UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* contra micobactérias

Lilian Barbassa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* contra micobactérias

Lilian Barbassa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2010

Lilian Barbassa

Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e atividade *in vitro* contra micobactérias

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

À Deus, pelo dom da vida

Ao meu pai, por acreditar em mim, e sempre me apoiar nos meus sonhos e objetivos

À minha mãe e minhas irmãs que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos

Ao meu namorado pelo apoio e incentivo

AGRADECIMENTOS

À professora Elsa Masae Mamizuka por me receber em seu laboratório e me dar à oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo e dedicação.

À professora Ana Maria Carmona-Ribeiro pela orientação e pelo exemplo de determinação e dedicação à pesquisa. Obrigada por despertar em mim o interesse pela pesquisa.

Ao Professor Mario H. Hirata pela utilização do laboratório de micobactérias.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial ao Joás, Gisele e Walquiria.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade de São Paulo, Charline, Mariama, Franciele, Lara, Mônica, Patrícia e Nilton, obrigada pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biocolóides do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelos bons momentos de convivência e amizade.

À Letícia, minha amiga e companheira de trabalho.

Ao Júlio, obrigada pela amizade e ajuda sempre.

Às minhas amigas Belisa e Heloísa, muito obrigada pelo companheirismo e pelos bons momentos compartilhados.

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Análises Clínicas.

Às secretarias do Departamento de Análises Clínicas e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo atendimento às solicitações administrativas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

*“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho... porque cada pessoa é única para nós, e
nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de si mesmos.
Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela realidade da vida...a prova tremenda de que cada um é importante e que
ninguém se aproxima do outro por acaso.”*

Saint-Exupéry

RESUMO

BARBASSA, L. **Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* contra micobactérias.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Introdução: A tuberculose é uma infecção curável causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Requer tratamento prolongado e a combinação de vários fármacos implicando em efeitos colaterais que podem levar pacientes ao abandono do tratamento. Formulações de droga de liberação controlada como nanopartículas, nanoemulsões ou lipossomos têm tido sucesso contra doenças infecciosas. Em especial, brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) disperso em água pode formar lipossomos ou vesículas grandes (LV) ou fragmentos de bicamada (BF) que podem carrear drogas hidrofóbicas ou hidrofílicas e ademais, podem atuar como microbicidas. **Objetivos:** determinar atividade do DODAB contra *Mycobacterium tuberculosis* e *M. smegmatis* tanto isoladamente como em combinação com duas drogas tuberculostáticas, rifampicina (RIF) e isoniazida (ISO); determinar a incorporação de RIF e ISO em dispersões de DODAB. **Material e Métodos:** Dispersões de DODAB foram obtidas por vortexação (LV) ou sonicação (BF) e sua interação com as drogas foi avaliada por espectros óticos das drogas, espalhamento de luz dinâmico para medida de distribuição de tamanhos e potencial-zeta e diálise para determinação de incorporação dos fármacos em DODAB LV ou BF. Viabilidade de *M. smegmatis* ou *M. tuberculosis* foi determinada por contagem de viáveis em função de concentração de DODAB. Combinações DODAB/droga contra micobactérias foram avaliadas por determinação de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/ml. **Resultados:** DODAB mata *M. smegmatis* a partir de 4 µM de concentração e 1 h de interação e *M. tuberculosis*, em 100 µM e 120 h de interação. ISO resultou permeável através da bicamada de DODAB em contraste com RIF que adsorveu irreversivelmente nas bicamadas, resultando em 75% de incorporação com 0.1 e 2 mM de droga e DODAB, respectivamente. CIM de RIF contra *M. smegmatis* foi 32 e, em combinação com 2 de DODAB caiu para 2. Para *M. tuberculosis* CIM de 0,015 caiu para 0,007 em combinação com 4 DODAB. A combinação foi sinérgica contra *M. smegmatis* e de ação independente contra *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: *Mycobacterium*. Rifampicina. Isoniazida. Brometo de dioctadecildimetilamônio. Bicamadas catiônicas.

ABSTRACT

BARBASSA, L. Novel formulations for drugs based on dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB): preparation, characterization and evaluation of activity *in vitro* against mycobacteria. 2010. Dissertation (Master Degree) – School of Pharmaceutical Science, Universidade de São Paulo, 2010.

Introduction: Tuberculosis is potentially curable but remains a serious public health problem with large numbers of infected people in several countries. The long time that the patient should receive medication, associated with a large number of adverse effects often cause treatment failure. Nanoparticles, liposomes and emulsions have been used successfully in antibacterial therapy. In particular, dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) bilayers in form of bilayer fragments (BF) or vesicles (LV) provided adequate environment for solubilization and stabilization of several drugs with an additional advantage: they acted as antimicrobial agents themselves. **Objectives:** investigation of DODAB bactericidal activity against mycobacteria, determination of entrapment efficiency for rifampicin (RIF) and isoniazid (ISO) in DODAB dispersions and determination of the DODAB/drug activity against *Mycobacterium smegmatis* and *tuberculosis*. **Material and Methods:** DODAB dispersions were obtained by sonication of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) synthetic lipid (BF) or by vortexing (LV) the lipid powder in aqueous solution. The physic-chemical characteristics of drugs in DODAB dispersions were determined from optical spectra and dynamic light scattering for evaluating size distribution and zeta-potentials. Drug incorporation in DODAB dispersions was determined from dialysis. Cell viability was determined from plating and colony forming unities (CFU) counting as a function of [DODAB]. Minimal inhibitory concentration (MIC) was obtained for drug or DODAB/drug combinations. **Results:** DODAB killed *M. smegmatis* and *tuberculosis* from 4 μ M (1 h interaction) and 100 μ M (120 h interaction), respectively. Rifampicin drug particles above its solubilization limit could be solubilized by BF at 0.5 mM lipid. LV was leaky to ISO whereas RIF could be incorporated in BF or LV bilayer at high percentiles (0.1 mM RIF in 2 mM DODAB BF or LV). MIC for combination DODAB/RIF was 2/2 or 4/0.007 μ g/mL whereas synergism index was 0.5 or 1.0 against *M. smegmatis* or *M. tuberculosis*, respectively. DODAB and RIF acted synergistically when tested against *M. smegmatis*.

