com as concentrações de 30, 15, 8, 4 µg. Foram também adicionados cilindros de inox com lipossomas sem os fármacos, sendo que todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,22 µm.

#### 4.3.9.6. Incubação das placas e interpretação dos resultados

As placas foram incubadas a 35°C por 16 a 18 horas. Os diâmetros das zonas de completa inibição foram medidos, incluindo o diâmetro dos cilindros de inox.

As concentrações da ceftazidima e de cefepima livres e encapsuladas em lipossomas que apresentaram diâmetros dos halos de inibição  $\geq 18$ mm, conforme preconizado pelo NCCLS M7-A6 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition, 2003*), foram consideradas como apresentando atividade antimicrobiana satisfatória.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção dos lipossomas

Os resultados mostrados nas Figuras 9 a 11 representam a distribuição de tamanho das populações lipossomais expressos pela medida de intensidade do espalhamento de luz em relação ao diâmetro das vesículas submetidas a diferentes tempos de sonicação. Estes resultados permitem observar, através da média do tamanho dos lipossomas (diâmetro médio) e da polidispersibilidade (PDI) que, com dois minutos de sonicação, as amostras apresentam-se distribuídas em diferentes populações, com predomínio de vesículas multilamelares com elevado tamanho (lipossomas e fragmentos de bicamada). Entretanto, com o tempo de sonicação, a amostra se apresenta mais homogênea e com vesículas de menor tamanho.

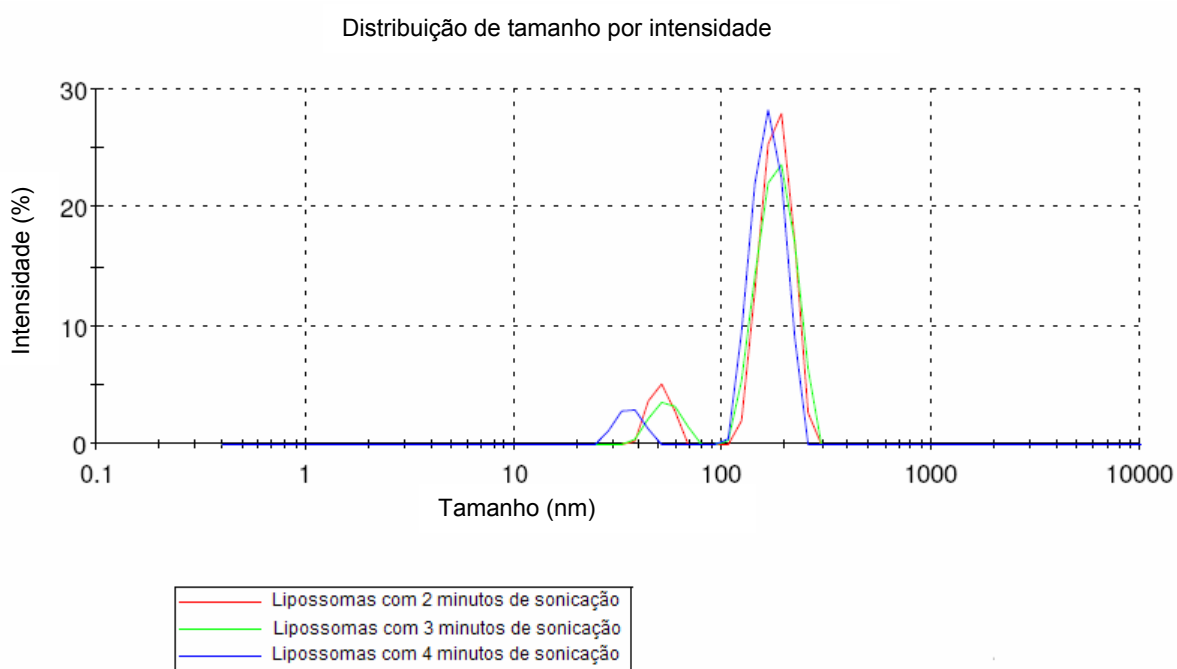


Figura 9: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 2, 3 e 4 minutos de sonicação

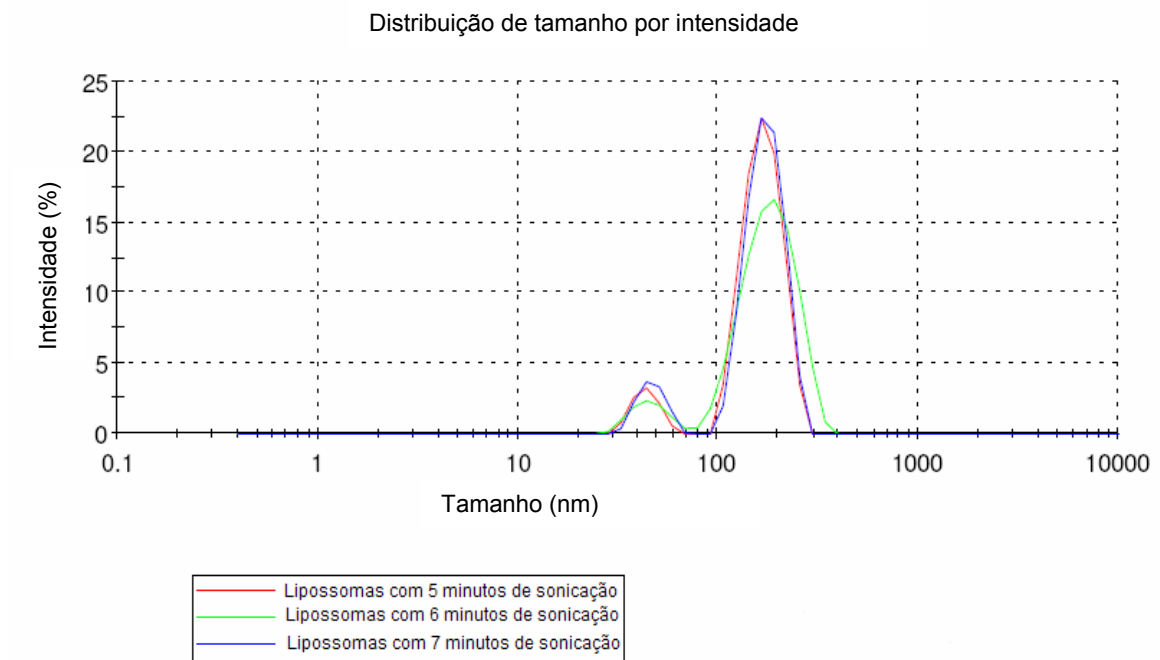


Figura 10: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 5, 6 e 7 minutos de sonicação.

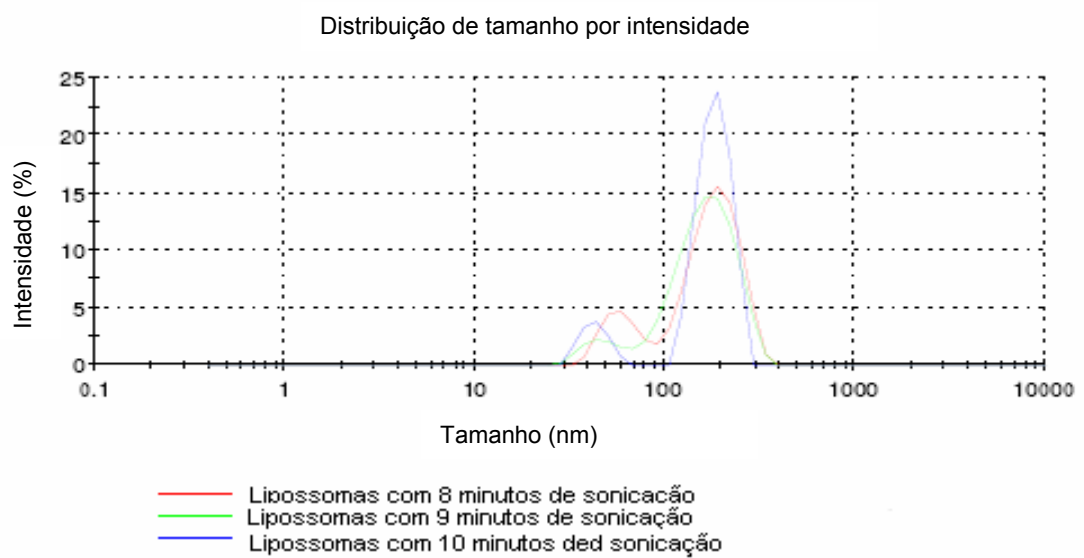


Figura 11: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco em 8, 9 e 10 minutos de sonicação.

A Tabela 4 permite observar a diminuição do diâmetro dos lipossomas frente ao processo de sonicação, mostrando como este processo leva à obtenção de lipossomas de tamanho bastante reduzido, bem como a obtenção de uma suspensão coloidal de lipossomas mais homogênea, comprovado pela baixa polidispersibilidade. Por meio da Figura 12 foi possível verificar claramente esta evolução.

Tabela 4: Perfil do tamanho dos lipossomas pela técnica de espalhamento de luz.

Tempo de Sonicação (minutos)	Diâmetro médio dos lipossomas (nm)	Polidispersibilidade
1	1400	1,000
2	840	0,828
3	549	0,693
4	521	0,667
5	417	0,559
6	379	0,543
7	359	0,500
8	353	0,506
9	324	0,509
10	234	0,472
10 (pós-coluna de cromatografia por exclusão)	148	0,207

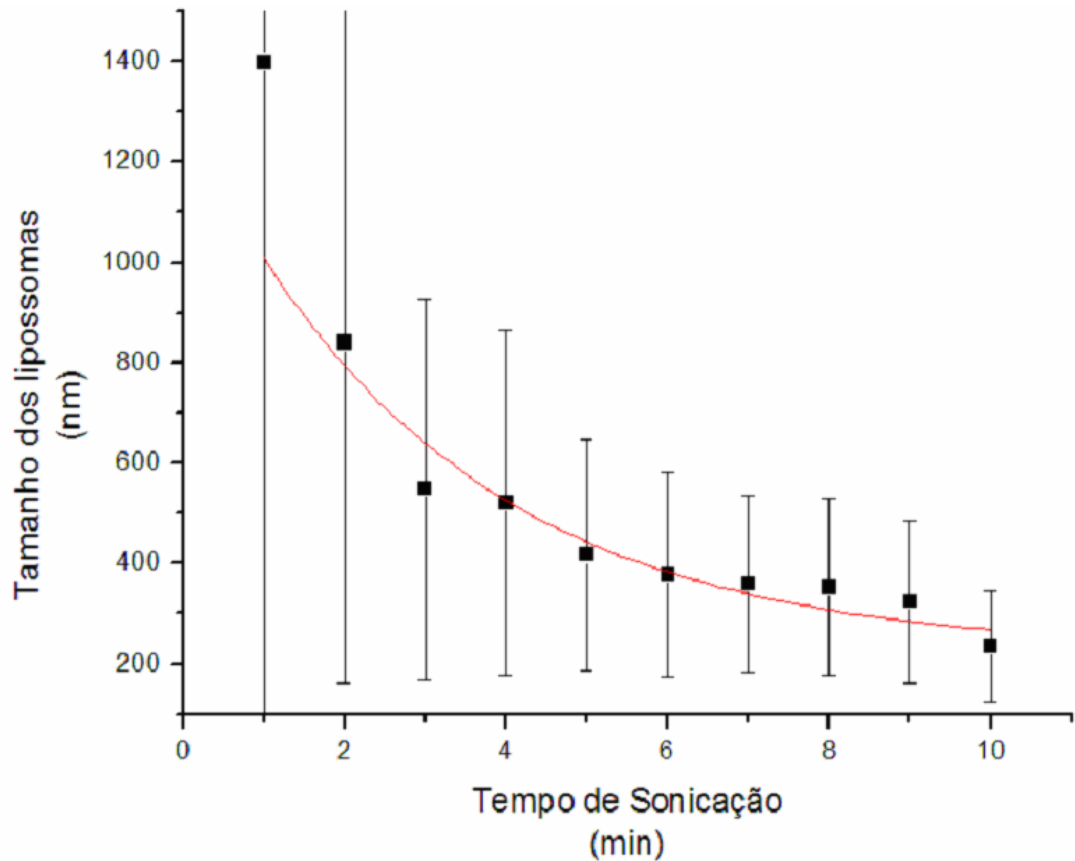


Figura 12: Perfil de formação de lipossomas pela técnica de espalhamento de luz frente ao tempo de sonicação: tamanho dos lipossomas e polidispersibilidade.

Na Figura 13, observa-se que a técnica de cromatografia por exclusão contribui para a obtenção de uma população de lipossomas mais homogênea, comprovada pela baixa polidispersibilidade detectada pelo método de medida de intensidade de espalhamento de luz. Portanto, o método de hidratação do filme lipídico, seguido de sonicação da dispersão aquosa de fosfolipídios auto-organizados em vesículas, permitiu obter lipossomas unilamelares de pequeno diâmetro que se aproxima de 100 nm e de distribuição bastante homogênea.

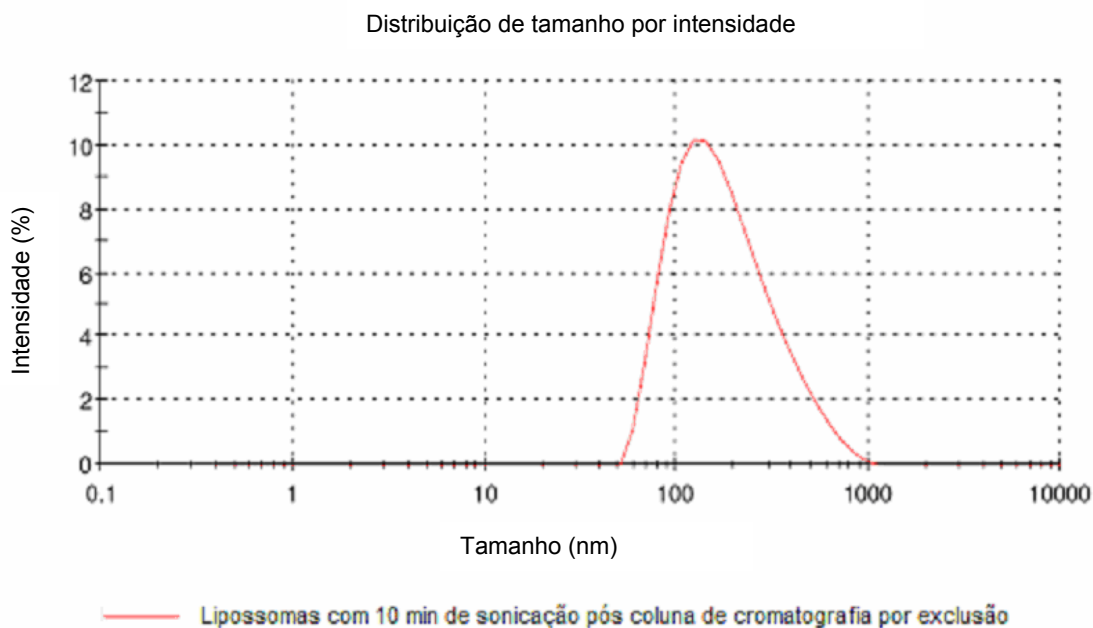


Figura 13: Intensidade do espalhamento de luz das amostras de lipossomas sem fármaco com 10 minutos de sonicação pós-coluna de cromatografia por exclusão.

## 5.2. Determinação da eficiência de encapsulação da ceftazidima e cefepima em lipossomas unilamelares

### 5.2.1. Determinação dos parâmetros analíticos para a ceftazidima

#### 5.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da ceftazidima por espectrofotometria

Após a realização da varredura de espectros de absorção no intervalo de comprimento de onda de 200 a 450 nm de uma solução de ceftazidima em NaCl a 0,9% na concentração de 0,005 mg/mL, a absorção máxima exibida para a ceftazidima foi no comprimento de onda de 254 nm (Figura 14), a qual foi utilizada nas análises espectrofotométricas posteriores.