Key-words: *Mycobacterium*. Rifampicin. Isoniazid. Dioctadecyldimethylammonium bromide. Cationic bilayers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular de micobactérias	17
Figura 2. Estimativa do número de casos novos de tuberculose no mundo.....	20
Figura 3. Estrutura química da rifampicina.	25
Figura 4. Estrutura química da isoniazida	26
Figura 5. Captura de micropartículas por macrófagos infectados	28
Figura 6. Representação esquemática de uma vesícula lipídica unilamelar	31
Figura 7. Estrutura química do brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)	33
Figura 8. Viabilidade celular em função de concentração de DODAB.....	34
Figura 9. Curva de viabilidade celular e mobilidade eletroforética.....	34
Figura 10. Espectro de absorção óptica de anfotericina B	35
Figura 11. Determinação dos espectros ópticos da rifampicina	41
Figura 12. Rifampicina em água e no fragmento de bicamada de DODAB.....	42
Figura 13. Diálise para incorporação dos fármacos	43
Figura 14. Curva de viabilidade celular para <i>Mycobacterium smegmatis</i>	49
Figura 15. Curva de viabilidade celular para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
Figura 16. Espectros de absorção UV-visível de rifampicina	51
Figura 17. Figura de distribuição de tamanho de RIF (2mM) com BF (1mM).....	53
Figura 18. Figura de distribuição de tamanho de RIF (2mM) com BF (0,5mM).....	55
Figura 19. Espectro de absorção UV-visível de isoniazida.....	56
Figura 20. Distribuição de tamanho dos lipossomos de DODAB com RIF	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentagem do número de casos novos de tuberculose no mundo..... 20

Gráfico 2 . Percentual de casos novos bacilíferos de tuberculose por região do Brasil 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema de tratamento para casos novos de TB ou retratamento	23
Tabela 2- Esquema de tratamento para meningoencefalite.....	23
Tabela 3- Citotoxicidade diferencial de DODAB	36
Tabela 4- Comprimentos de onda de absorção máxima de RIF	52
Tabela 5- Média de diâmetros (Dz) e potencial-zeta (ζ) de RIF (2mM) com BF (1mM).....	54
Tabela 6- Média de diâmetros (Dz) e potencial-zeta (ζ) de RIF (2mM) com BF (0,5 mM)....	54
Tabela 7- Comprimentos de onda de absorção máxima e absorptividade molar (ϵ) da ISO	56
Tabela 8- Valores de absorbância de rifampicina livre e rifampicina lipossomal.....	57
Tabela 9- Tamanho e potencial-zeta das vesículas de DODAB com RIF	59
Tabela 10- Valores de absorbância de isoniazida e isoniazida lipossomal	60
Tabela 11- Concentração inibitória mínima (CIM) de RIF, DODAB ou DODAB/RIF	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMB	Anfotericina B
ASO	Asolecitina
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CH	Colesterol
DOC	Desoxicolato de sódio
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAB BF	<i>DODAB bilayer fragment</i>
DODAB LV	<i>DODAB large vesicle</i>
DCP	Dicetilfosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPE-PEG	Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPC	<i>Dipalmitoilphosphatidilcolina</i>
DOTS	<i>Directly observed treatment supervisory</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ISO	Isoniazida
LJ	Lowenstein-Jensen
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i>
MHA	Muller Hinton Ágar
OADC	<i>Oleic acid albumin dextrose complex</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Fosfatidilcolina
PCNT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose

PLG	<i>Poly-dl-Lactide-co-Glycolide</i>
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
TB	Tuberculose
Tc	Temperatura de Transição de Fase
TB MRD	Tuberculose multiresistente
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Mycobacterium</i> sp.	16
1.2 Patogênese da tuberculose	17
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Tratamento da tuberculose	21
1.5 Fármacos tuberculostáticos	24
1.6 Sistemas de entrega de drogas para o tratamento da tuberculose	27
1.7 Lipossomos	30
1.8 Sistemas de entrega de drogas baseados no DODAB	32
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Preparação das vesículas grandes (lipossomos) de DODAB	38
3.2 Preparação dos fragmentos de bicamada de DODAB	38
3.3 Cultivo bacteriano	39
3.4 Determinação de viabilidade celular para <i>M. smegmatis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	39
3.5 Caracterização físico-química da interação de DODAB com os fármacos	40
3.5.1 Determinação dos espectros ópticos de rifampicina e isoniazida	40
3.5.2 Determinação de tamanho e potencial-zeta de rifampicina em DODAB BF	41
3.5.3 Preparação de lipossomos de DODAB com rifampicina ou isoniazida	42
3.5.4 Determinação de incorporação dos fármacos no DODAB por diálise	42
3.5.5 Determinação de incorporação da rifampicina por ultracentrifugação	44
3.5.6 Preparação de lipossomos de DODAB/DPPC com isoniazida	44
3.5.7 Preparação de lipossomos multilamelares de asolecitina com isoniazida	45
3.6 Determinação de concentração inibitória mínima (CIM) para RIF ou DODAB	45
3.7 Determinação de concentração inibitória mínima (CIM) para DODAB/RIF	47
4. RESULTADOS	49
4.1 Efeito do DODAB sobre a viabilidade celular de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	49

4.2 Espectros ópticos de rifampicina em diferentes meios	50
4.3 Tamanho e potencial-zeta de rifampicina em DODAB BF	52
4.4 Espectros ópticos de isoniazida em diferentes meios.....	55
4.5 Incorporação de rifampicina em DODAB BF e LV.	57
4.6 Incorporação de isoniazida em DODAB LV e outros lipossomos	59
4.7 CIM de RIF, DODAB ou DODAB/RIF e sinergismo para as combinações.....	60
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

APÊNDICES

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium* sp

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica causada por um bacilo, *Mycobacterium tuberculosis*, que acomete principalmente os pulmões, podendo, porém afetar outros órgãos e tecidos do organismo (DUCATI *et al.*, 2008).

O agente da tuberculose humana pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium*. O complexo *M. tuberculosis* é constituído por cinco espécies de micobactérias intimamente relacionadas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* (DUNLAP *et al.*, 2000; DUCATI *et al.*, 2008).

São conhecidas mais de 60 espécies de micobactérias, a grande maioria fazendo parte do meio ambiente classificadas como micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas (DUNLAP *et al.*, 2000; DUCATI *et al.*, 2008).

M. tuberculosis é um bacilo delgado ligeiramente encurvado de 1 a 4 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, é um patógeno intracelular permanecendo principalmente nos macrófagos alveolares, é aeróbico estrito, não formadores de esporos, não produzem toxinas e não possuem cápsulas ou flagelos. Apresenta crescimento lento, cerca de 3 a 4 semanas para formar colônias visíveis mesmo em meios de cultura especiais (ANDERSEN, 1997; DUCATI *et al.*, 2008).