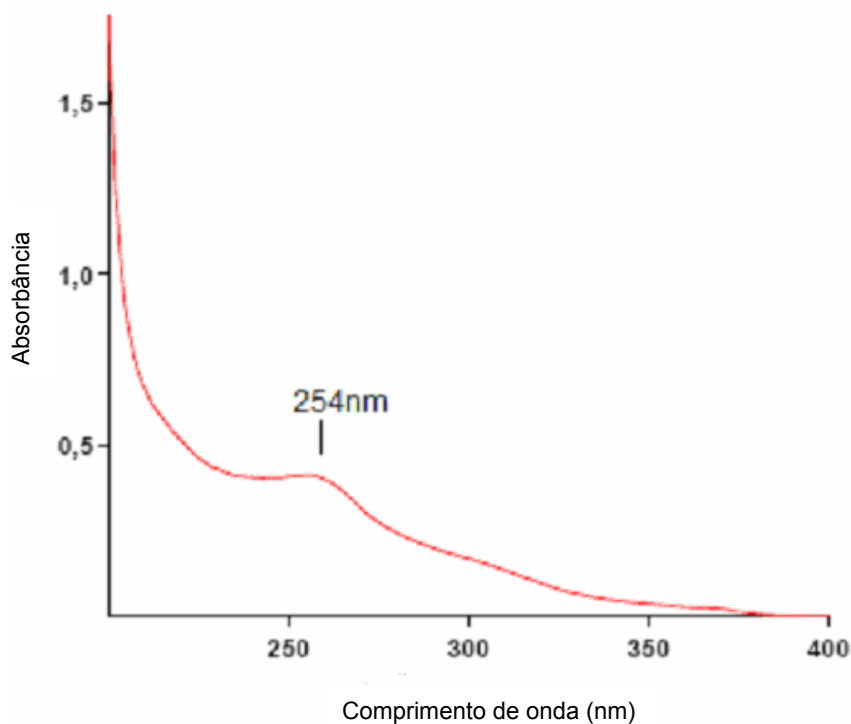


Figura 14: Varredura do espectro de absorção da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS na região do ultravioleta.

#### 5.2.1.2. Determinação da curva de calibração da ceftazidima por espectrofotometria

Após a leitura realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 254 nm, das soluções de padrão primário Ph. Eur. CRS de ceftazidima, conforme descrito em 4.3.4.2, obteve-se pela regressão linear da curva, o coeficiente de correlação de 0,99989 (Figura 15), expressa pela equação:

$$y = 31,61936 \times \text{concentração} - 0,00334$$

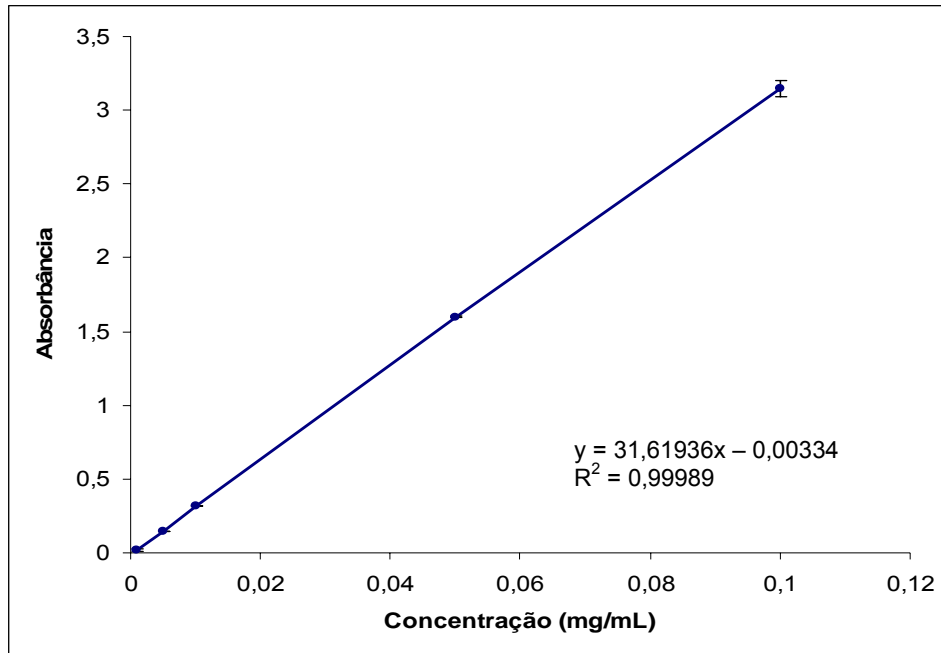


Figura 15: Curva de calibração da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS, em NaCl a 0,9% por espectrofotometria.

#### 5.2.1.3. Determinação da Curva de Calibração da Ceftriaxona por CLAE

Após injeção das soluções de ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS, conforme descrito em 4.3.4.4 (Figura 16), e em duplicata no equipamento Varian modelo ProStar 240, obteve-se a regressão linear da curva (Figura 17), a qual gerou o coeficiente de correlação de 0,999861, expressa pela equação:

$$y = + 1.040552e + 007x$$

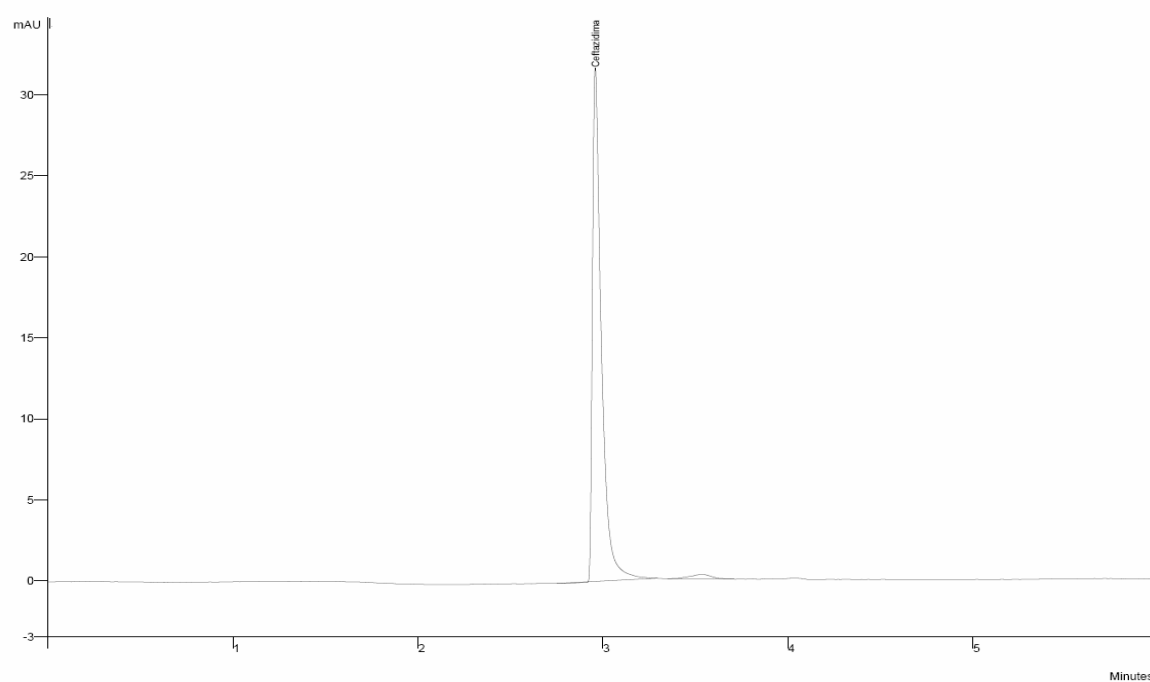


Figura 16: Cromatograma da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS

Condições cromatográficas: coluna C18 250 x 4,6 mm, fase móvel constituída de 2% de acetonitrila e 98% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector UV a 254 nm.

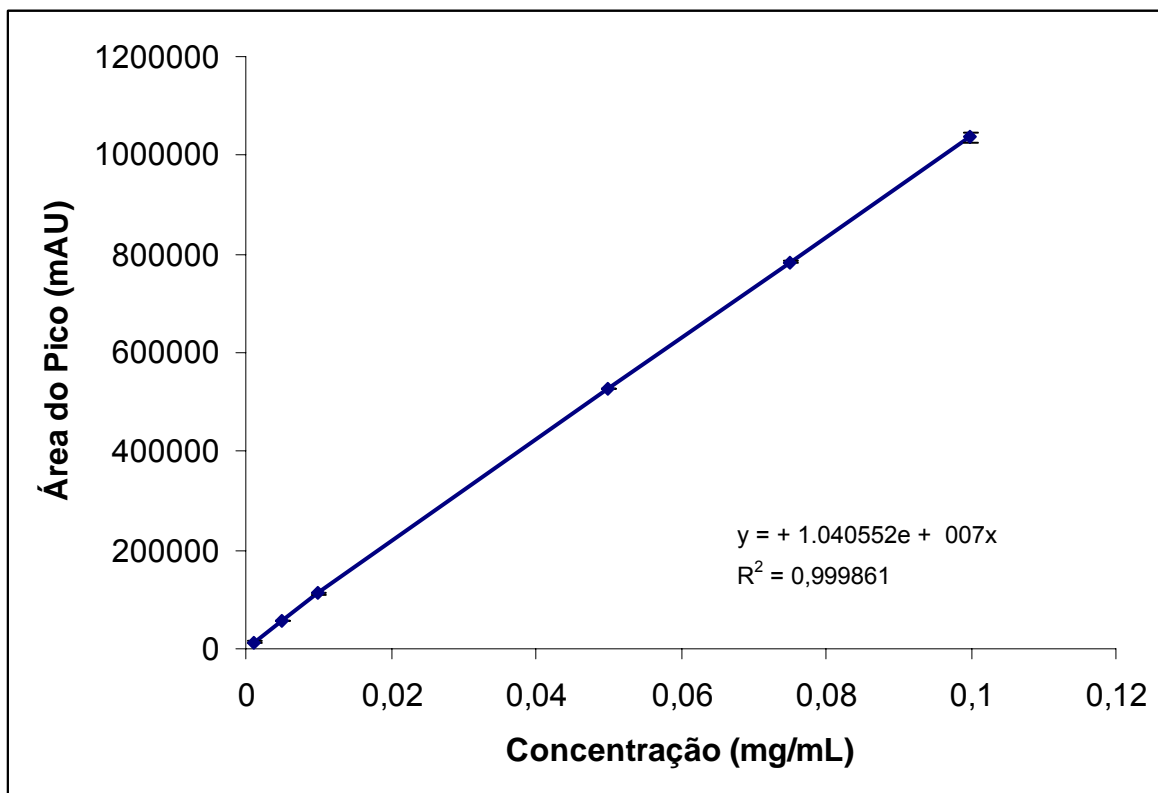


Figura 17: Curva de calibração da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS em NaCl a 0,9% por CLAE.

## 5.2.2. Determinação dos parâmetros analíticos para a cefepima

### 5.2.2.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da cefepima por espectrofotometria

Após a realização da varredura de espectros de absorção no intervalo de comprimento de onda de 200 a 450 nm de uma solução de cefepima em solução de NaCl a 0,9% na concentração de 0,005 mg/mL, a absorção máxima exibida para a cefepima foi no comprimento de onda de 255 nm (Figura 18), o qual foi utilizado nas análises espectrofotométricas posteriores.



Figura 18: Varredura do espectro de absorção da cefepima padrão USP na região do ultravioleta

#### 5.2.2.2. Determinação da curva de calibração da cefepima por espectrofotometria

Após a leitura realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 255 nm das soluções de cefepima padrão USP, conforme descrito em 4.3.4.2, obteve-se, pela regressão linear da curva, o coeficiente de correlação de 0,99991 (Figura 19), expressa pela equação:

$$y = 31,26178 \times \text{concentração} + 0,01480$$

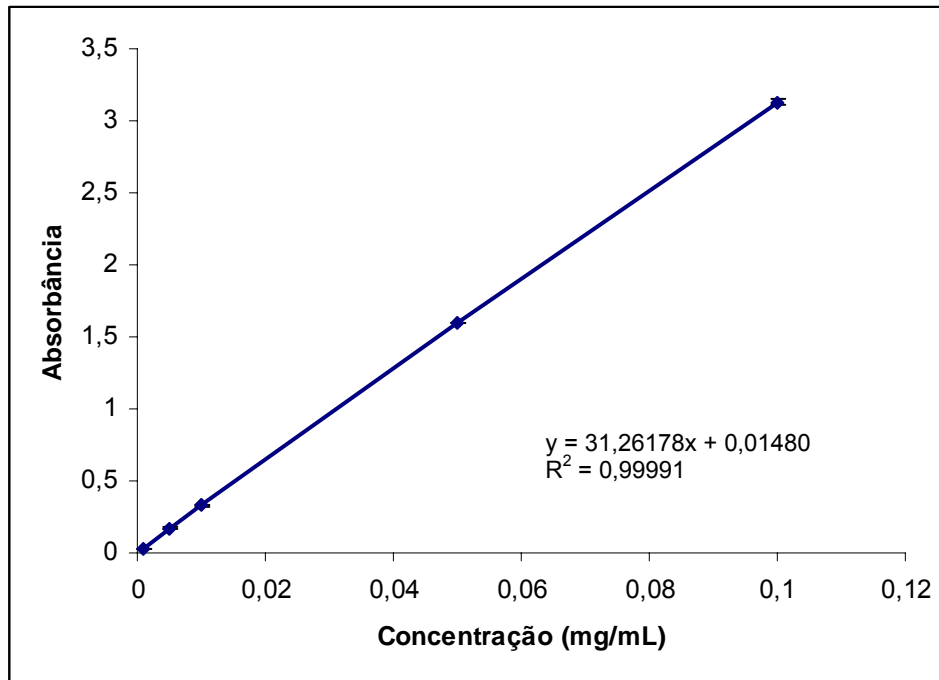


Figura 19: Curva de calibração da cefepima Padrão USP em NaCl a 0,9% por espectrofotometria.

#### 5.2.2.3. Determinação da Curva de Calibração da Cefepima por CLAE

Após injeção utilizando as soluções de cefepima padrão USP, conforme descrito em 4.3.4.4 (Figura 20), e em duplicata no equipamento Varian modelo ProStar 240, obteve-se a regressão linear da curva (Figura 21), a qual gerou o coeficiente de correlação de 0,999994, expressa pela equação:

$$y = +8,513701e + 006x + 6,232648e +002$$

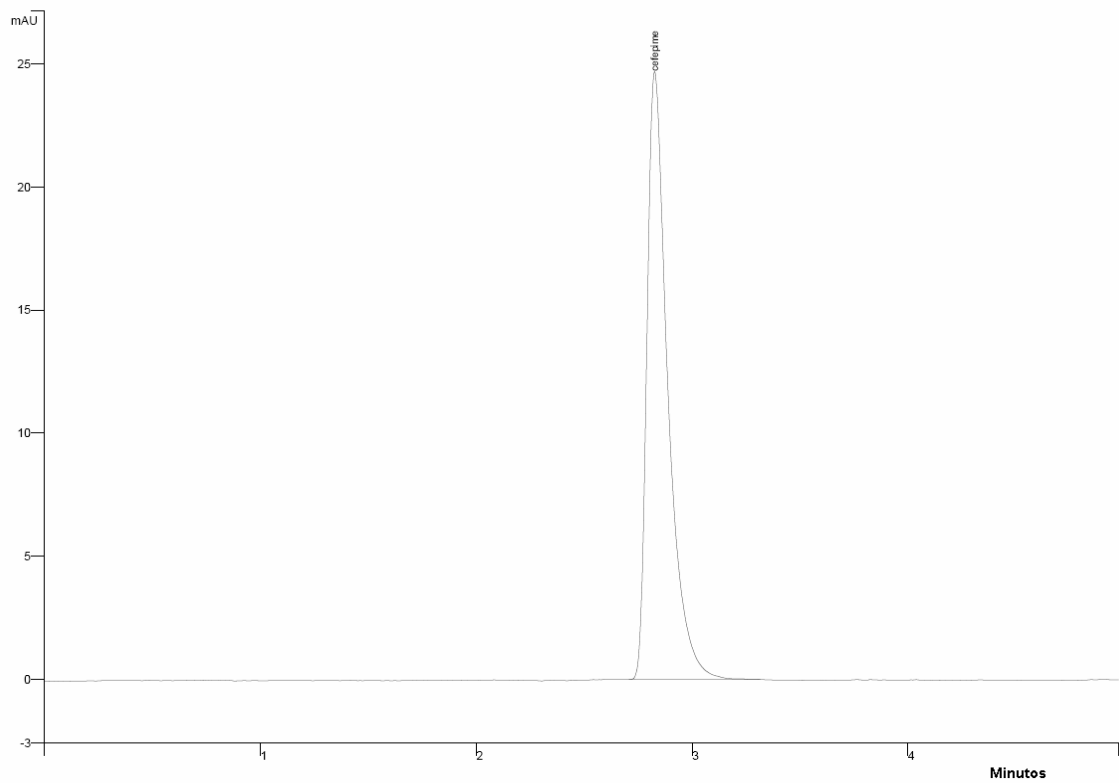


Figura 20: Cromatograma da cefepima padrão USP

Condições Cromatográficas: coluna C18 250 x 4,6 mm, fase móvel constituída de 10% de acetonitrila e 90% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector UV a 255 nm.

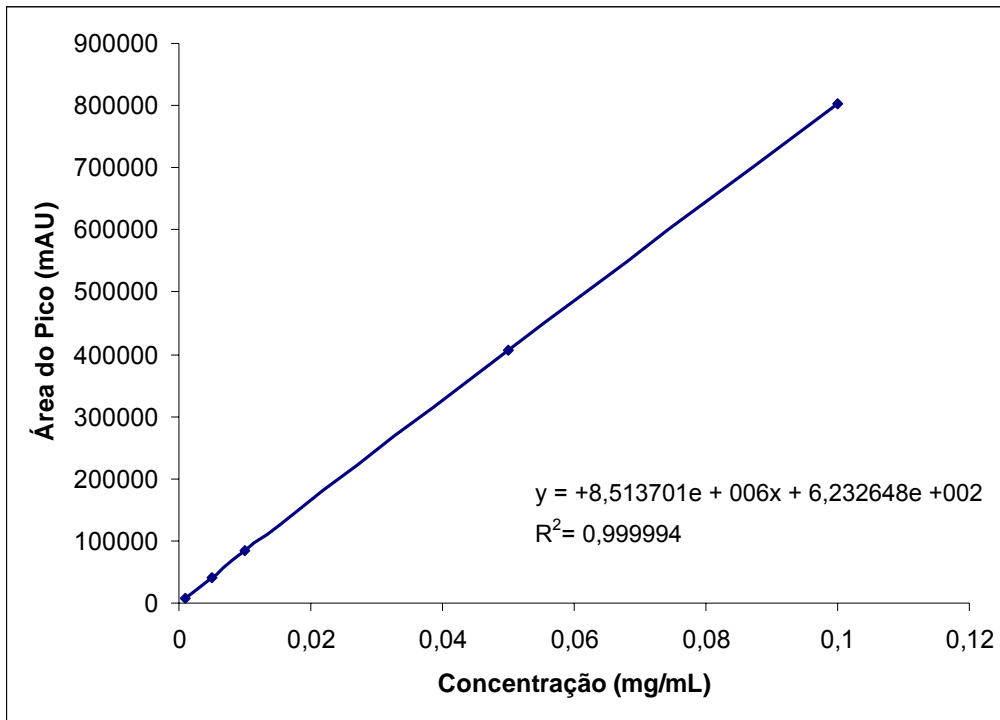


Figura 21: Curva de calibração da cefepima Padrão USP em NaCl a 0,9% por CLAE.

### 5.3. Separação do Fármaco Livre

Para determinar o perfil de eluição dos lipossomas através da coluna de separação Sephadex G 50, foram aplicados 2,0 mL da amostra contendo lipossomas vazios e promovida sua eluição com o auxílio da solução de NaCl a 0,9%. Foram coletadas frações de 1,5 mL, as quais foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. O perfil de eluição dos lipossomas está representado na Figura 22.



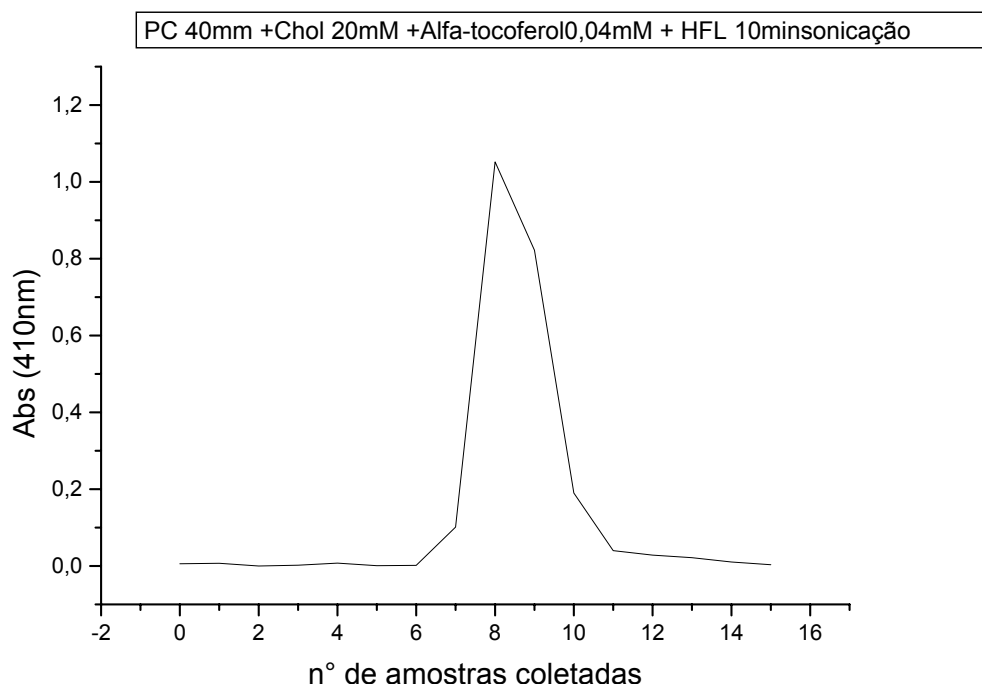


Figura 22: Perfil de eluição dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 410 nm.

Conforme demonstrado, a presença de lipossomas na amostra promove o aumento da absorção da luz visível (410 nm) medida em espectrofotômetro. Desta maneira, a leitura de cada fração eluída permitiu observar que os lipossomas deixam a coluna de separação nas frações de 7 a 11.

A separação das frações de lipossomas contendo ceftazidima ou cefepima podem ser observadas nas Figuras 23 e 24, respectivamente. As leituras realizadas em 254 nm, que corresponde ao comprimento de onda de maior absorção para a ceftazidima, e 255 nm para cefepima, permitem observar a eluição tanto dos lipossomas quanto do fármaco livre. A eluição da ceftazidima encapsulada nos lipossomas ocorreu nas frações de 7 a 11 e, do fármaco livre, nas frações de 22 a 26. Para a cefepima encapsulada nos lipossomas, a eluição ocorreu também nas frações de 7 a 11 e da cefepima livre ocorreu nas frações de 20 a 24. Esta separação ocorre devido ao tamanho dos componentes da amostra, uma vez que os lipossomas contendo o fármaco encapsulado apresentam diâmetro (e massa molecular) muitas vezes superior ao do fármaco em sua forma livre, o que resulta em uma eluição mais rápida pela coluna enquanto que o fármaco livre sofre retardo na sua eluição, ficando temporariamente retido nos poros da coluna.

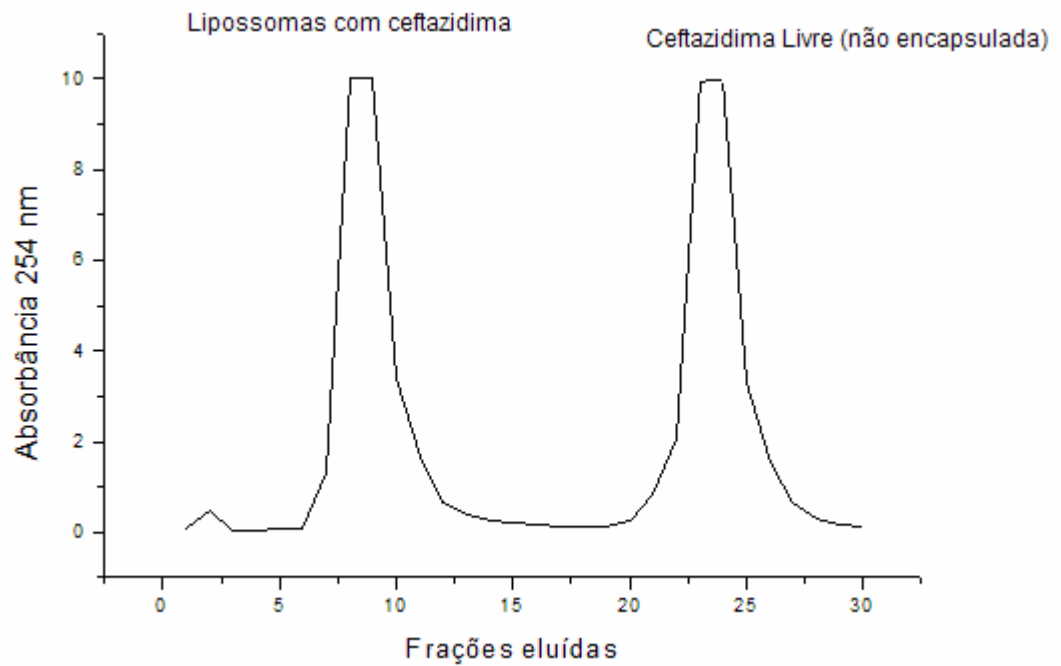


Figura 23: Perfil de eluição em Sephadex G 50 das frações de lipossomas contendo a ceftazidima encapsulada (7-11) e livre (22-26)

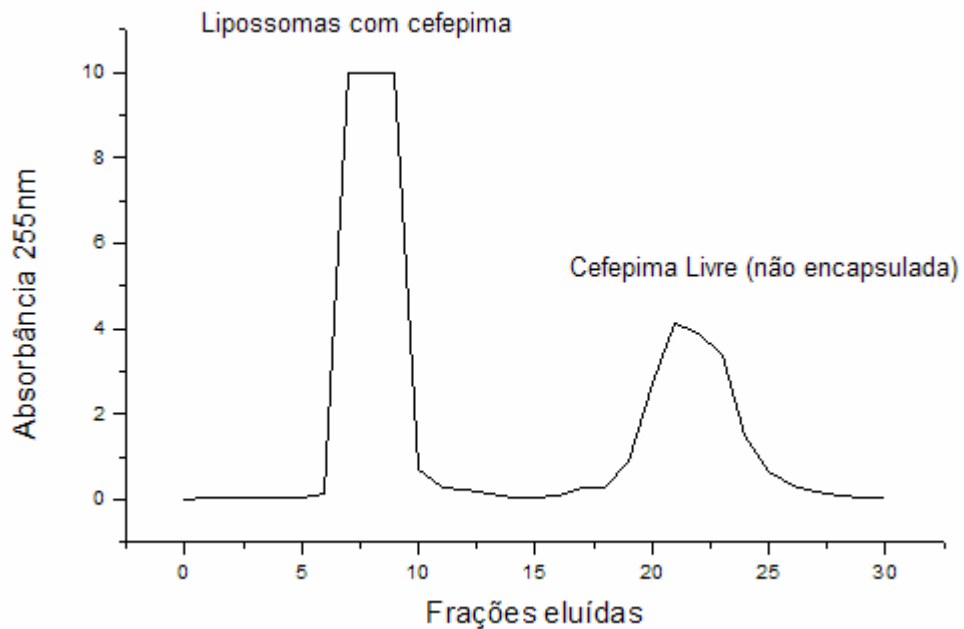


Figura 24: Perfil de eluição em Sephadex G 50 das frações de lipossomas contendo a cefepima encapsulada (7-11) e livre (20-24)

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho, além de possibilitar a separação do fármaco encapsulado em lipossomas, permite comprovar a homogeneidade da preparação lipossomal, uma vez que promove a separação por grupos de estruturas de tamanho semelhante. Após a eluição pela coluna cromatográfica, as frações contendo lipossomas com ceftazidima ou cefepima encapsuladas foram homogeneizadas (separadamente) e reanalisadas por espalhamento de luz. Os resultados desta análise estão representados nas Figuras 25 e 26 respectivamente, demonstrando a existência de uma única população de vesículas.

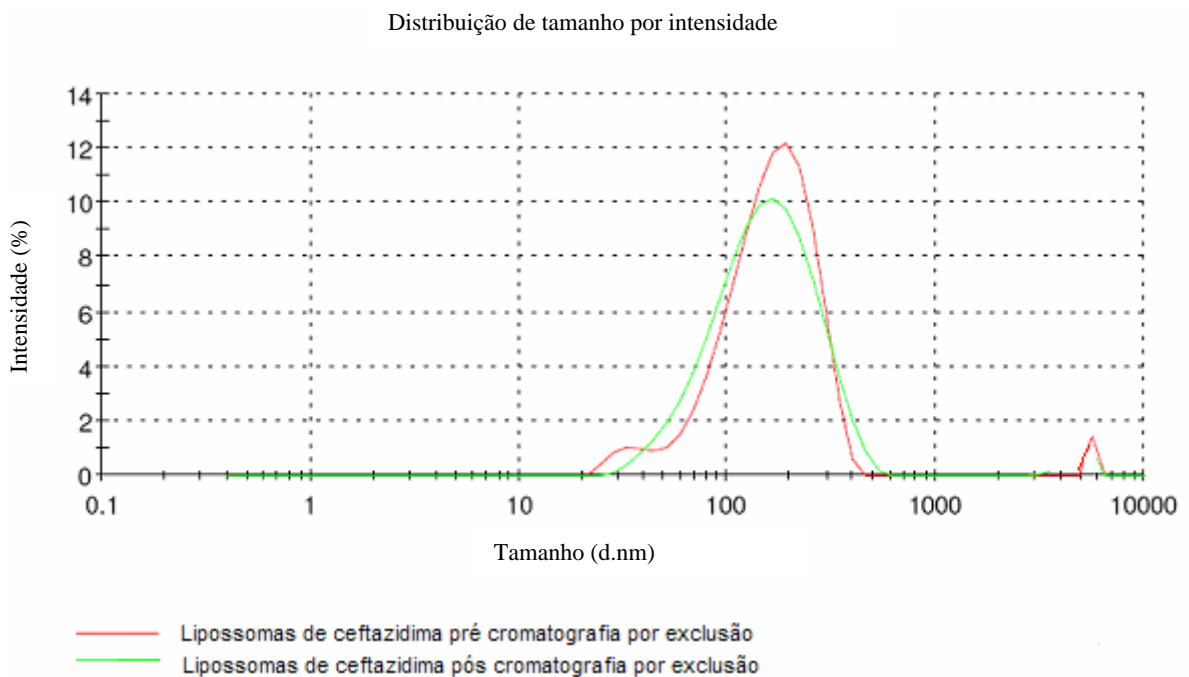


Figura 25: Intensidade de espalhamento de luz das amostras de lipossomas com ceftazidima pela técnica de espalhamento de luz.

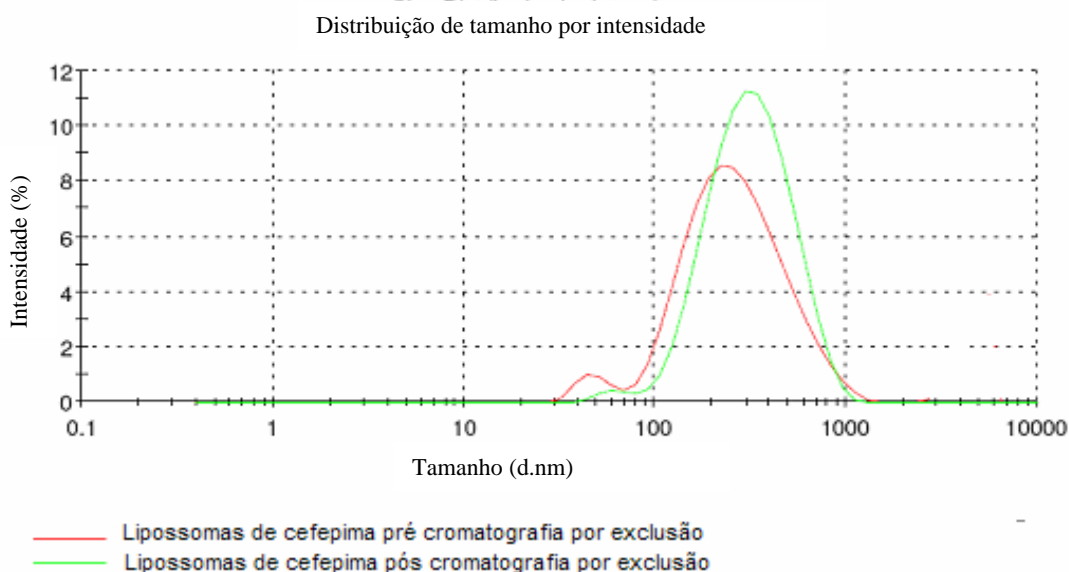


Figura 26: Intensidade de espalhamento de luz das amostras de lipossomas com cefepima pela técnica de espalhamento de luz.

#### 5.4. Cálculo da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada para as amostras de lipossomas preparadas com diferentes concentrações de ceftazidima e cefepima, conforme descrito em 4.3.2.

Para realizar a quantificação do fármaco encapsulado nas frações separadas pela cromatografia de exclusão, as vesículas foram rompidas empregando-se etanol na proporção de 1:2, conforme descrito anteriormente. Portanto, 3 mL das frações de SUV reunidas foram adicionadas a 6 mL de etanol, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro. Para exemplificar esta análise, os dados apresentados a seguir referem-se à preparação utilizando 19,2 mg de ceftazidima.