M. smegmatis é um microrganismo de crescimento rápido facilmente isolado do solo e da água com um papel importante na degradação de lipídeos do solo (JESENKÁ *et al.*, 2000). Quando observados ao microscópio óptico os bacilos apresentam-se com 3 a 5 µm de comprimento e são, ocasionalmente, encurvados. As colônias apresentam-se altas, rugosas e não pigmentadas. Colônias lisas com aspecto cremoso também podem ser visualizadas (SMEUDERS *et al.*, 1999). Por esta espécie apresentar baixa patogenia é em geral empregada como modelo para estudo de *M. tuberculosis*, principalmente por não haver necessidade de trabalhar com biossegurança nível três, mas também por apresentar rápido crescimento.

A parede celular das micobactérias apresenta uma estrutura extremamente singular composta por: peptideoglicano (ácido N–glicolilmurâmico) e ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa), esses estão covalentemente ligados ao polissacarídeo (arabinogalactano), que, por sua vez, liga-se ao peptideoglicano através de pontes fosfodiéster. A parede celular contém alguns tipos de lipídeos livres, não covalentemente associados a este esqueleto basal (o complexo arabinogalactano-peptideoglicano), além de algumas proteínas (PELCZAR, 1993; DUCATI *et al.*, 2008). A Figura 1 ilustra os componentes da parede celular das micobactérias.

Figura 1. Estrutura da parede celular de micobactérias (PELCZAR, 1993).

O alto teor de lipídeos na parede celular das micobactérias, cerca de 60%, confere a esses microrganismos características que a diferenciam das demais bactérias, como a resistência a descoloração por álcool-ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (DUCATI *et al.*, 2008).

1.2 Patogênese da tuberculose

M. tuberculosis é um patógeno intracelular capaz de estabelecer uma infecção por toda vida do hospedeiro. A disseminação da tuberculose ocorre através

do ar. O bacilo é transportado pelas gotículas de saliva expelidas pela fala, tosse ou espirro de pessoas infectadas pelo bacilo (MIMS *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2006).

Na infecção primária, o bacilo penetra nas vias aéreas, essas minúsculas partículas infecciosas atingem os alvéolos e então são fagocitadas por macrófagos alveolares não ativados, onde são destruídos ou sobrevivem e se multiplicam, os macrófagos infectados podem se disseminar durante a fase inicial da doença para os linfonodos locais, assim como para a corrente sanguínea e outros tecidos (p. ex. medula óssea, baço, rins, sistema nervoso central) (MIMS *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2006).

Macrófagos alveolares são estimulados a produzir fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outras citocinas inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, células T natural Killer além de células T CD4⁺ e CD8⁺ para produzir citocinas e aumentar a resposta imune (RUSSEL, 2007; MIMS *et al.*, 2005). As células T sensibilizadas liberam citocinas que ativam os macrófagos e aumentam sua capacidade de destruir as micobactérias. Com o objetivo de limitar a infecção, a resposta imune celular forma um granuloma, também chamado de tuberculoma, onde os macrófagos infectados são circundados por células do sistema imunológico. Depois de um tempo, o granuloma pode se curar espontaneamente, se tornar fibrótico ou calcificado, persistindo, assim, durante toda a vida de pessoas consideradas saudáveis. Esses tuberculomas aparecem na radiografia do tórax na forma de nódulos radiopacos. Entretanto, em uma pequena porcentagem da população com infecção primária, e, sobretudo no imunocomprometido, as micobactérias não ficam retidas nos granulomas, invadindo a corrente sanguínea e causando doença disseminada (MIMS *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2006; RUSSEL, 2007).

A tuberculose secundária ocorre através da reativação de micobactérias latentes e em geral é consequência de deficiências na função imune desencadeadas por outras causas como a desnutrição, infecção (p. ex. AIDS), quimioterapia para o tratamento de doenças malignas ou o uso de corticóides para o tratamento de doenças inflamatórias (MIMS *et al.*, 2005).

A efetividade da eliminação bacteriana está parcialmente relacionada ao tamanho do local da infecção. Agrupamentos localizados de macrófagos ativados

(granulomas) previnem a disseminação de mais bactérias. Estes macrófagos podem penetrar em pequenos granulomas e destruir todos os microrganismos lá contidos. Contudo, granulomas necróticos ou caseosos maiores se tornam encapsulados com fibrina, que protege efetivamente as bactérias da destruição pelos macrófagos. As bactérias podem permanecer ativas neste estágio ou serem reativadas anos depois, quando a resposta imunológica do hospedeiro enfraquecer como resultado de idade avançada, doença ou terapia imunossupressora (MURRAY *et al.*, 2006).

Aproximadamente 5% dos pacientes expostos a *M. tuberculosis* progridem para a doença ativa em 2 anos e outros 5 a 10% apresentam doença em algum momento posterior da vida. A probabilidade da progressão da doença depende tanto da dose infecciosa quanto da competência imune do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2006)

1.3 Epidemiologia

A tuberculose é uma das enfermidades documentadas de mais longa data na história da humanidade, e até meados do século XX era a principal causa de morte por doenças infecciosas, estimando que fosse responsável, anualmente, por sete milhões de óbitos no mundo (BATES *et al.*, 2004; DUCATI *et al.*, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2008 ocorreram 9,4 milhões de casos (equivalente a 139 casos por 100.000 habitantes) de tuberculose no mundo. Houve um aumento do número de casos em relação ao ano de 2007, com incidência de 9.3 milhões de casos. A Figura 2 mostra a estimativa da incidência de tuberculose de todas as formas em diferentes regiões do mundo no ano de 2008 (WHO, 2009).

Figura 2. Estimativa do número de casos novos de tuberculose (todas as formas) no mundo por 100.000 habitantes, no ano de 2008.

Dos casos estimados no ano de 2008, (55%) ocorreram na Ásia e (31%) na África, e em menores proporções no oriente do Mediterrâneo (6%), na Europa (5%) e nas Américas (3%) (Gráfico 1). A maioria dos casos de tuberculose ocorreu nos países em desenvolvimento, considerados prioritários para o controle da doença. A Ásia e a África apresentam os maiores coeficientes de incidência, atingindo todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (WHO, 2009).

Gráfico 1. Porcentagem do número de casos novos de tuberculose ocorridos no ano de 2008, em diferentes regiões do mundo.