Pela equação da curva padrão Ph. Eur. CRS de ceftazidima determinada espectrofotometricamente (Figura 15), foi calculada a concentração de ceftazidima de 0,006 mg/mL encontrada no volume de 9 mL, formados por 3 mL das frações de lipossomas coletadas na coluna, mais 6 mL de etanol. Logo, a concentração de ceftazidima nas frações de lipossomas foi calculada multiplicando-se este valor por 9 e dividindo-o por 3. Sendo assim, foi encontrada a concentração de 0,018 mg em 1 mL da fração de lipossomas contendo ceftazidima. A quantidade total de ceftazidima que eluiu da coluna foi  $0,018 \times 21,0 \text{ mL} = 0,378 \text{ mg}$  de ceftazidima, que corresponde

à quantidade de ceftazidima que eluiu da coluna na forma encapsulada em lipossomas após a aplicação de 2 mL da amostra. Multiplicando-se este valor por 4, foi encontrada a quantidade de ceftazidima encapsulada nos 8 mL de lipossomas preparados inicialmente:  $0,378 \times 4 = 1,512$  mg de ceftazidima.

Calcula-se a eficiência de encapsulação pelas seguintes fórmulas:

$$EC (\%) = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ceftazidima}_E)}{\text{Total de fármaco adicionado (ceftazidima}_A)} \times 100$$

$$\text{Ceftazidima}_E = 1,512 \text{ mg}$$

$$\text{Ceftazidima}_A = 19,2 \text{ mg}$$

$$\mathbf{EC = 7,8\%}$$

$$\text{Razão Ceftazidima}_E/\text{PC} = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ceftazidima}_E)}{\text{Total de fosfatidilcolina nos lipossomas}}$$

$$\text{Ceftazidima}_E = 1,512 \text{ mg}$$

$$\text{PC}_{\text{total}} = 240 \text{ mg}$$

$$\mathbf{\text{Razão Ceftazidima}_E/\text{PC} = 0,0063}$$

$$\text{Razão Molar Ceftazidima}_E/\text{PC} = \frac{\text{Concentração Molar de fármaco encapsulado (ceftazidima}_E)}{\text{Concentração Molar de fosfatidilcolina nos lipossomas}}$$

$$\text{Ceftazidima}_E = 1,512 \text{ mg} = 0,34 \text{ mM (PM} = 546,58 \text{ g/mol)}$$

$$\text{PC}_{\text{total}} = 240 \text{ mg} = 40 \text{ mM}$$

$$\mathbf{\text{Razão Molar Ceftazidima}_E/\text{PC} \approx 1:10^2}$$

Para a obtenção de dispersões coloidais de lipossomas com máxima eficiência de encapsulação, foram utilizadas concentrações individuais e decrescentes dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima. Nas preparações de ceftazidima com 217,14 mg/4 mL e da cefepima com 270 mg/4mL não se conseguiu separar pela técnica de cromatografia por exclusão, o fármaco livre do encapsulado devido a grande concentração dos antimicrobianos na solução. Portanto, tanto para

a ceftazidima como para a cefepima, foram utilizadas concentrações inferiores, conforme 4.3.2.

Os resultados apresentados na Tabelas 5 e 6 para ceftazidima são referentes às preparações dos lipossomas com diferentes concentrações desse antimicrobiano. Como a encapsulação da ceftazidima ocorre no interior das vesículas, no meio hidrofílico encapsulado, o colesterol (10 e 20 mM) foi empregado para aumentar a rigidez da bicamada, reduzindo assim a tendência de perda do material encapsulado por vazamento através da membrana lipídica. Pode ser observado que quando o dobro da concentração molar de colesterol (20 mM) foi utilizado, o diâmetro médio das vesículas foi aumentado, o que também ocasionou o aumento da quantidade de fármaco encapsulado – devido ao maior volume interno das vesículas formadas com esta concentração de colesterol.

A maior eficiência de encapsulação por mL da dispersão coloidal de lipossomas foi encontrada para a preparação contendo 20 mM de colesterol e 144,76 mg de ceftazidima na preparação, sendo esta preparação utilizada nos ensaios microbiológicos.

Tabela 5: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 10 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação Ceftaz<sub>A</sub> – ceftazidima adicionada à preparação; Ceftaz<sub>E</sub> – ceftazidima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo)

Ceftaz <sub>A</sub> (mg)	Eficiência de Encapsulação				Diâmetro Médio (nm)	PDI	Média n=12	DPR
	Ceftaz <sub>E</sub> (mg)	EC (%)	Ceftaz <sub>E</sub> mg/mL	Razão Ceftazidima /PC				
57,90	2,72	4,70	0,027	0,02268	120	0,350	0,023	15,72
86,86	4,48	5,09	0,045	0,0516	117	0,389	0,041	8,015
144,76	7,80	5,39	0,081	0,065	119	0,375	0,075	4,27

Tabela 6: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação; Ceftaz<sub>A</sub> – ceftazidima adicionada à preparação; Ceftaz<sub>E</sub> – ceftazidima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo)

Ceftaz <sub>A</sub> (mg)	Eficiência de Encapsulação				Diâmetro Médio (nm)	PDI	Média n=12	DPR
	Ceftaz <sub>E</sub> (mg)	EC (%)	Ceftaz <sub>E</sub> mg/mL	Razão Ceftazidima /PC				
57,90	3,12	5,38	0,030	0,0260	130	0,282	0,026	10,66
86,86	4,692	5,40	0,051	0,0391	135	0,279	0,046	8,63
144,76	8,36	5,77	0,150	0,0697	131	0,258	0,142	3,68

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7, os quais representam as eficiências de encapsulação nos lipossomas de cefepima, também preparados com diferentes concentrações do fármaco, mas somente com a concentração de 20 mM de colesterol, a maior porcentagem de eficiência de encapsulação em relação ao total de fármaco adicionado, foi encontrada com a concentração de 172,8 mg. Por outro lado, a maior concentração de cefepima por mL de preparação lipossomal foi encontrada na preparação com 432 mg de cefepima. Isto se deve ao fato de que quando a eficiência de encapsulação é calculada em porcentagem e em relação ao total de fármaco adicionado à preparação; quanto menor a quantidade de fármaco acrescentada à preparação, maior será a porcentagem de eficiência de encapsulação, uma vez que as quantidades de fármaco encapsuladas não diferem muito de uma concentração para a outra, uma vez atingido o limite de encapsulação para os lipossomas. A eficiência de encapsulação de 0,150 mg/mL para a ceftazidima e de 0,132 mg/mL para a cefepima, demonstra ser uma preparação com grandes potenciais para aplicação farmacêutica.

Tabela 7: Parâmetros de tamanho das vesículas e eficiência de encapsulação da cefepima em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja 40 mM, colesterol 20 mM e alfa-tocoferol 0,04 mM, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, com sonicação de 10 minutos. (EC – Eficiência de Encapsulação; Cefep<sub>A</sub> – cefepima adicionada à preparação; Cefep<sub>E</sub> – cefepima encapsulada; PDI – polidispersibilidade; DPR – Desvio Padrão Relativo).

Cefep <sub>A</sub> (mg)	Eficiência de Encapsulação				Diâmetro Médio (nm)	PDI	Média n=12	DPR
	Cefep <sub>E</sub> (mg)	EC (%)	Cefep <sub>E</sub> mg/mL	Razão Cefepima/ PC				
172,8	6,3648	3,68	0,078	0,0265	151	0,267	0,069	7,52
345,6	6,864	1,98	0,126	0,0286	128	0,278	0,115	5,36
432	9,8784	2,29	0,132	0,0411	150	0,323	0,118	4,76

A encapsulação de antimicrobianos hidrossolúveis vem sendo estudada por vários pesquisadores e os resultados obtidos neste trabalho, que apresentaram eficiências de encapsulação entre 2,29 a 5,77% concordam com aqueles apresentados por Antos et al. (1995); Omri, Ravaoarino (1996), os quais demonstraram eficiências de encapsulação com fosfatidilcolina de soja e com fosfatidilcolina de ovo variando de 3,0 a 5,3%, respectivamente. Índices semelhantes (3,7% e 4,51%) de encapsulação foram obtidos por Omri et al. (2002) e Rukholm et al. (2006) ao encapsularam polimixina B e gentamicina em lipossomas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-fosfatidilcolina (DPPC)/chol (2:1) e 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC)/chol (2:1).

Ainda, Drulis-Kawa et al. (2006), encapsularam meropenem, um antimicrobiano hidrossolúvel, em lipossomas com várias composições lipídicas, incluindo fosfolipídios sintéticos, naturais e também lipossomas com ambos os fosfolipídios e obtiveram eficiências de encapsulação variando entre 3,7 e 7,2%, mostrando que a eficiência de encapsulação para fármacos hidrossolúveis não difere muito em relação a sua composição lipídica.

Entretanto, todos os resultados citados acima diferem bastante daqueles descritos por Park et al. (2003), os quais demonstram uma eficiência de encapsulação para a cefoxitina de 75,4%. Estes autores obtiveram lipossomas com diâmetro superior a 600 nm, os quais, embora possuindo maior diâmetro interno e em conseqüência, maior volume para a encapsulação do material hidrossolúvel,



representam um sistema mais instável, uma vez que vesículas unilamelares grandes têm grande tendência à fusão, aglomeração e ocasionando perda do material encapsulado.

## 5.5. Estudo da estabilidade das preparações de ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares

### 5.5.1 Perda do fármaco encapsulado - vazamento durante o armazenamento

Os ensaios realizados a partir dos lipossomas preparados pelo método de hidratação do filme lipídico com 40 mM de PC, 20 mM e 10 mM de colesterol e 0,04 mM de alfa-tocoferol e hidratados com soluções de ceftazidima em NaCl a 0,9% na concentração de 36,19 mg/mL e de cefepima em NaCl a 0,9% na concentração de 54 mg/mL, para verificar possível perda do fármaco encapsulado durante o armazenamento, mostraram um valor significativo tanto da ceftazidima quanto da cefepima encapsulada. Os dados mostrados na Tabela 8 e 9 foram calculados respectivamente, pela equação da curva de calibração da ceftazidima e da cefepima determinada por CLAE (Figura 17 e 21, respectivamente). Conforme demonstrado pela sobreposição dos cromatogramas da ceftazidima e da cefepima padrão e dos lipossomas desses antimicrobianos (Figuras 27 e 28, respectivamente), a técnica de CLAE utilizada pode ser empregada satisfatoriamente para a análise quantitativa tanto da ceftazidima quanto da cefepima encapsulada em lipossomas.



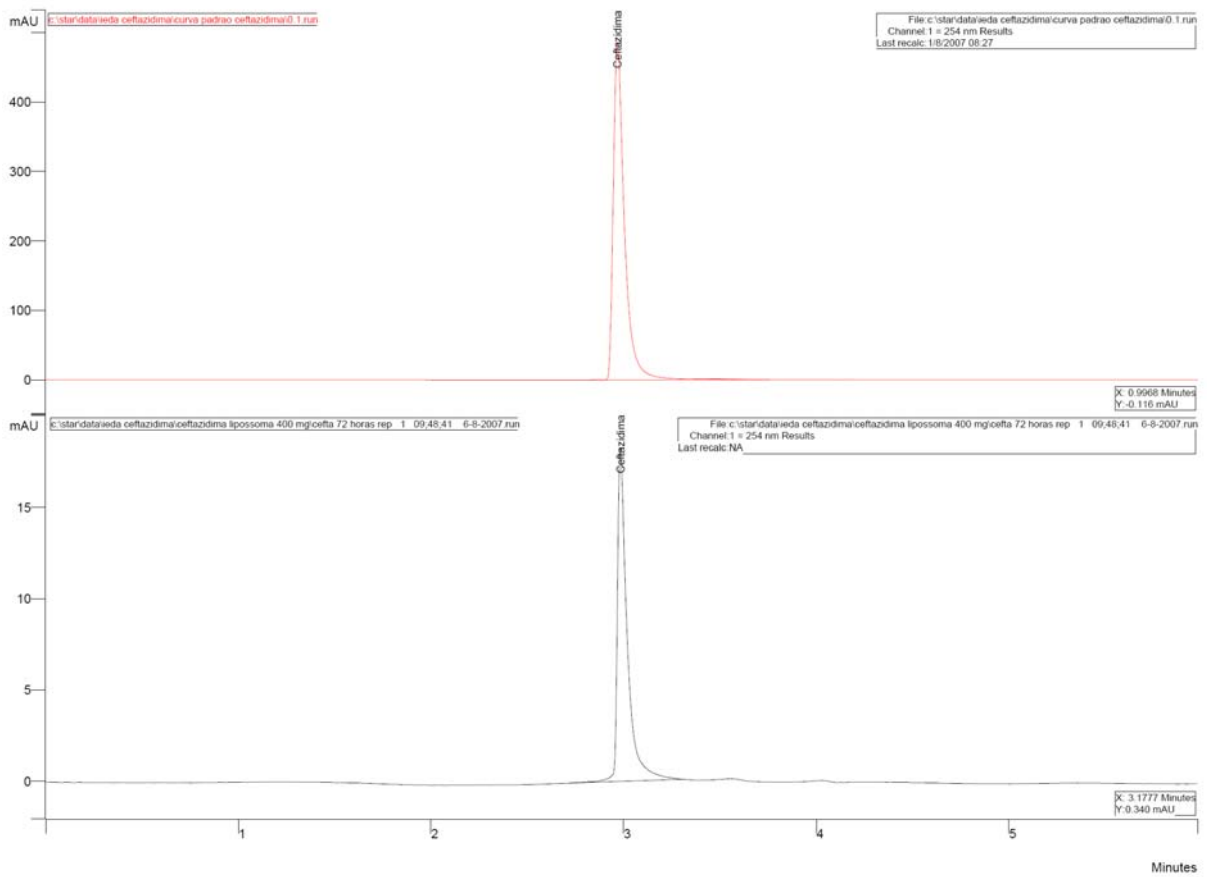


Figura 27: Cromatogramas da ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS (vermelho) e da ceftazidima encapsulada em lipossomas (preto)  
Condições cromatográficas: coluna C18 250 x 4,6 mm, e a fase móvel constituída de 2% de acetonitrila e 98% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector UV a 254 nm.

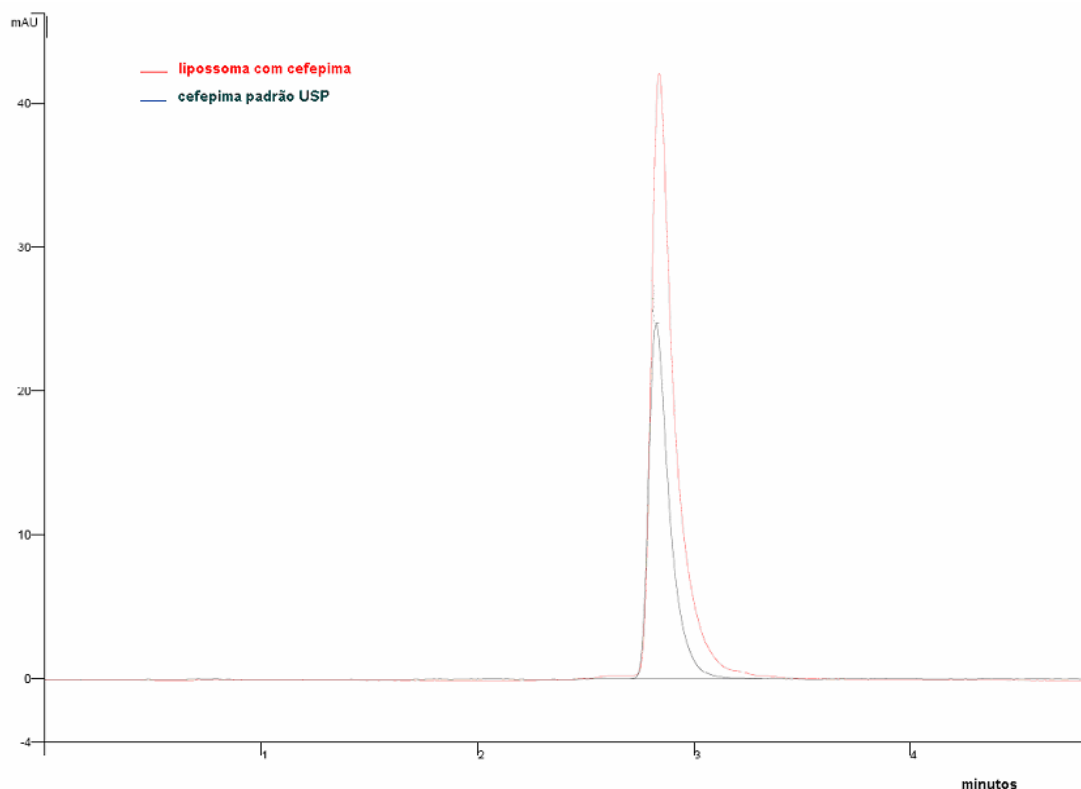


Figura 28: Cromatogramas da cefepima padrão USP e da cefepima encapsulada em lipossomas

Condições Cromatográficas: coluna C18 250 x 4,6 mm, fase móvel constituída de 10% de acetonitrila e 90% de água Milli-Q, com fluxo de 1mL/minuto e o detector UV a 255 nm.

Tanto a ceftazidima, quanto a cefepima são fármacos altamente hidrossolúveis e provavelmente a acentuada perda da ceftazidima (98,25%) e da cefepima (97,19%) na formulação com 10 mM de colesterol, contra 63,25% para a ceftazidima e 44,91% para a cefepima da preparação com 20 mM de colesterol, se deva à maior fluidez da membrana lipossomal na amostra contendo 10 mM de colesterol, pois o colesterol reduz a fluidez da membrana lipídica e a permeabilidade de moléculas solúveis em água (VEMURI, RHODES, 1995).

Segundo Sharma e Sharma (1997), os lipídeos têm como característica a temperatura de transição de fases ( $T_c$ ), existindo em diferentes estados físicos acima e abaixo da  $T_c$ . Os lipídios estão em uma organização rígida bem ordenada abaixo da  $T_c$  e em uma fase líquida cristalina (fluida) acima da  $T_c$ . Na presença de lipídios de alta  $T_c$  ( $> 37^\circ\text{C}$ ), a membrana lipossomal torna-se menos fluída à temperatura fisiológica e menos permeável. Em contraste, lipossomas formados com lipídios de baixa  $T_c$  ( $< 30^\circ\text{C}$ ) são mais susceptíveis as perdas de fármacos encapsulados em seu cerne aquoso. Altas concentrações de colesterol ( $> 30$  molar

%), podem eliminar totalmente a fase de transição e diminuir a fluidez da membrana. Neste trabalho, os melhores resultados de eficiência de encapsulação e manutenção do material encapsulado foram obtidos com a formulação contendo 40 mM de PC e 20 mM de colesterol, ou seja, razão molar de 50% entre PC e colesterol.

A perda dos fármacos encapsulados evidenciadas neste trabalho foi maior do que os resultados reportados por Drulis-Kawa et al. (2006) e Mugabe et al. (2005), os quais demonstraram a perda de 24% do meropenem encapsulado em lipossomas compostos com lipídios naturais e sintéticos e incubados a 37°C por 24 horas, e de 10,4% da gentamicina encapsulada em lipossomas compostos por DMPC, DPPC e 1,2-distearoil- *sn*-glycero-3-fosfatidilcolina (DSPC) e incubados a 4°C por 48 horas e de 19,4% quando incubados a 37°C, respectivamente. Entretanto, ambos os fármacos meropenem e gentamicina são menos hidrossolúveis do que as cefalosporinas utilizadas neste trabalho. A maior hidrofobicidade da molécula favorece sua localização na bicamada lipídica, ou mesmo na região da interface lipídeo-água, o que reduz a tendência de vazamento destes fármacos em razão de seu coeficiente de partição.

## 5.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

### 5.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima livres

Os ensaios realizados para a determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima (Figura 29) e cefepima livres, nas quais foram utilizadas as concentrações de 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, preparados conforme 4.3.7.3 e os testes realizados conforme 4.3.7.5, mostraram que a menor concentração de inibiu o crescimento bacteriano foi a de 8 µg/mL, tanto para a ceftazidima como para a cefepima. Estes resultados confirmam os dados descritos no NCCLS M7-A6 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition, 2003*), provavelmente em razão de que, neste trabalho, foi utilizada cepa padrão com sensibilidade conhecida aos antimicrobianos testados.

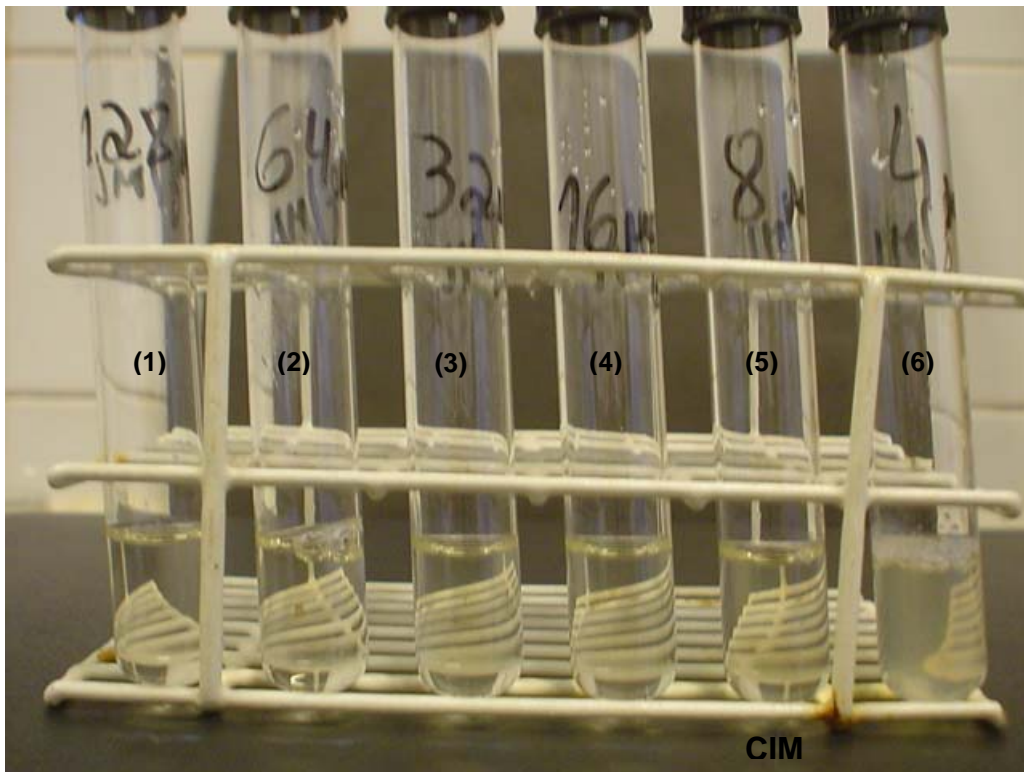


Figura 29: Concentração Inibitória Mínima da Ceftazidima Livre  
(1) 128 µg/mL; (2) 64 µg/mL; (3) 32 µg/mL; (4) 16 µg/mL; (5) 8 µg/mL; (6) 4 µg/mL

#### 5.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares

Os ensaios realizados para a determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares (Figura 30), nos quais foram utilizadas as concentrações 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL, preparados conforme 4.3.7.4 e os testes realizados conforme 4.3.7.6, mostraram que a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano tanto para a ceftazidima como para a cefepima foi a de 4 µg/mL. Esta redução de 50% da concentração inibitória mínima de ambos os antimicrobianos encapsulados em lipossomas unilamelares provavelmente se deva à fusão da membrana lipossomal com a membrana externa das bactérias Gram-negativas (BEAULAC et al., 1998), aumentando o aporte intracelular do fármaco, ou ainda reduzindo a capacidade do microrganismo em utilizar seus mecanismos de resistência ao antimicrobiano.

Os resultados encontrados nesse trabalho vêm ao encontro dos resultados publicados por Drulis-Kawa et al. (2006), Mugabe et al. (2005), Omri, Ravaoarino (1996), Rukholm et al. (2006), os quais também demonstraram significativa redução na CIM de antibióticos encapsulados em lipossomas, entretanto utilizando outras classe de antimicrobianos.

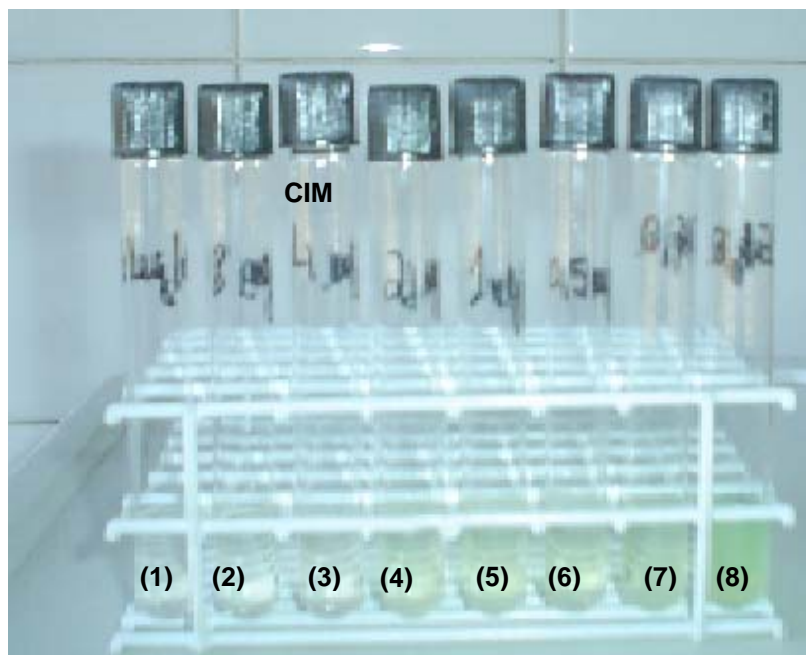


Figura 30: Concentração inibitória mínima da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares. (1) 16  $\mu\text{g/mL}$ ; (2) 8  $\mu\text{g/mL}$ ; (3) 4  $\mu\text{g/mL}$ ; (4) 2  $\mu\text{g/mL}$ ; (5) 1  $\mu\text{g/mL}$ ; (6) 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; (7) 0,250  $\mu\text{g/mL}$ ; (8) 0,125  $\mu\text{g/mL}$

No trabalho realizado por Omri, Ravaoarino (1996), reduções na CIM foram encontradas ao encapsularem amicacina, netilmicina e tobramicina em lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo e colesterol na proporção molar de 7:1. Os resultados encontrados quando se encapsularam amicacina foi de uma redução de 4 vezes a CIM para o *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922 e em 8 vezes para o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ao passo que ao testarem estes lipossomas contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtiveram uma diminuição da sensibilidade em 8 vezes. Com os lipossomas de netilmicina conseguiram a redução da concentração inibitória mínima quando comparados com o fármaco livre em 2 vezes para a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922; para uma cepa clínica de *Xanthomonas maltophilia*; em 8 vezes para outra cepa clínica de *X. maltophilia* e de 16 vezes para o *E. faecalis* ATCC 29212, sendo que frente ao *S. aureus* ATCC 29213 obtiveram um aumento da CIM em 2 vezes. A tobramicina encapsulada nestes lipossomas apresentou uma redução da CIM em duas vezes frente às três

cepas clínicas de *X. maltophilia* e de *E. faecalis* ATCC 29212 e um aumento da sensibilidade em 2, 4 e 8 vezes a sua CIM, respectivamente frente à *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Reduções na CIM também foram encontradas quando gentamicina foi encapsulada em lipossomas com diferentes composições lipídicas (DMPC, DPPC e DSPC) e colesterol na média molar de 2:1. Significantes reduções na CIM, variando entre 2 e 256 vezes, foram encontradas frente a todas as cepas resistentes mucóides e não mucóides de *P. aeruginosa* (cepas de isolamento clínico). Essas formulações aumentaram a susceptibilidade destes microrganismos passando-os de altamente resistentes a resistentes intermediários ou susceptíveis (MUGABE et al., 2005).

Estudos realizados por Rukholm et al. (2006) também demonstraram significativa redução na CIM de gentamicina encapsulada em lipossomas de DMPC e colesterol, na média 2:1. Nesse trabalho os autores conseguiram uma redução da CIM em 4 vezes frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, duas vezes frente a uma cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* denominada PA-1 e em 16 vezes em relação à também cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* PA-136411.

Drulis-Kawa et al. (2006), testaram doze formulações lipídicas para encapsular meropenem, as quais foram utilizadas frente a seis cepas sensíveis e a duas cepas resistentes de *P. aeruginosa*, isoladas de infecções traqueais, a fim de se determinar sua atividade antibacteriana. Nesse trabalho, os lipossomas catiônicos foram mais efetivos do que lipossomas aniônicos contra os isolados sensíveis, uma vez que a CIM para essas formulações foram 2 a 4 vezes mais baixas do que para o fármaco livre. As formulações aniônicas mostraram mais baixa atividade antibacteriana do que as catiônicas, pois a CIM para o meropenem encapsulado em formulações aniônicas foram iguais ou mais altos do que a CIM do fármaco livre. Nenhuma das formas lipossomais de meropenem apresentou atividade bactericida contra os isolados que eram resistentes ao fármaco devido à baixa permeabilidade.

Mugabe et al. (2006) demonstraram significativas diferenças na CIM entre antibióticos na forma livre e encapsulados em lipossomas compostos de DPPC e colesterol. A CIM dos aminoglicosídeos (amicacina, tobramicina e gentamicina) encapsulados em lipossomas contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mucóides, não mucóides e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi



significativamente mais baixo do que aquele correspondente aos antibióticos livres. Esses autores relataram que uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* não mucóide, que foi altamente resistente à amicacina (CIM, 256 µg/mL) e tobramicina (CIM, 64 µg/mL) mostrou-se sensível aos antibióticos citados anteriormente, quando encapsulados em lipossomas, mostrando redução na CIM em ambas as cepas de 32 vezes, ao passo que esta mesma cepa frente ao aminoglicosídeo tobramicina apresentou uma redução na CIM de 8 vezes. A redução de 50% da CIM da cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 frente aos aminoglicosídeos testados vem ao encontro dos resultados obtidos nesse trabalho. Várias hipóteses, incluindo reduzida repulsão eletrostática de antibióticos encapsulados em lipossomas, proteção dos fármacos frente às enzimas bacterianas ou fusão entre os lipossomas e a célula bacteriana, podem explicar o mecanismo de aumento da atividade antibacteriana de formulações lipossomais.

Beaulac et al. (1998) também conseguiram importantes reduções da CIM da tobramicina encapsulada em lipossomas compostos de DPPC e DMPG. Segundo estes autores formulações lipossomais que incluem colesterol têm uma Tc mais alta e são ao mesmo tempo mais rígidos e mais estáveis. Afirmam ainda que fármacos encapsulados nesses lipossomas são mais efetivos do que os fármacos livres *in vivo*, e que apresentam baixa atividade bactericida contra bactérias extracelulares *in vitro*. Essa afirmação pode ser contestada pelos resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que foi encontrada uma redução de 2 vezes a CIM em lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e colesterol na proporção de 2:1, ou seja denominados lipossomas rígidos, no experimento *in vitro*.

Omri et al. (2002), encapsularam polimixina B em lipossomas de DPPC e colesterol na proporção de 2:1 e também conseguiram diminuição da CIM em 4 vezes frente a *Bordetella bronchiseptica* ATCC 10580, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* W 22539. Esses autores também testaram a eficácia terapêutica de lipossomas de polimixina B através da administração intratecal de polimixina livre e encapsulada nos lipossomas para os pulmões dos ratos infectados com *P. aeruginosa*. Após 24 horas do término do tratamento, os animais foram sacrificados e foi realizada a contagem bacteriana dos microrganismos sobreviventes, sendo que obtiveram o logaritmo da contagem bacteriana de 5,1 quando se utilizou a polimixina livre e de 3,7 para a polimixina

encapsulada em lipossomas, demonstrando também uma maior eficácia terapêutica quando a polimixina estava encapsulada em lipossomas.

## 5.7. Determinação da concentração bactericida mínima

### 5.7.1. Determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e cefepima livres

Os testes para a determinação da concentração bactericida mínima, tanto da ceftazidima como da cefepima livres, foram realizados por três vezes e em triplicata (Apêndices A e C). Apesar do número de unidades formadoras de colônias inicialmente adicionadas ao teste não ser a mesma em todas as repetições, o desvio padrão e o desvio padrão relativo apresentaram valores baixos, comprovando a reprodutibilidade dos ensaios. Nos ensaios realizados para a determinação da CBM da ceftazidima livre, o maior desvio padrão relativo entre as repetições foi de 1,99, encontrado na concentração de 32 µg/mL e no tempo de 2 horas. Quando se determinou a CBM para a cefepima livre o maior desvio padrão relativo foi de 1,14, na concentração de 16 µg/mL, e também no tempo de 2 horas de ensaio.

Os ensaios realizados para a determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e da cefepima livres, nas quais se utilizaram as concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL, representando respectivamente, 1 vez a CIM, 2 vezes a CIM e 4 vezes a CIM, conforme resultados descritos em 5.6.2, mostraram uma significativa redução da contagem de UFC originalmente adicionada ao teste. Os resultados desta análise estão demonstrados, respectivamente, nas Tabelas 10 e 11, os quais mostram a porcentagem de redução dos microrganismos, levando-se em consideração a concentração dos antimicrobianos e o tempo de contato com o mesmo.