Do número total de casos em 2008 (9.4 milhões de pessoas), 15% (1,4 milhões) foram detectados em pacientes HIV- positivo, destes, 78% foram encontrados na África e 13% na Ásia. Em relação aos índices de mortalidade, neste mesmo ano, ocorreram 1.3 milhões de mortes, incluindo 0,5 milhões em mulheres e HIV-negativos o que equivale a 20 mortes por 100.000 habitantes (WHO, 2009).

Ainda de acordo com estimativas da OMS, 80% dos indivíduos infectados estão concentrados em 22 países subdesenvolvidos, os cinco primeiros no *ranking* que apresentaram maiores índices de incidência no ano de 2008 foram a Índia (1,6 – 2,4 milhões), a China (1.0 – 1,6 milhões), o Sul da África (0,38 – 0,57 milhões), a Nigéria (0,37- 0,55 milhões) e Indonésia (0,34 – 0,52 milhões). A Índia e a China contam com uma estimativa de 35% dos casos de tuberculose no mundo inteiro.

O Brasil é o 19º país do mundo em número de casos novos de tuberculose, em 2009 ocorreram 72 mil casos da doença. Quanto à mortalidade, estima-se que cerca 4,7 mil óbitos ocorrem por ano (BRASIL, 2010). O Gráfico 2 mostra o percentual de casos novos bacilíferos de tuberculose por região do Brasil. As regiões com maiores percentuais no ano de 2009, foram as regiões Sudeste (45%) e Nordeste (27,3%), seguidas das regiões Sul, Norte e Centro-Oeste (BRASIL, 2010).

Gráfico 2 . Percentual de casos novos bacilíferos de tuberculose por região do Brasil no ano de 2009.

1.4 Tratamento da tuberculose

Com a descoberta da doença, vários tratamentos foram testados – alguns matando muito mais do que a própria doença – de modo que, até então, o tratamento consistia, basicamente, de repouso, nos casos leves, e pneumotórax, nos casos mais graves. Nas décadas seguintes, pesquisadores de países industrializados afirmavam que, com a melhora nas condições de trabalho, moradia, nutrição e na disponibilidade de terapêutica eficaz, a tuberculose tenderia ao efetivo controle e possível eliminação (RIEDER, 2001).

O controle da tuberculose passou a ser uma possibilidade a partir da concretização de três fatores: a melhora das condições de vida nos países industrializados no decorrer do século XX; o desenvolvimento de tecnologias para a operacionalização de programas efetivos de saúde pública; e a introdução, a partir da década de 40, de quimioterapia eficaz para o tratamento – especialmente a estreptomicina, a isoniazida e a rifampicina (VYNNYCKY E FINE, 1999).

No Brasil, a história do tratamento da doença começou em 1927, quando Arlindo de Assis aplicava pela primeira vez a vacina BCG oral em recém-nascidos; a partir da década de 1940, a mortalidade por tuberculose foi drasticamente reduzida devido à introdução de drogas tuberculostáticas como: estreptomicina, ácido para-amino-salicílico e isoniazida (ISO); em 1973, implantava-se a vacinação com BCG intradérmica, que passou a ser obrigatória para menores de um ano de idade a partir de 1976; três anos mais tarde, foi introduzido o esquema de tratamento (seis meses), baseado em rifampicina, isoniazida e pirazinamida (DUCATI *et al.*, 2008).

Em função da longa duração do tratamento, dos efeitos colaterais às drogas e da complacência humana com o tratamento, muitas vezes, o abandono (aumentando a probabilidade de surgirem bacilos resistentes às drogas), a OMS passou a investir na estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*), visando diminuir os casos de abandono ao tratamento e, conseqüentemente, aumentar a proporção de cura da doença. Essa estratégia baseia-se na terapia que é diretamente observada e que utiliza uma combinação de drogas (a combinação é utilizada para evitar que o bacilo se torne resistente às drogas); a terapia consiste na administração combinada de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, além de outros fármacos em casos de multiresistência às drogas (DUCATI *et al.*, 2008).

O esquema básico de tratamento para tuberculose em adultos e adolescentes consiste na administração de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante dois meses (fase intensiva) e mais 4 meses de rifampicina e isoniazida (fase de manutenção), este esquema de tratamento é indicado para os casos novos (paciente que nunca usou ou usou por menos de 30 dias medicamentos antituberculose) de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite) infectados ou não pelo HIV e ainda nos casos de retratamento ou retorno após abandono com doença ativa. Preconiza-se a solicitação de cultura, identificação e teste de sensibilidade em todos os casos de retratamento (BRASIL, 2009). O esquema de tratamento para estes casos está ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1- Esquema de tratamento para casos novos de TB ou retratamento

Regime	Fármacos	Meses
RHZE Fase Intensiva	RHZE comprimido em dose fixa combinada	2
RH Fase de manutenção	RH Cápsula	4

O esquema de tratamento para os casos de meningoencefalite consiste na administração de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante 2 meses (fase intensiva) e mais 7 meses de rifampicina e isoniazida (fase de manutenção). Este esquema de tratamento está ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2- Esquema de tratamento para meningoencefalite

Regime	Fármacos	Meses
RHZE Fase Intensiva	RHZE comprimido em dose fixa combinada	2
RH Fase de manutenção	RH Cápsula	7

A introdução do etambutol como quarto fármaco nos dois primeiros meses do esquema básico tem como justificativa a constatação do aumento da resistência primária à isoniazida e à resistência primária à isoniazida associada à rifampicina. Os comprimidos com dose fixa combinada dos 4 fármacos (4 em 1) para o esquema 1 apresenta algumas vantagens, entre elas, o maior conforto para o paciente pela redução do número de comprimidos a serem ingeridos, a impossibilidade de tomada isolada de fármacos e a simplificação da gestão farmacêutica em todos os níveis (BRASIL, 2009).

A isoniazida erradica rapidamente a maioria dos bacilos que estão se replicando nas duas primeiras semanas do tratamento, juntamente com estreptomicina e etambutol, enquanto a rifampicina e pirazinamida apresenta uma importante função na esterilização das lesões por erradicação dos bacilos; rifampicina e isoniazida são cruciais para o sucesso do tratamento no regime de tratamento de seis meses. Esses dois fármacos são os mais potentes entre aqueles que são utilizados no tratamento da doença, matando mais do que 99% dos bacilos após dois meses do início do tratamento (ISEMAN et al., 1989; MITCHISON, 1995).

A emergência de bacilos multiresistentes à essas drogas é um grande problema mundial, o tratamento é realizado com outras drogas que são menos efetivas, apresentando maiores efeitos tóxicos, resultando em um maior número de óbitos, especialmente em pacientes HIV- positivos (RATTAN, 2005).