Tabela 10: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL de ceftazidima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação

Tempo (horas)	Concentração da Ceftazidima (µg/ml)					
	8		16		32	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$5,7 \times 10^5$	-	$5,7 \times 10^5$	-	$5,7 \times 10^5$	-
2	$9,0 \times 10^4$	84,21	$4,9 \times 10^4$	91,40	$9,12 \times 10^3$	98,4
6	$3,9 \times 10^4$	93,15	$2,50 \times 10^4$	95,61	$3,1 \times 10^3$	99,46
24	$2,3 \times 10^4$	95,96	$2,25 \times 10^4$	96,05	$2,7 \times 10^3$	99,52

Resultados das médias das triplicatas de uma das três repetições realizadas.

Os resultados apresentados na Tabela 10, referentes às curvas de morte da *P. aeruginosa* ATTC 27853, mostram que a ceftazidima em nenhuma das concentrações utilizadas conseguiu eliminar 99,9% dos microrganismos inoculados inicialmente. As concentrações de 8 e 16 µg/mL mostraram uma redução constante do número de microrganismos inoculados, onde se conseguiu eliminar respectivamente, 95,96 e 96,05% mantendo este percentual de redução da contagem até o final do ensaio. A concentração de 32 µg/mL ao final de 6 horas conseguiu eliminar 99,46% dos microrganismos inicialmente inoculados, sendo que ao final das 24 horas, em todos os três ensaios realizados, o efeito antimicrobiano manteve-se praticamente o mesmo, com discretos aumentos no percentual de redução dos microrganismos inicialmente inoculados.

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que a concentração de 32 µg/mL é a concentração bactericida mínima para a amostra de cefepima livre, pois foi a única que conseguiu manter a redução de 99,9% nas 24 horas de incubação, além de também ter eliminado a maior parte dos microrganismos nas primeiras duas horas de incubação. A concentração de 16 µg/mL em 6 horas de incubação também conseguiu eliminar 99,97% dos microrganismos inoculados, mas houve recuperação dos mesmos em 24 horas de contato. Estes resultados também confirmam os dados descritos no NCCLS M2-A8 (*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition, 2003*), uma vez que a concentração de 30 µg/mL é a concentração utilizada nos testes de Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de difusão em agar, onde é possível

obter um halo com limites definidos quando o microrganismo utilizado é considerado sensível para aquele agente antimicrobiano.

O fato de somente a cefepima livre ter efeito bactericida mínimo com a concentração de 32 µg/mL, e a ceftazidima não ter apresentado esse efeito, pode ser explicado pelo fato de que a ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração, enquanto que a cefepima é uma cefalosporina de quarta geração. Ambas são compostos estruturalmente similares, exceto para o grupo metil-pirrolidino, que dá à molécula de cefepima uma configuração zwitterionic, oferecendo uma vantagem química de aumentada atividade bactericida, pela aumentada permeabilidade através da membrana externa da *P. aeruginosa* (JONES et al., 2007; ROBERTS et al., 2007).

Tabela 11: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL de cefepima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação

Tempo (horas)	Concentração da Cefepima (µg/ml)					
	8		16		32	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$9,65 \times 10^5$	-	$9,65 \times 10^5$	-	$9,65 \times 10^5$	-
2	$4,55 \times 10^4$	95,28	$2,68 \times 10^4$	97,22	$1,04 \times 10^4$	98,92
6	$1,7 \times 10^3$	99,82	$2,89 \times 10^2$	99,97	$1,8 \times 10^2$	99,98
24	$3,45 \times 10^4$	96,42	$6,17 \times 10^3$	99,36	$9,65 \times 10^2$	99,90

Resultados da média das triplicatas de uma das três repetições realizadas.

#### 5.7.2. Determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares

Os testes para a determinação da concentração bactericida mínima, tanto da ceftazidima como da cefepima encapsuladas em lipossomas, foram realizados por três vezes e em triplicata (Apêndices B e D). Apesar do número de unidades formadoras de colônias inicialmente adicionadas ao teste não ser a mesma em todas as repetições, o desvio padrão e o desvio padrão relativo apresentaram valores baixos, comprovando a reprodutibilidade dos ensaios. Nos ensaios realizados para a determinação da CBM da ceftazidima encapsulada em lipossomas, o maior desvio

padrão relativo entre as repetições foi de 0,68, encontrado na concentração de 4 µg/mL e no tempo de 24 horas. Quando se determinou a CBM para a cefepima encapsulada em lipossomas, o maior desvio padrão relativo foi de 1,78, na concentração de 4 µg/mL, e no tempo de 6 horas de ensaio.

Os ensaios realizados para a determinação da concentração bactericida mínima da ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares, nos quais se utilizaram as concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL, representando respectivamente 1 vez a CIM, 2 vezes a CIM e 4 vezes a CIM, conforme resultados descritos em 5.6.3, mostraram uma significativa redução da contagem de UFC originalmente adicionada ao teste. Os resultados desta análise estão demonstrados nas Tabelas 12 e 13, os quais mostram a porcentagem de redução dos microrganismos, levando-se em consideração a concentração dos antimicrobianos ceftazidima e cefepima encapsulados individualmente em lipossomas e o tempo de contato com o mesmo. As Figuras 31 e 32 nos mostram, respectivamente, a redução dos microrganismos frente às diferentes concentrações da ceftazidima livre e encapsulada em lipossomas e da cefepima livre e encapsulada em lipossomas e a diferentes tempos de contato com os mesmos.

A ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares, assim como a ceftazidima livre, em nenhuma das concentrações utilizadas conseguiu eliminar 99,9% dos microrganismos inicialmente adicionados. Apesar disso, a ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares a 4 x CIM (16 µg/mL) após 24 horas de ensaio, conseguiu eliminar 99,83% (média dos três ensaios realizados) dos microrganismos inoculados, ao passo que essa mesma concentração desse fármaco livre, ou seja 16 µg/mL, mostrou uma redução de 96,05% após 24 horas de contato.

A forma lipossomal de ceftazidima em todas as concentrações utilizadas, ou seja 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL, apresentou uma redução maior do número de microrganismos inicialmente inoculados, quando comparadas com a ceftazidima em sua forma livre, chegando praticamente aos 99,9% quando se utilizou 16 µg/mL, ou seja uma redução de 50% em relação ao mesmo antimicrobiano na sua forma livre, demonstrando melhor atividade bacteriana da ceftazidima em sua forma lipossomal.

Tabela 12: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL de ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação

Tempo (horas)	Concentração da ceftazidima encapsulada em lipossomas (µg/ml)					
	4		8		16	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$4,2 \times 10^5$	-	$4,2 \times 10^5$	-	$4,2 \times 10^5$	-
2	$1,58 \times 10^4$	96,23	$7,73 \times 10^3$	98,16	$1,68 \times 10^3$	99,6
6	$1,65 \times 10^4$	96,05	$4,41 \times 10^3$	98,95	$8,40 \times 10^2$	99,8
24	$1,39 \times 10^4$	96,68	$3,95 \times 10^3$	99,06	$8,40 \times 10^2$	99,8

Resultados da média das triplicatas de uma das três repetições realizadas

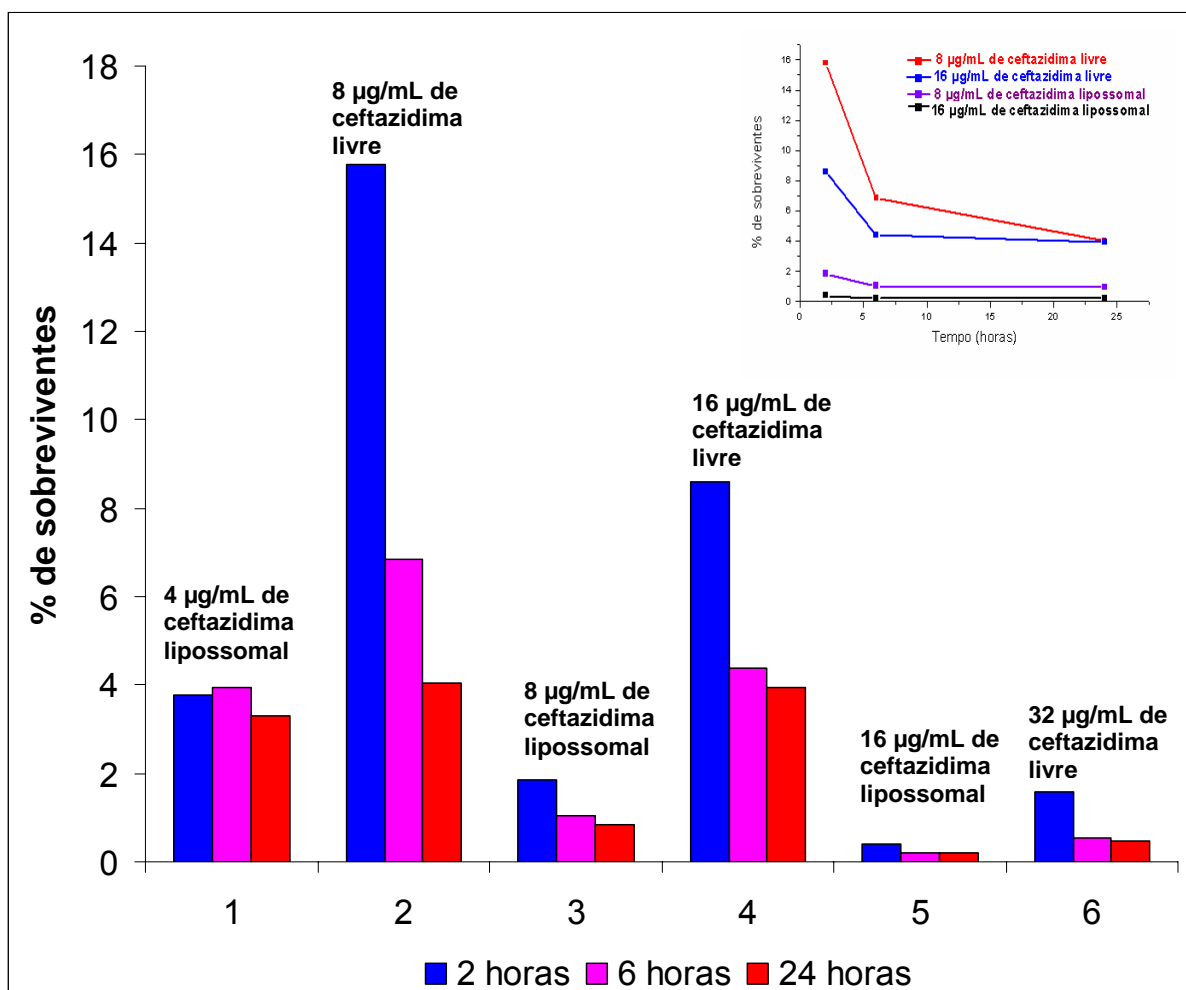


Figura 31: Perfil da redução de microrganismos frente a diferentes concentrações da ceftazidima livre e encapsulada em lipossomas unilamelares e a diferentes tempos de incubação.

A concentração bactericida mínima da cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares também apresentou redução de 50% (16 µg/mL) em relação ao fármaco livre no tempo de 24 horas, enquanto a cefepima livre apresentou efeito bactericida na concentração de 32 µg/mL no tempo de 6 horas. Entretanto, como mostrado nas Tabelas 11 e 13, na forma encapsulada não houve recuperação bacteriana em nenhuma das concentrações utilizadas e em nenhum dos tempos de incubação, indicando a prolongada atividade antibacteriana da cefepima encapsulada em lipossomas.

Tabela 13: Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL de cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação

Tempo (horas)	Concentração da cefepima encapsulada em lipossomas (µg/ml)					
	4		8		16	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$3,0 \times 10^5$	-	$3,0 \times 10^5$	-	$3,0 \times 10^5$	-
2	$5,6 \times 10^4$	81,33	$1,95 \times 10^4$	93,50	$8,7 \times 10^3$	97,10
6	$1,92 \times 10^4$	93,60	$6,51 \times 10^3$	97,83	$5,7 \times 10^3$	98,09
24	$1,19 \times 10^4$	96,03	$3,12 \times 10^3$	98,96	$1,8 \times 10^2$	99,94

Resultados da média das triplicatas de uma das três repetições realizadas.

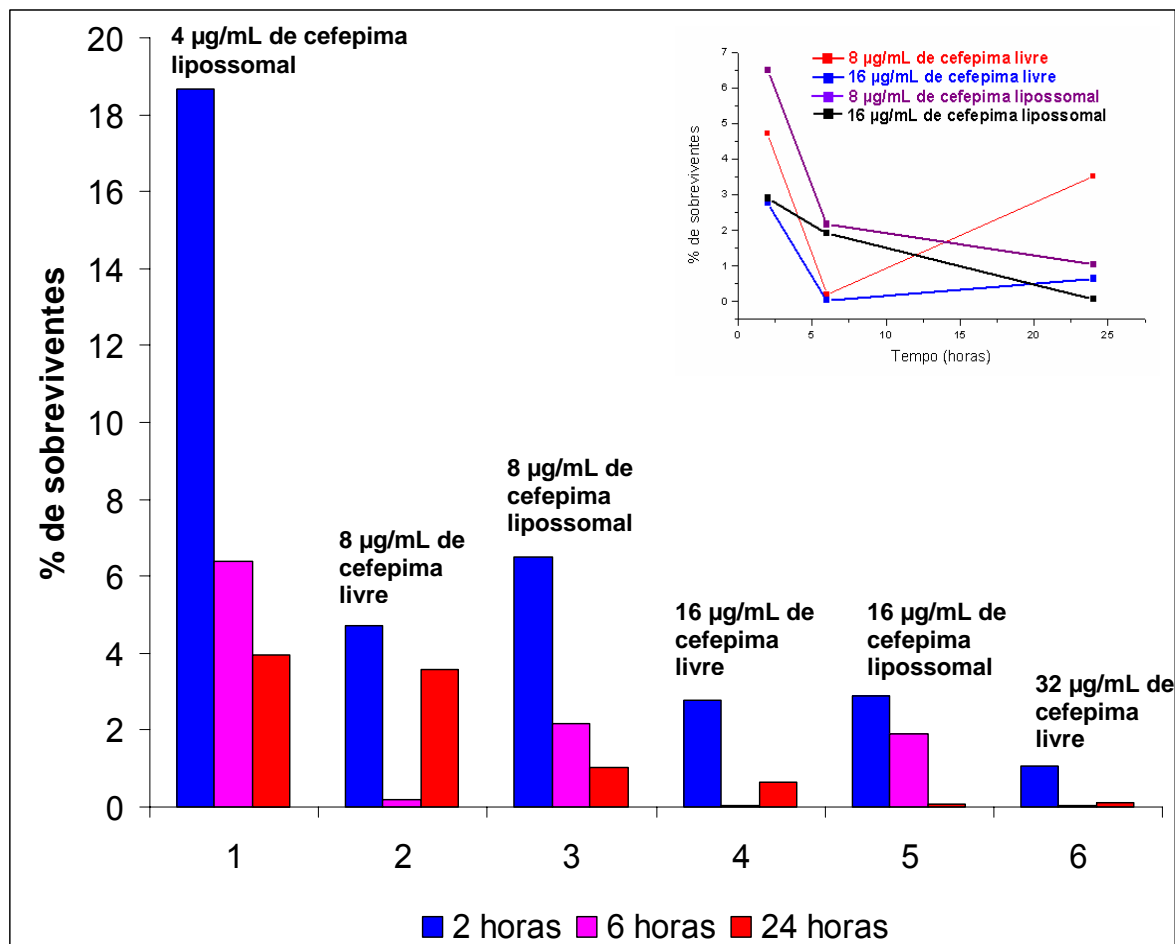


Figura 32: Perfil da redução de microrganismos frente a diferentes concentrações da cefepima livre e encapsulada em lipossomas unilamelares e a diferentes tempos de incubação.

Esses dados vêm ao encontro dos resultados de Beaulac et al. (1998), Drulis-Kawa et al. (2006); Mugabe et al. (2006) e Rukholm et al. (2006) onde as curvas de morte confirmaram uma mais alta ação antimicrobiana em formulações lipossomais do que dos antibióticos livres.