1.5 Fármacos tuberculostáticos

A rifampicina é um fármaco fundamental no tratamento da tuberculose, seu mecanismo de ação é a inibição da subunidade β da RNA-polimerase (BURMAN, 2001). A rifampicina combina-se de maneira irreversível com as RNA-polimerases, bloqueando a transcrição do DNA. Como essa combinação é irreversível, esse antibiótico é bactericida e sua ação seletiva é explicada pelas diferenças existentes entre as RNA-polimerases encontradas nas bactérias e no organismo (ALTERTHUM, 2008).

A resistência das micobactérias a rifampicina é resultado de uma mutação no gene *rpoB* que é codificado pela subunidade β da RNA-polimerase (GILLESPIE, 2002). Aproximadamente 95% das mutações ocorrem em regiões menores do que 100 pb do gene *rpoB* (HEEP, 2001).

A estrutura química da rifampicina ou 3-[[[4-metil-1-piperazinil)imino]metil]rifamicina está na Figura 3. Sua fórmula química é $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$; possui peso molecular de 822.95 g/mol; é pouco solúvel em H_2O e acetona, solúvel em acetato de etila, metanol, tetrahidrofurano (THF), clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO). O limite de solubilidade da droga em água é 1,3 g/L ou 1,6 mM. Apresenta absorção máxima de luz em 237, 255, 334 e 475 nm (0,002 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4). Suas suspensões de 1% em água apresentam pH entre 4,5 a 6,5. Possui dois valores de pKa, sendo o primeiro de 1,7 referente à hidroxila da posição quatro, e o segundo de 7,9 referente ao nitrogênio três da piperazina. (MERCK, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2006).

Figura 3. Estrutura química da rifampicina.

Apesar da rifampicina ser um fármaco essencial no combate à tuberculose, como todo fármaco apresenta algumas desvantagens. Além das interações medicamentosas, apresenta diversos efeitos colaterais, como por exemplo, reações cutâneas, hepatotoxicidade, reações gastrointestinais e reações imunológicas graves. Outra característica marcante de quem utiliza a rifampicina é a coloração alaranjada da urina, suor e lágrimas em todos os pacientes (KATZUNG, 1998; LOUNIS, 2004).

O efeito bioquímico da isoniazida ocorre nos primeiros estágios da síntese dos ácidos micólicos. Isoniazida requer o produto do gene estrutural *KatG* para sua

ativação; esta droga passa a ser um composto ativo após metabolização pela catalase-peroxidase de *M. tuberculosis*, inibindo a atividade da enzima 2-trans-eonil-ACP (CoA) redutase (*InhA*), codificada pelo gene *inhA*. A resistência à isoniazida é mais complexa, pois envolve pelo menos 4 genes: o *KatG*, que medeia tanto a suscetibilidade como a resistência a isoniazida e codifica a enzima catalase-peroxidase; o *inhA*, envolvido no alongamento dos ácidos graxos; o *ahpC*, que codifica a enzima hidroperóxido alquil redutase C; e o *oxyR*, um importante regulador de estresse oxidativo (DUCATI, 2008).

A isoniazida é a hidrazida do ácido isonicotínico: 4-hidrazida ácida piridinocarboxílica. Sua estrutura química está na Figura 4. Seu peso molecular é 137,14 g/mol. Apresenta-se como um pó cristalino branco, solúvel em água (limite de solubilidade em água é 140 g/L ou 1 M), ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Suas soluções em água a 1% possuem pH de 5,5 a 6,5. Apresenta dois grupamentos protonáveis com valores de pKa de 2,0 e 3,5. Possui absorção máxima em 266, 265 nm (0,01 mg/mL em HCl 0,01N) (MERCK, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2006).

Figura 4. Estrutura química da isoniazida.

A isoniazida é absorvida rapidamente após ingestão oral e se distribui por todo o organismo, tanto no espaço extra como intracelular (HOLDINESS, 1984). O seu principal efeito colateral é a hepatotoxicidade, que pode ir desde um discreto aumento das transaminases até hepatite medicamentosa, que pode levar ao óbito. Outro efeito colateral importante é a neuropatia periférica, muito comum nos pacientes HIV- positivos (MOULDING, 1989).

Embora exista um tratamento eficaz para a doença, a taxa de mortalidade ainda continua muito elevada em diversas regiões do mundo. A terapia não tem surtido o sucesso esperado devido a alta taxa de abandono ao tratamento, como

consequência do longo período e dos efeitos colaterais indesejados ao paciente. Diante dessa situação existe grande interesse no desenvolvimento de novas formas de administração que proporcionem o aumento do índice terapêutico, redução no tempo do tratamento, dos efeitos colaterais e do número de doses.

1.6 Sistemas de entrega de drogas para o tratamento da tuberculose

Para minimizar a toxicidade e diminuir a taxa de abandono ao tratamento, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com a utilização de micropartículas, lipossomos e outros carreadores baseados em sistemas de entrega de drogas com o objetivo de atingir o sítio de infecção de *M. tuberculosis* ou reduzir as dosagens, resultando em uma importante estratégia para melhorar o tratamento (PANDEY *et al.*, 2003). Quando encapsuladas nos carreadores, as drogas são lentamente liberadas e o seu tempo de vida no plasma é maior. A encapsulação de drogas em lipossomos vem mostrando melhor eficácia do que quando as mesmas estão livres em modelo animal (SHARMA *et al.*, 1997).

Várias pesquisas foram desenvolvidas com o uso de nanopartículas de PLG (poly-DL-lactide-co-glycolide), esse é um polímero completamente biodegradável e biocompatível. Essas nanopartículas estão sendo utilizadas para encapsular drogas tuberculostáticas (BARROW, 1998; GANGADHARAM *et al.*, 1999).

As doses recomendadas de isoniazida e rifampicina para o tratamento da tuberculose são liberadas do plasma em menos de 24 horas. Rifampicina e isoniazida encapsuladas em nanopartículas de PLG apresentam um tempo de liberação da droga mais prolongado (DUTT *et al.*, 2001; AIN *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2004). O comportamento das nanopartículas de PLG com rifampicina foram avaliados em macrófagos alveolares da linhagem NR8383, observou-se que as nanopartículas são capturadas pelos macrófagos alveolares localizando-se em fagossomos, o rompimento das micropartículas para liberação do fármaco ocorre com a ação dos fagolisossomos para agir contra as micobactérias alojadas dentro dos macrófagos, os restos celulares são degradados pelos lisossomos. A rifampicina

é liberada no citosol de forma intacta (Figura 5) (ONOSHITA *et al.*, 2010; BLASI *et al.*, 2009).

Figura 5. Representação esquemática da captura de micropartículas por macrófagos infectados com micobactéria e a liberação do fármaco dentro dos macrófagos.

As nanopartículas de PLG contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida administradas oralmente em camundongos foram detectadas após 6 dias (RIF) e 9 dias (ISO e PZA) no plasma dos animais, a concentração terapêutica foi mantida nos tecidos durante 9-11 dias. Não foram detectados bacilos nos tecidos infectados com *M. tuberculosis* depois da administração oral de 5 doses durante 10 dias das nanopartículas (PANDEY *et al.*, 2003a). Resultados comparáveis foram obtidos depois da administração das nanopartículas por nebulização. Os níveis terapêuticos das drogas foram mantidos no plasma durante 6 – 8 dias e nos pulmões durante 11 dias depois de 5 doses durante 10 dias, bacilos não foram detectados nos pulmões (PANDEY *et al.*, 2003b). A vantagem da terapia por nebulização é a entrega da droga diretamente no órgão alvo, ou seja, nos macrófagos alveolares, reduzindo o risco de toxicidade sistêmica (PANDEY *et al.*, 2005).

Nanopartículas contendo somente rifampicina administradas em camundongos exibiram significativa redução de bacilos nos pulmões após 28

(SUAREZ *et al.*, 2001) e 26 dias (QUENELLE *et al.*, 1999) após infecção com *M. tuberculosis*.

Deol *et al.* 1997, estudaram a eficácia terapêutica de lipossomos multilamelares compostos de fosfatidilcolina (PC), colesterol (CH), dicetilfosfato (DCP) e distearoilfosfatidiletanolamina-polietileneglicol 2000 (DSPE-PEG 2000) contendo rifampicina e isoniazida em camundongos infectados com *M. tuberculosis*. A eficácia da droga livre e droga lipossomal foram avaliadas quanto à eliminação de micobactérias no fígado, pulmão e baço dos camundongos infectados, através de contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) nos tecidos infectados. A redução de UFC nesses órgãos foi significativamente maior com as drogas lipossomais do que quando as drogas estavam livres. A hepatotoxicidade das formulações também foi determinada, os níveis de bilirrubina foram diminuídos nos fármacos lipossomais comparados com a droga livre, o mesmo ocorreu com a dosagem de enzimas hepáticas. Posteriormente, Labana *et al.* 2002, demonstrou que essa formulação exibiu liberação controlada dos fármacos no plasma durante 5 dias, sendo verificada a presença de fármacos no pulmão, fígado e baço 7 dias após a administração.

Lipossomos multilamelares compostos de fosfatidilcolina e colesterol contendo rifampicina e isoniazida administrados por nebulização em cobaias mostrou que o nível plasmático das drogas permanece por mais de 48 horas na formulação lipossomal, enquanto as drogas livres são detectadas por menos de 24 horas (PANDEY, 2004a).

A terapia oral de drogas tuberculostáticas é efetiva, mas ainda está associada com algumas desvantagens. Mais de 80% dos casos de tuberculose são de tuberculose pulmonar e altas doses das drogas são administradas diariamente porque somente uma pequena fração da dose total chega aos pulmões depois da administração oral, por isso a necessidade do tratamento por um longo período, um regime que a maioria dos pacientes encontram dificuldades em aderir. Os sistemas de entrega de drogas apresentam algumas vantagens, os fármacos podem ser administrados por via respiratória (pulmonar), onde a entrega da droga é direta para o órgão alvo; alvo para os macrófagos alveolares que são usados pelas micobactérias como um sítio protetor para prolongar sua sobrevivência, além da

redução da toxicidade sistêmica das drogas melhorando o tratamento aos pacientes (PANDEY *et al.*, 2005). Os lipossomos são bastante efetivos na quimioterapia contra infecções micobacterianas por chegarem até os macrófagos e liberar seu conteúdo intracelularmente.

1.7 Lipossomos

Lipossomos são estruturas vesiculares e microscópicas formadas basicamente por fosfolipídeos organizados em bicamadas concêntricas que circundam um compartimento aquoso interno. Eles são formados espontaneamente quando anfifílicos são dispersos em água (LASIC, 1999). Os anfifílicos formadores dos lipossomos se agregam formando assim as bicamadas, que se fecham sobre si mesmas, formando estruturas esféricas onde uma ou mais camadas lipídicas englobam parte da solução de fármaco no seu interior (GREGORIADIS *et al.*, 1993).

Estes sistemas podem solubilizar fármacos lipofílicos (hidrofóbicos) na bicamada lipídica e substâncias hidrofílicas podem ser incorporadas no compartimento aquoso interno, ou ainda moléculas anfifílicas entre a bicamada e a fase aquosa (LASIC, 1999), como ilustrado na Figura 6.

Os lipossomos podem conter uma única bicamada lipídica ou múltiplas bicamadas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificadas em unilamelares ou multilamelares, respectivamente. Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo classificadas como vesículas unilamelares pequenas – SUV (*small unilamellar vesicles*) e vesículas unilamelares grandes – LUV (*large unilamellar vesicles*) (LASIC, 1998).

Figura 6. Representação esquemática de uma vesícula lipídica unilamelar mostrando interações com diferentes substâncias.

As vesículas lipídicas são constituídas basicamente por fosfolipídios que podem ser de natureza sintética ou natural (VEMURI *et al.*, 1995). Os lipídeos mais utilizados nas formulações lipossomais são os que apresentam forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e efingomielina, que tende a formar bicamada estável em solução aquosa. Lípidos sintéticos tais como o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), com duplas cadeias hidrocarbônicas longas, também podem formar vesículas (CARMONA-RIBEIRO e CHAIMOVICH, 1983; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1985; CARMONA-RIBEIRO, 1992, CARMONA-RIBEIRO, 1993; CARMONA-RIBEIRO, 2000).

Os fosfolipídeos apresentam uma temperatura de transição de fase (T_c), na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarbonada do lipídeo está em estado ordenado, para uma fase líquido cristalina, onde as moléculas ficam em movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor de T_c . Portanto, diferentes membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura (LASIC, 1998). A temperatura de transição de fase para o anfífilico DODAB foi determinada como sendo 44,3°C em água (VIEIRA *et al.*, 2006).