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*, isoladas de pacientes com fibrose cística e uma cepa de *Staphylococcus aureus*, também proveniente de isolamento clínico, foram submetidas à determinação de suas curvas de morte, com concentrações de tobramicina livre e encapsulada em lipossomas compostos de DPPC/DMPG (15:1) abaixo de sua CIM. Depois de três horas de tratamento com o antibiótico encapsulado nos lipossomas, as culturas de *B. cepacia*, *E. coli* e *S. aureus* apresentaram uma redução na contagem respectivamente de 129, 84 e 566 vezes



maiores do que as culturas tratadas com o antibiótico livre. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* também mostrou uma maior redução nas contagens, quando as mesmas foram tratadas com a tobramicina encapsulada em lipossomas. Esses autores sugerem que o fato de que concentrações inferiores à CIM de antibióticos encapsulados em lipossomas reduzam o crescimento bacteriano em 35 a  $10^5$  vezes em comparação com os antibióticos livres se deva ao fato da interação direta dos lipossomas com as bactérias. Comentam, ainda, que provavelmente isto se deva ao fato da aumentada fluidez e plasticidade dos lipossomas constituídos de DPPC/DMPG (BEAULAC et al., 1998)

Drulis-Kawa et al. (2006) verificaram que o meropenem livre a 0,5 µg/mL (1 x CIM) e a 2 µg/mL (4 x CIM) mostrou uma melhor atividade bactericida depois de 6 horas de incubação, do que a forma lipossomal composta por PC/DOTAP/Chol (5:2:3). Depois de 18 horas de incubação as diminuições das contagens bacterianas em 1 x CIM e 4 x CIM foram praticamente a mesma, ao se avaliar as curvas de morte da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Entretanto, quando expostas a uma concentração inferior à CIM (0,125 µg/mL), o fármaco livre teve maior eficácia bactericida depois de 3 e 6 horas de incubação, mas após 18 horas houve um aumento no número de células bacterianas, similar ao início, ao passo que o meropenem encapsulado em lipossomas mostrou uma significativa inibição do crescimento bacteriano após essas 18 horas de incubação, mostrando que a encapsulação do meropenem é necessária para aumentar sua atividade bactericida.

Para confirmar os dados encontrados nos testes da concentração inibitória mínima Mugabe et al. (2006) realizaram testes de curvas de morte para averiguar a habilidade de aminoglicosídeos encapsulados em lipossomas em eliminar 4 cepas de *P. aeruginosa*, sendo uma laboratorial (ATCC 10145) e três cepas de isolamento clínico. Esses antibióticos encapsulados em lipossomas foram significativamente mais efetivos do que antibióticos livres em eliminar a cepa não mucóide de *P. aeruginosa*. Amicacina e gentamicina na sua forma lipossomal a 2 x CIM quase erradicaram o crescimento bacteriano em 24 horas. Embora os antibióticos livres a 2 x CIM terem uma ação inicial de matar os microrganismos, eles não conseguiram eliminar todo o crescimento bacteriano. A 4 x CIM, ambas as formas lipossomal e livre dos antimicrobianos erradicaram essa cepa, respectivamente, em 2 e 4 horas. A cepa laboratorial incubada com tobramicina livre a 1 e 2 x CIM demonstraram uma diminuição inicial em UFC depois de 6 horas, mas houve recuperação à sua

concentração inicial depois de 24 horas, enquanto a forma lipossomal de tobramicina a 1 x CIM eliminou completamente a bactéria em 6 horas. A 4 x CIM, ambas as formas lipossomais e livres de tobramicina eliminaram a cepa laboratorial de *P. aeruginosa*, respectivamente, em 2 e 4 horas. Esses resultados confirmam a alta potência desses aminoglicosídeos encapsulados em lipossomas quando comparados com esses antibióticos livres.

Rukholm et al. (2006) também demonstraram maiores reduções da contagem bacteriana quando testaram a gentamicina livre e encapsulada em lipossomas compostos de DMPC/Chol (2:1) frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo uma cepa de laboratório e duas de isolamento clínico, na qual uma apresentava moderada resistência e a outra alta resistência a este antimicrobiano. Concluíram que no caso da cepa moderadamente resistente a gentamicina, ambas as formas do antimicrobiano a altas concentrações inibiram o crescimento bacteriano. Subseqüente aumento do número de células viáveis foi encontrado quando se utilizou gentamicina livre a 1 x CIM, ao passo que este aumento foi diminuído pela forma lipossomal, com uma contagem menor de células viáveis depois de 24 horas. Diante da cepa de *P. aeruginosa* altamente resistente a gentamicina, a forma lipossomal de gentamicina mostrou uma prolongada atividade antibacteriana e melhores tempos de morte. A 1 x CIM, a gentamicina na sua forma livre e lipossomal mostrou um padrão similar, onde o crescimento bacteriano foi inibido, mas não ocorreu nenhuma diminuição notável. A 2 x CIM, ambas as formas da gentamicina mostraram uma grande diminuição nas contagens depois de 6 horas, sendo que essa diminuição só continuou no meio onde continha a forma lipossomal, indicando sua prolongada atividade antibacteriana. A forma lipossomal a 4 x CIM demonstrou a completa erradicação das bactérias a 6 horas, contra 24 horas da gentamicina em sua forma livre.

#### 5.8. Determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e cefepima livres e encapsuladas em lipossomas unilamelares pelo teste de difusão em agar

Os ensaios realizados para a determinação da concentração inibitória mínima da ceftazidima e da cefepima livres e encapsuladas em lipossomas unilamelares pelo método de difusão em ágar conforme os resultados descritos, respectivamente,

nas Tabelas 14 e 15 e demonstrados nas Figuras 33 e 34 indicam que as concentrações utilizadas tanto para a ceftazidima e cefepima livres apresentaram halos de inibição que caracterizam a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sensível a esses dois antimicrobianos, conforme os dados descritos nas tabelas do CLSI/NCCLS M100-S15 (*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; fifteenth Informational Supplement, 2005*).

Tabela 14: Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente à ceftazidima e cefepima livres nas concentrações de 30, 15 e 8 µg/0,2 mL - Ceftaz. (Ceftazidima) – Cefep. (Cefepima)

Concentração (µg/0,2 mL)	Média do Diâmetro dos Halos de Inibição (mm)		Desvio Padrão		Desvio Padrão Relativo	
	n = 9		Ceftaz.	Cefep.	Ceftaz.	Cefep.
	Ceftaz.	Cefep.				
30	21,91	24,94	0,3100	0,8083	1,41	3,24
15	21,74	24,02	0,7430	0,7385	3,14	3,07
8	19,51	22,99	1,2757	0,4087	6,53	1,77

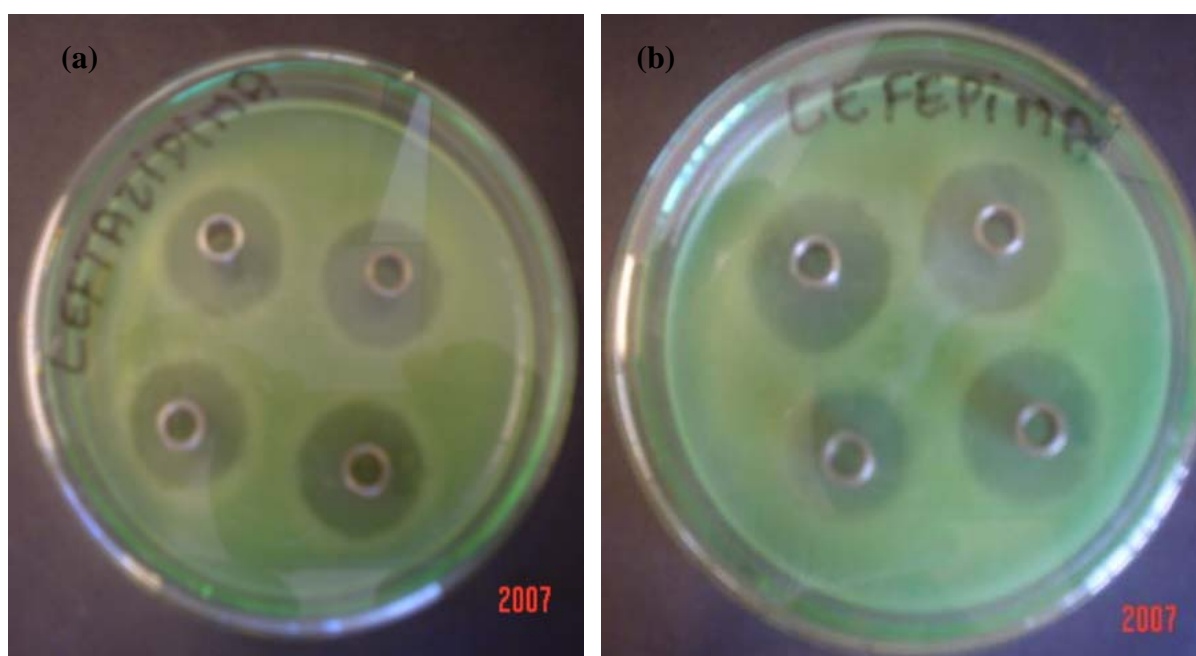


Figura 33: Halos de inibição do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente à ceftazidima (a) e cefepima (b) na sua forma livre

Esses mesmos antimicrobianos encapsulados em lipossomas unilamelares, com as mesmas concentrações utilizadas com o fármaco livre, apresentaram halos de inibição que caracterizam a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 resistente a ceftazidima e cefepima. Como os ensaios foram realizados com a mesma cepa de microrganismo, essas observações indicam uma resistência que não corresponde à realidade, sendo devidos provavelmente ao fato de que os lipossomas, por serem materiais particulados, não se difundem no meio Agar.

Como mostrado nos resultados dos testes de estabilidade dos lipossomas de ceftazidima e cefepima, após 24 horas somente 63,25% da ceftazidima e 44,91% da cefepima foram liberadas, não havendo tempo e concentração suficiente para o fármaco liberado a partir dos lipossomas, inibirem o crescimento bacteriano nesta técnica por difusão em agar, e como os lipossomas não difundiram, não foi possível verificar a elevada ação antimicrobiana da ceftazidima e cefepima encapsuladas nos lipossomas, como se verificou nos testes de concentração inibitória mínima por diluição em caldo. Os resultados dessa técnica, provavelmente poderiam ser maximizados com a utilização de um gel mais poroso, como a agarose.

Tabela 15: Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente à ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares nas concentrações de 30, 15, 8 e 4 µg/0,2 mL - (Lipos. Ceftaz = Lipossoma com Ceftazidima; Lipos. Cefep.= Lipossoma com Cefepima; nhi = não houve inibição)

Concentração (µg/0,2 mL)	Média do Diâmetro dos Halos de Inibição (mm) n = 9		Desvio Padrão		Desvio Padrão Relativo	
	Lipos. Ceftaz.	Lipos. Cefep.	Lipos. Ceftaz.	Lipos. Cefep.	Lipos. Ceftaz.	Lipos. Cefep.
30	8,18	9,157	0,7967	0,4968	9,73	5,42
15	5,02	5,92	0,4023	0,5361	8,01	9,05
8	nhi	nhi	-	-	-	-
4	nhi	nhi	-	-	-	-

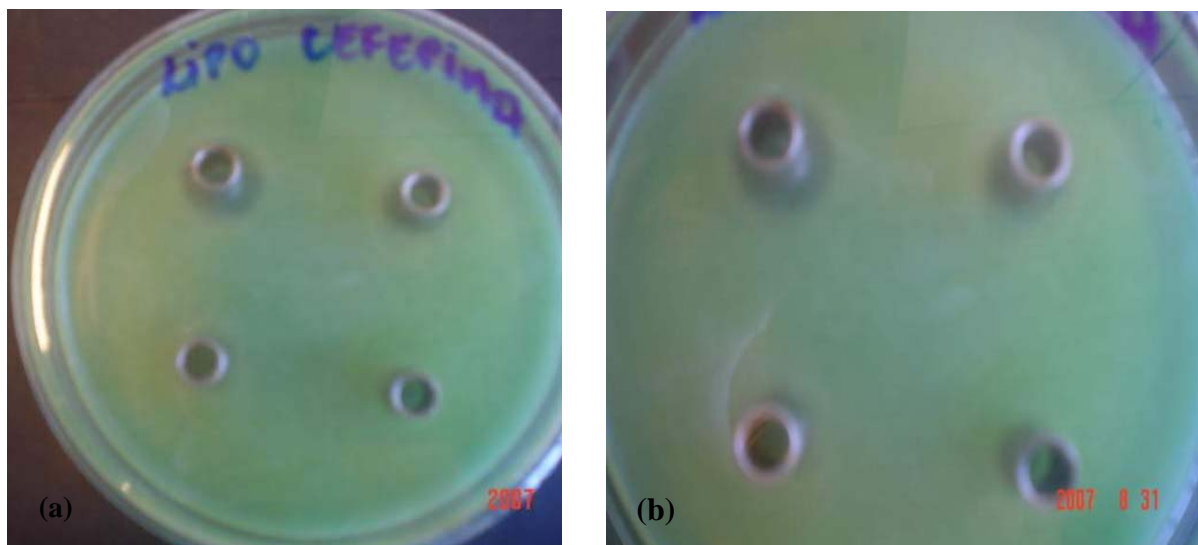


Figura 34: Halos de inibição do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente à cefepima (a) e ceftazidima (b) encapsuladas em lipossomas unilamelares

Os dados apresentados acima são corroborados pelas observações de pesquisadores que utilizam a técnica de difusão em ágar para determinar a concentração dos antimicrobianos incorporados dentro dos lipossomas, onde as amostras são colocadas em pequenos poços perfurados na superfície do ágar. Esses autores, antes de adicionar as amostras dos antimicrobianos encapsulados em lipossomas, utilizam normalmente, soluções com 1% de Triton X-100 para romper os lipossomas e liberar os antimicrobianos encapsulados, para que os mesmos possam se difundir no ágar e promover a formação de halos de inibição (RUKHOLM et al., 2006).

Vários pesquisadores utilizam a técnica de diluição em caldo, como recomendado pelo CLSI (anteriormente NCCLS) para determinar a Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos encapsulados em lipossomas. Nesta técnica os lipossomas contendo os antimicrobianos podem, devido ao meio líquido, entrar em contato com o microrganismo e assim exercer sua elevada ação antimicrobiana frente aos microrganismos pré-estabelecidos (DRULIS-KAWA et al. 2006; MUGABE et al. 2006; RUKHOLM et al. 2006).

O efeito antimicrobiano da ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas contra a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi comprovadamente superior quando comparado ao efeito dos fármacos livres, demonstrando que o emprego de lipossomas como sistemas carreadores de antimicrobianos pode ser estendido às cefalosporinas testadas neste trabalho.

## 6. CONCLUSÕES

O método de hidratação do filme lipídico, seguido de sonicação permitiu obter lipossomas unilamelares de pequeno diâmetro, capazes de encapsular tanto ceftazidima quanto cefepima. Ao se utilizar 20 mM de colesterol na preparação dos lipossomas (razão molar 2:1 - PC:colesterol), foram obtidas melhores eficiências de encapsulação da ceftazidima e cefepima, devido ao aumento do diâmetro médio das vesículas com maior volume interno. Essa concentração de colesterol também permitiu diminuir a perda do fármaco encapsulado para a ceftazidima em 35,0% e em 52,28% para a cefepima, em um período de 24 horas, devido à maior fluidez na membrana quando preparada com menores quantidades de colesterol.

A encapsulação da ceftazidima e cefepima em lipossomas unilamelares permitiu reduzir em 50% a CIM desses antimicrobianos frente à *Pseudomonas aeruginosa*, como também proporcionou melhor efeito bactericida, não havendo recuperação dos microrganismos inicialmente adicionados durante as 24 horas de ensaio. A técnica de difusão em agar não permite a determinação da concentração inibitória mínima dos fármacos encapsulados em lipossomas por não permitir a difusão das vesículas pelo agar.

O efeito antimicrobiano da ceftazidima e da cefepima encapsuladas em lipossomas contra a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi comprovadamente superior quando comparado ao efeito dos fármacos livres, demonstrando que o emprego de lipossomas como sistemas carreadores de antimicrobianos pode ser estendido às cefalosporinas testadas nesse trabalho.

## 7. PERSPECTIVAS

Novos estudos *in vitro* com cepas de microrganismos resistentes poderão fornecer indicadores da utilização dos lipossomas como um sistema de liberação coadjuvante na terapia desses processos. Além disso, o desenvolvimento de formulações com maior estabilidade via novos processos tecnológicos (como a liofilização de vesículas crioprotégidas), poderão viabilizar a realização de estudos mais amplos.

Os resultados encontrados neste trabalho abrem perspectivas para futuras investigações pré-clínicas (*in vivo*) e clínicas da utilização de cefalosporinas encapsuladas em lipossomas na terapêutica de infecções causadas por microrganismos sensíveis, ou mesmo resistentes a estes antimicrobianos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Pharmacotherapy*. v. 23, p.916-924, 2003.

ALPHANDARY, H. P.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 13, p.155-168, 2000.

ALVES, C. P. I. Estudo e caracterização da encapsulação de isotretinoína em lipossomas unilamelares. 2005. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Rede Centro-Oeste, Convênio UnB-UFG-UFMS, Goiânia, 2005.

ANTOS, M.; TRAFNY, E. A.; GRZYBOWSKI, J. Antibacterial activity of liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*. *Pharmacological Research*. v. 32, p.85-87, 1995.