Várias técnicas de preparação dos lipossomos têm sido descritas na literatura, entre elas, hidratação do lípido seguida de aquecimento e agitação por vortexação (CARMONA-RIBEIRO e CHAIMOVICH, 1983); e para a remoção de

material não encapsulado utiliza-se os métodos de diálise e ultracentrifugação (BARENHOLZ e CROMMELIN, 1994). Essas foram as técnicas utilizadas neste trabalho, mas existem outras descritas na literatura.

Após incorporação do composto terapêutico nos lipossomos e a remoção da quantidade não encapsulada, as vesículas podem ser caracterizadas quanto à concentração de lipídeos e de composto terapêutico encapsulado (CAVALHEIROS, 2001). A determinação da concentração dos lipídeos pode ser feita por análise quantitativa, pode-se fazer leitura da amostra em espectrofotômetro para obter os valores de absorbância da droga após o rompimento da vesícula com solventes orgânicos (etanol ou metanol) ou com detergentes (Triton X-100), por exemplo. A partir dos dados de concentração dos lipídeos e de composto terapêutico de uma determinada amostra, é possível avaliar a eficiência de incorporação, antes e após a remoção do fármaco não encapsulado (CAVALHEIROS, 2001). A distribuição de tamanhos dos lipossomos formados é obtida por espalhamento de luz dinâmico por incidência de raios laser (*quase-elastic light scattering*).

1.8 Sistemas de entrega de drogas baseados em brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)

O anfifílico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) um composto de amônio quaternário forma bicamadas fechadas e estáveis (chamadas vesículas ou lipossomos), por autoassociação em solução aquosa (CARMONA-RIBEIRO e CHAIMOVICH, 1983; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1985; CARMONA-RIBEIRO, 1992, CARMONA-RIBEIRO, 1993; CARMONA-RIBEIRO, 2000). Estas vesículas podem ser vistas como “polications” altamente carregados.

A Figura 7 mostra a estrutura química de DODAB e as estruturas por ele formadas, vesículas fechadas (DODAB LV) ou fragmentos de bicamada (DODAB BF). Vários trabalhos caracterizam essa formação em sistema aquoso (VIEIRA *et al.*, 2003; CARMONA-RIBEIRO, 2001). Dependendo do método de dispersão do DODAB, vesículas grandes ou fragmentos de bicamada são formados. Usando método de dispersão ultrasônica o pó de DODAB pode ser disperso em sistema aquoso, formando inicialmente vesículas fechadas que, a seguir, se rompem por

efeito do ultrassom gerando os fragmentos de bicamada, os quais oferecem regiões hidrofóbicas adequadas para solubilizar substâncias ou drogas hidrofóbicas (VIEIRA *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2003). Devido às duplas cadeias hidrocarbônicas saturadas do DODAB e cabeça de amônio quaternário, DODAB é um lípide quimicamente estável que não está sujeito à hidrólise ácido/base ou à lipoperoxidação, sendo por isso mais adequado que os fosfolípides convencionais para entrega de drogas. Além disso, DODAB apresenta também notável atividade antimicrobiana (CAMPANHÃ *et al.*, 2001; LINCOPAN *et al.*, 2005; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2006).

Figura 7. Estrutura química do brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e arranjos supramoleculares do DODAB em solução aquosa como vesícula fechada (LV) ou fragmento de bicamada (BF).

Os compostos de amônio quaternário são agentes ativos de membrana, ou seja, os sítios de ação predominantes são a membrana citoplasmática nas bactérias ou membrana plasmática nas leveduras. Os agentes catiônicos como os compostos de amônio quaternário, são os mais úteis anti-sépticos e desinfetantes, e são conhecidos também como tensoativos catiônicos (MURRAY *et al.*, 1999; MC DONELL e RUSSEL, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

Os lipossomos de DODAB são bactericidas (TAPIAS *et al.*, 1994; SICCHIEROLLI *et al.*, 1995; MARTINS *et al.*, 1997, CAMPANHÃ *et al.*, 1999), em concentrações que praticamente não afetam células de mamíferos em cultura (CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1997). A ação bactericida do DODAB foi demonstrada para quatro espécies bacterianas de importância clínica, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além da *E.coli* (CAMPANHÃ *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 1997). A susceptibilidade das quatro espécies bacterianas ao DODAB foi demonstrada e comparada através de curvas de viabilidade celular, como apresentado na Figura 8 (CAMPANHÃ *et al.*, 1999).

Foi estabelecida a relação entre carga da superfície celular das bactérias e vida ou morte. Quando essa superfície encontrava-se positiva, as bactérias apresentavam viabilidade celular de 0% como mostra a Figura 9.

Figura 8. Viabilidade celular (%) em função de concentração de DODAB com 1 hora de interação entre bactéria e DODAB. Em (a) *E. coli*, (b) *S. typhimurium*, (c) *S. aureus*, (d) *P. aeruginosa*. Reproduzido de CAMPANHÃ et al., 1999.

Figura 9. Curva de viabilidade celular de *E. coli* (2.2×10^7 UFC ml) *S. aureus* (2.5×10^7 UFC ml) e mobilidade eletroforética em função de concentração de DODAB. A interação entre bactérias e DODAB foi de 1h, seguida de plaqueamento e medidas de mobilidade eletroforética. Reproduzido de CAMPANHÃ et al., 1999.

A ação antimicrobiana das vesículas de DODAB foi estendida aos fungos. A ação antifúngica do DODAB foi estudada para *Candida albicans*, através de curvas de viabilidade celular (CAMPANHÃ *et al.*, 2001).

A solubilização de duas drogas antifúngicas hidrofóbicas, anfotericina B e miconazol em fragmentos de bicamada de DODAB, mostrou a possibilidade de utilizar o DODAB como carregador destas drogas. A solubilidade de Anfotericina B (AMB) nos fragmentos de bicamada está ilustrada na Figura 10. Na Figura 10(a) está representada a solubilização de AMB em água e no seu melhor solvente orgânico (DMSO), o espectro em água é característico da forma agregada de AMB, é evidente a diferença da droga totalmente solúvel (forma monomérica de AMB). Em contrapartida, o espectro de AMB quando solubilizada nos fragmentos de bicamada de DODAB é totalmente semelhante ao espectro do fármaco no seu melhor solvente orgânico (Figura 10b), mostrando a solubilização de AMB nos fragmentos de bicamada de DODAB ((LINCOPAN *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2005; LINCOPAN *et al.*, 2006).

Figura 10. Espectro de absorção óptica de anfotericina B (AMB). Em (a) AMB em DMSO: metanol (1:1) (linha inteira) ou em água (linha pontilhada); (b) AMB em DODAB (linha inteira) ou DOC (linha pontilhada). Concentração final de AMB e DODAB 7 mg/L e 1.4 g/L, respectivamente. Reproduzido de Lincopan *et al.*, 2003.