AOKI, H.; TOTTORI, T.; SAKURAI, F.; FUJI, K.; MIYAJIMA, K. Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v.156, p.163-174, 1997.

BAKKER-WOUDENBERG, I. J. M.; ROERDINK, F. H. Antimicrobial chemotherapy directed by liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 17, p.547-552, 1986.

BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M. WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal Molecular Biology*, London, v. 13, p.238-252, 1965.

BEAULAC, C.; SACHETELLI, S.; LAGACE, J. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 41, p.35-41, 1998.

CALHEIROS, C. S. Encapsulação de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina em Lipossomas para a Administração por Inalação. 2001. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.



CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 21, p.297-307, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1 - 56238-556 – 9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2005.

CÓCERA, M.; LÓPEZ, O.; CODERCH, L.; PARRA, A. M. Permeability investigations of phospholipid by adding cholesterol. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical Engineering Aspects*. v. 221, p.9-17, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. 3ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1988, 298p.

COURVALIN, P.; TRIEU-CUOT, P. Minimizing potential resistance: the molecular view. *Clinical Infectious Disease*. v. 33(suppl 3), S138-S146, 2001.

DENYER, S. P.; MAILLARD, J.-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. v. 92, p.35S-45S, 2002.

DRULIS-KAWA, Z.; GUBERNATOR, J.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; DOROSZKIEWICZ, W.; KOZUBEK, A. In vitro antimicrobial of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 315, p.59-66, 2006.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING, Disponível em: <http://www.malvern.co.uk>. Acesso em: novembro de 2005.

ENG, R. H. K.; HSIEH, A.; SMITH, S. M. Antibiotics killing of bacteria: comparison of bacteria on surfaces and in liquid, growing and non growing. *Chemotherapy*. v. 41, p.113-120, 1995.

FARREL, S.; SIRKAR, K. K. Controlled release of liposomes. *Journal of Membrane Science*. v. 127, p.223-227, 1997.

FERRARA, A. M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 27, p.183-195, 2006.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônios. *Química Nova*, v. 28, nº3, p.511-518, 2005.

GABRIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Amsterdam, v. 56, p.189-217, 2003.

GEL FILTRATION : *Principles e methods*. Disponível em: <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>. Acesso em: novembro de 2005.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech December*, v.13, p.527-537, 1995.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updat: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. v. 3, p.247-255, 2000

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMANS, A. G. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, 2148 p.

HAUSER, A. R.; SRIRAM P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the comundrum of drug resistance. *Postgraduate Medicine*. v. 117, p.41-48, 2005.

JAPONI, A.; ALBORZI, A.; KALANI, M.; NASIRI, J.; HAYATI, M.; FARSHAD, S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns*. v. 32, p.343-347, 2006.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. Microbiologia Médica. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 524 p.

JONES, R. N.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; POTTUMARTHY, S. Comparisons of parenteral broad-spectrum cephalosporin tested against bacterial isolates from pediatric patients: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 57, p.109-116, 2007.

KAPRELYANTS, A. S.; GOTTSCHAL, J. C.; KELL, D. B. Dormancy nonsporulating bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 104, p.271-286, 1993.

LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. *The Biochemical Journal*. v. 256, p.1-11, 1988.

LASIC, D. D. Les Liposomes. *Recherche*, Paris, v.20, n.212, p.904-913, 1989

LASIC, D. D. Liposomes. *American Scientist*, New Haven, v.80, n.1, p.20-30, 1992.

LIMA, E. M. Lipossomas: Estrutura, Propriedades, Aplicações. Dissertação, Área de Produção e Controle Farmacêuticos, São Paulo, 1995. 209 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MARTINDALE - The Complete Drug Reference – Thirty-fifth Edition, Vol.1, London: Pharmaceutical Press, 2007, 2190 p.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; SUGISHITA, K.; YONEYAMA, S.; AKADA, K. UEHA, M.; NAKAMURA, A.; KOBAYASHI, S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochimica Et Biophysica Acta*. v. 1467, p.219-226, 2000.

MAURER, N.; WONG, K. F.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes : a <sup>1</sup>H-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1374, p.9-20, 1998.

McGOWAN, J. E. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bactéria: Multidrug Resistance to the Maximum. *The American Journal of Medicine*. v. 119(6A), p.529-536, 2006.

McPHAIL, D.; TETLEY, L.; DUFES, C.; UCHEGBU, I. F. Liposomes encapsulating polymeric chitosan based vesicles – a vesicle in vesicle system for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 200, p.73-86, 2000.

MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 55, p. 269-271, 2005.

MUGABE, C.; HALWANI, M.; AZGHANI, R.; LAFRENIE, R. M.; OMRI, A. Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.50, n° 6, p.2016-2022, 2006.

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anesthetics. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 274, p.139-148, 2004.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1 – 56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2003.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1 – 56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2003.

NEU, H. C. Safety of cefepime: a new extended-spectrum parenteral cephalosporin. *The American Journal of Medicine*. v. 100 (suppl 6A), p.68S-75S, 1996.

NIKAIDO, H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resistance Updates: Reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. v. 1, p.93-98, 1998.

OMRI A. BEULAC C.; BOUHAJIB M.; MONTPLAISIR S.; SHARKAWI M.; LAGACÉ J. Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 38 , p.1090-1095, 1994.

OMRI, A.; RAVAOARINORO, M. Preparation, properties and the effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulations on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 7, p.9-14, 1996.

OMRI, A.; SUNTRES, Z. E.; SHEK, P. N. Enhanced activity of liposomal polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa* in rat model of lung infection. *Biochemical Pharmacology*. v. 64, p.1407-1413, 2002.

ONG, C. T.; TESSIER, P. R.; LI, C.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. Comparative in vivo efficacy of meropenem, imipenem, and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* expressing MexA-MexB-OprM efflux pumps. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 57, p.153-161, 2007.

PARK, J.; SUH, H.; SUNG, H.; HAN, D.; LEE, D. H.; PARK, B. J.; PARK, Y. H.; CHO, B. K. Liposomal entrapment of ceftazidime to improve cellular viability and function in human saphenous veins. *Artificial Organs*. v. 27 (7), p.623-630, 2003.

PFALLER, M. A.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial activity of cefepime tested against ceftazidime-resistant Gram-negative clinical strains from North American Hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 56, p.63-68, 2006.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v. 2, n° 1, p.59-71, 2001.

RAVAOARINORO M., TOMA E. Lês lipossomas dans le traitement des infections. *Annals of Internal Medicine*. v. 144, p.182-187, 1993

ROBERTS, J. A.; WEBB, S. A. R.; LIPMAN, J. Cefepime versus ceftazidime: considerations for empirical use in critically ill patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 29, p.117-128, 2007.

RUKHOLM, G.; MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 27, p.247-252, 2006.

RYBAK, M. The pharmacokinetic profile of a new generation of parenteral cephalosporin. *The American Journal of Medicine*. v. 100 (suppl 6A), p.39S-44S, 1996.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? *Química Nova*. São Paulo. v. 25, n° 6b, p.1181-1185, 2002.

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

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 154, p.123-140, 1997

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

SILVERSTEIN, S. C.; KABBASH, C. Penetration, retention, intracellular localization, and antimicrobial activity of antibiotics within phagocytes. *Current Opinion in Hematology*. v. 1, p.85-91, 1994.

SINGH, J.; ARRIETA, A. C. New Cephalosporins. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. v. 10, N° 1 (January), p.14-22, 1999.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios da análise instrumental. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed Editora, 2002, 836p.

SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 1, p.101-114, 2001.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001, 1216p.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. v. 119 (6A), p.S3-S10, 2006.

THOMSON, J. M.; BONOMO, R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology*. v. 8, p.518-524, 2005.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature*, London, v. 4, p.145-160, 2005.

TULKENS, P. M. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of European Society of Clinical Microbiology*. v.10, p.100-106, 1991.

USP DI - DRUG INFORMATION FOR THE HEALTH CARE PROFESSIONAL– 18th ed. Rockville, Maryland, 1998, 3363 p.

VAN DEN BROEK, P. J. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Reviews of Infectious Diseases*. v.11, p.213-245, 1989.

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

## Apêndices

Apêndice A - Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL de ceftazidima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação, referentes à média das triplicatas dos três ensaios realizados. (Cont. de UFC – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias; DP – Desvio Padrão; DPR – Desvio Padrão Relativo)

8 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,7x10 <sup>5</sup>	-	7,0x10 <sup>5</sup>	-	7,4x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	9,0x10 <sup>4</sup>	84,21	1,2x10 <sup>5</sup>	82,85	1,31x10 <sup>5</sup>	82,29	83,12	0,806	0,969
6	3,9x10 <sup>4</sup>	93,15	7,5x10 <sup>4</sup>	89,28	6,2x10 <sup>4</sup>	91,57	91,33	1,589	1,740
24	2,3x10 <sup>4</sup>	95,96	3,1x10 <sup>4</sup>	95,47	4,8x10 <sup>4</sup>	93,51	94,98	1,058	1,114

16 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,7x10 <sup>5</sup>	-	7,0x10 <sup>5</sup>	-	7,4x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	4,9x10 <sup>4</sup>	91,40	7,2x10 <sup>4</sup>	89,71	5,8x10 <sup>4</sup>	92,16	91,09	1,023	1,124
6	2,5x10 <sup>4</sup>	95,60	4,9x10 <sup>4</sup>	92,88	4,2x10 <sup>4</sup>	94,20	94,22	1,110	1,178
24	2,2x10 <sup>4</sup>	96,05	4,0x10 <sup>4</sup>	94,20	2,9x10 <sup>4</sup>	96,05	95,43	0,872	0,913

32 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,7x10 <sup>5</sup>	-	7,0x10 <sup>5</sup>	-	7,4x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	9,1x10 <sup>3</sup>	98,40	4,2x10 <sup>4</sup>	93,94	1,8x10 <sup>4</sup>	97,47	96,60	1,921	1,988
6	3,0x10 <sup>3</sup>	99,46	7,7x10 <sup>3</sup>	98,90	6,9x10 <sup>3</sup>	99,06	99,14	0,235	0,237
24	2,7x10 <sup>3</sup>	99,52	7,7x10 <sup>3</sup>	98,90	6,5x10 <sup>3</sup>	99,12	99,18	0,256	0,258



Apêndice B - Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL de ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação, referentes à média das triplicatas dos três ensaios realizados. (Cont. de UFC – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias; DP – Desvio Padrão; DPR – Desvio Padrão Relativo)

4 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,6x10 <sup>5</sup>	-	4,2x10 <sup>5</sup>	-	3,6x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	1,6x10 <sup>4</sup>	97,00	1,5x10 <sup>4</sup>	96,23	1,0x10 <sup>4</sup>	97,14	96,79	0,400	0,413
6	1,4x10 <sup>4</sup>	97,44	1,6x10 <sup>4</sup>	96,05	1,0x10 <sup>4</sup>	97,09	96,86	0,590	0,609
24	1,1x10 <sup>4</sup>	98,00	1,3x10 <sup>4</sup>	96,68	1,2x10 <sup>4</sup>	96,52	97,06	0,663	0,683

8 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,6x10 <sup>5</sup>	-	4,2x10 <sup>5</sup>	-	3,6x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	1,2x10 <sup>4</sup>	97,84	7,7x10 <sup>3</sup>	98,16	6,9x10 <sup>3</sup>	98,08	98,02	0,136	0,138
6	6,1x10 <sup>3</sup>	98,90	4,4x10 <sup>3</sup>	98,95	2,3x10 <sup>3</sup>	99,35	99,06	0,201	0,203
24	5,7x10 <sup>3</sup>	98,97	3,9x10 <sup>3</sup>	99,06	2,1x10 <sup>3</sup>	99,40	99,14	0,185	0,186

16 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	5,6x10 <sup>5</sup>	-	4,2x10 <sup>5</sup>	-	3,6x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	2,6x10 <sup>3</sup>	99,53	1,7x10 <sup>3</sup>	99,6	1,8x10 <sup>3</sup>	99,50	99,54	0,041	0,042
6	2,0x10 <sup>3</sup>	99,63	8,4x10 <sup>2</sup>	99,80	4,1x10 <sup>3</sup>	98,86	99,76	0,409	0,411
24	1,1x10 <sup>3</sup>	99,80	8,4x10 <sup>2</sup>	99,80	3,9x10 <sup>2</sup>	99,89	99,83	0,042	0,042

Apêndice C - Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL de cefepima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação, referentes à média das triplicatas dos três ensaios realizados. (Cont. de UFC – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias; DP – Desvio Padrão; DPR – Desvio Padrão Relativo)

8 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	9,65x10 <sup>5</sup>	-	5,7x10 <sup>5</sup>	-	5,3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	4,5x10 <sup>4</sup>	95,28	3,6x10 <sup>4</sup>	93,63	3,7x10 <sup>4</sup>	93,01	93,97	0,958	1,019
6	1,7x10 <sup>3</sup>	99,82	2,8x10 <sup>3</sup>	99,50	2,3x10 <sup>3</sup>	99,57	99,63	0,137	0,138
24	3,4x10 <sup>4</sup>	96,42	2,8x10 <sup>4</sup>	95,08	2,1x10 <sup>4</sup>	96,07	95,86	0,567	0,592

16 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	9,65x10 <sup>5</sup>	-	5,7x10 <sup>5</sup>	-	5,3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	2,7x10 <sup>4</sup>	97,22	4,5x10 <sup>3</sup>	99,21	1,8x10 <sup>4</sup>	96,61	97,68	1,110	1,136
6	2,9x10 <sup>2</sup>	99,97	4,5x10 <sup>2</sup>	99,92	4,7x10 <sup>2</sup>	99,91	99,93	0,026	0,026
24	6,2x10 <sup>3</sup>	99,36	4,7x10 <sup>3</sup>	99,18	4,8x10 <sup>3</sup>	99,09	99,21	0,112	0,113

32 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	9,65x10 <sup>5</sup>	-	5,7x10 <sup>5</sup>	-	5,3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	1,0x10 <sup>4</sup>	98,92	1,7x10 <sup>3</sup>	99,70	4,7x10 <sup>3</sup>	99,10	99,24	0,333	0,336
6	1,9x10 <sup>2</sup>	99,98	2,3x10 <sup>2</sup>	99,96	3,2x10 <sup>2</sup>	99,94	99,96	0,163	0,016
24	9,6x10 <sup>2</sup>	99,9	2,8x10 <sup>2</sup>	99,95	5,4x10 <sup>2</sup>	99,898	99,91	0,024	0,024

Apêndice D - Parâmetros da redução do número de UFC frente às concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL de cefepima encapsulada em lipossomas unilamelares, nos intervalos de tempos de 0, 2, 6 e 24 horas de incubação, referentes à média das triplicatas dos três ensaios realizados. (Cont. de UFC – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias; DP – Desvio Padrão; DPR – Desvio Padrão Relativo)

4 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	3,0x10 <sup>5</sup>	-	5,2x10 <sup>5</sup>	-	2,84x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	5,6x10 <sup>4</sup>	81,33	1,1x10 <sup>5</sup>	79,61	5,2x10 <sup>4</sup>	81,58	80,84	0,875	1,08
6	1,9x10 <sup>4</sup>	93,6	4,7x10 <sup>4</sup>	90,82	1,4x10 <sup>4</sup>	94,78	93,07	1,660	1,78
24	1,2x10 <sup>4</sup>	96,03	2,7x10 <sup>4</sup>	94,81	9,5x10 <sup>3</sup>	96,64	95,83	0,760	0,794

8 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	3,0x10 <sup>5</sup>	-	5,2x10 <sup>5</sup>	-	2,84x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	1,9x10 <sup>4</sup>	93,5	3,0x10 <sup>4</sup>	94,23	1,8x10 <sup>4</sup>	93,52	93,75	0,339	0,362
6	6,5x10 <sup>3</sup>	97,83	3,1x10 <sup>4</sup>	93,98	9,1x10 <sup>3</sup>	96,77	96,19	1,623	1,688
24	3,1x10 <sup>3</sup>	98,96	1,3x10 <sup>4</sup>	97,42	2,8x10 <sup>3</sup>	99,01	98,46	0,738	0,749

16 µg/mL									
Tempo	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Cont. de UFC	Redução	Média	DP	DPR
0	3,0x10 <sup>5</sup>	-	5,2x10 <sup>5</sup>	-	2,84x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
2	8,7x10 <sup>3</sup>	97,10	1,6x10 <sup>4</sup>	96,78	5,6x10 <sup>3</sup>	98,03	97,30	0,530	0,545
6	5,7x10 <sup>3</sup>	98,08	2,4x10 <sup>4</sup>	95,22	4,4x10 <sup>3</sup>	98,45	97,25	1,443	1,484
24	1,8x10 <sup>2</sup>	99,94	4,6x10 <sup>2</sup>	99,91	1,4x10 <sup>2</sup>	99,95	99,93	0,017	0,017