DODAB é um potente agente bactericida e apresenta citotoxicidade diferencial para células bacterianas, fúngicas e células de mamíferos em cultura. As células bacterianas são muito sensíveis a ação de DODAB, concentrações de micromolar são capazes de matar quatro espécies de importância clínica e o fungo *Candida albicans* (MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 2007).

A Tabela 3 mostra a citotoxicidade diferencial de DODAB. Para matar células de mamíferos são necessárias concentrações muito mais altas de DODAB do que para matar células de bactérias e fungos. Considerando as células epiteliais de rim, a concentração de DODAB para 50% de sobrevivência das células em cultura é de 5.4 mM.

Tabela 3- Citotoxicidade diferencial de DODAB. Tempo de interação de 1 hora entre DODAB e células.

Tipo de célula	Concentração de células viáveis (células/mL)	Concentração para 50% de sobrevivência (mM)	Referências
Kidney epithelial cells	10^5	5.400	Lincopan et al., 2005
Normal Balb-c 3T3 (clone A31)	10^4	1.000	Carmona-Ribeiro et al., 1997
mouse fibroblasts SV40-transformed SVT2 mouse fibroblasts	10^4	1.000	Carmona-Ribeiro et al., 1997
<i>C. albicans</i>	2×10^6	0.010	Campanhã et al., 2001
<i>E. coli</i>	2×10^7	0.028	Campanhã et al., 1999; Martins et al., 1997
<i>S. typhimurium</i>	2×10^7	0.010	Campanhã et al., 1999
<i>P. aeruginosa</i>	3×10^7	0.005	Campanhã et al., 1999
<i>S. aureus</i>	3×10^7	0.006	Campanhã et al., 1999

As vantagens especiais para a utilização dos lipossomos de DODAB para encapsular os fármacos tuberculostáticos seriam o baixo custo, a atividade antimicrobiana e possível ação sinérgica com a droga carregada, que não estão disponíveis para lipossomos convencionais.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito bactericida de dispersões de DODAB isoladas e com fármacos tuberculostáticos encapsulados contra *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar efeitos do DODAB sob a viabilidade celular de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*.
2. Avaliar o efeito do tipo de preparação de DODAB sob a viabilidade celular de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*.
3. Determinar a incorporação de fármacos tuberculostáticos em vesículas grandes e/ou fragmentos de bicamada de DODAB como isoniazida e rifampicina.
4. Determinar a concentração inibitória mínima do DODAB isolado e em combinação com fármacos tuberculostáticos contra as cepas de micobactérias.
5. Verificar se existe sinergismo ou não entre fármacos tuberculostáticos e o DODAB contra cepas de micobactérias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das vesículas grandes (lipossomos) de DODAB

Para preparação das vesículas grandes de DODAB, o pó de DODAB foi pesado analiticamente e transferido para um frasco, adicionando-se a quantidade necessária de solução de D-glicose 0,264 M para obtenção da concentração desejada e deixado em banho maria (30 minutos; 60°C), isto é, acima da temperatura de transição de fase das vesículas de DODAB que foi determinado como sendo 44,3°C em água (VIEIRA *et al.*, 2006). A amostra foi retirada do banho maria por três vezes e vortexada para a formação das vesículas.

Foi feita a dosagem da dispersão por titulação com nitrato de mercúrio e difenilcarbazona como indicador (SCHALES & SCHALES, 1941). Vesículas com tamanho médio de 300 - 500 nm e potencial-zeta positivo foram obtidas.

3.2 Preparação dos fragmentos de bicamada de DODAB

Sonicação com tip foi o método utilizado para produzir os fragmentos de bicamada em solução de D-glicose 0,264 M. O processo de sonicação foi realizado a temperatura de 50 a 60°C (CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1983), durante 20 minutos. Posteriormente foi realizada a centrifugação da amostra durante 1h (10000 rpm, 4°C) para remoção de partículas de titânio adicionadas a solução devido ao sonificador e remoção de eventuais vesículas multilamelares (FENDLER, 1980; MORTARA, 1978). Fragmentos de bicamada com diâmetro médio de 80 nm e potencial-zeta positivo foram obtidos.

Após a preparação, foi confirmada a concentração analítica através de microtitulação com nitrato de mercúrio (SCHALES & SCHALES, 1941), em que o princípio do método consiste em dosar o contra-íon brometo do anfifílico, utilizando difenilcarbazona como solução indicadora.

3.3 Cultivo bacteriano

M. smegmatis (ATCC mc²155) foi reativada, em Caldo Middlebrook 7H9 (Difco - Detroit, USA) durante 48 horas a 30°C sob agitação em shaker (150 rpm), e então semeadas em placas com Mueller-Hinton Ágar (MHA- Hi-Media Laboratories, Índia) e incubadas por 72 horas em estufa a 30°C. Uma alçada desta cultura foi inoculada em 10 ml de caldo Middlebrook 7H9 e incubada a 30°C sob agitação, por 48 horas, período em que a cepa encontra-se na fase exponencial de crescimento, a partir daí os experimentos foram realizados.

A suspensão bacteriana de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi preparada dispensando-se uma alçada da amostra que estava em crescimento por aproximadamente 28 dias no meio Lowestwein-Jensen (BBLTM – Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, MD, EUA) em tubos de vidro com tampa de rosca, contendo pérolas de vidro estéreis em 2 ml de água destilada estéril. Após homogeneização em agitador mecânico, 200 µl foi transferido para um tubo contendo 2 ml de meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (BBLTM – Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, MD, EUA) e 0.2% de glicerina. Essas culturas foram incubadas em shaker sob agitação a 37°C durante 7 a 10 dias para atingir a fase exponencial de crescimento.

Para trabalhar com *M. tuberculosis*, todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar apropriado (classe II B2) dentro do Laboratório de Biossegurança Nível 3 que é anexo ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

3.4 Determinação de viabilidade celular de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* em função de dispersões de DODAB

Após cultivo das suspensões bacterianas como descrito no item anterior as mesmas foram centrifugadas por 10 minutos e lavadas em solução de D-glicose 0,264 M, o processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais duas vezes. As suspensões bacterianas em D-glicose foram padronizadas com o tubo 1 da

escala de McFarland, a partir daí foi realizada a interação das células bacterianas com as dispersões de DODAB para determinar a viabilidade celular.

A viabilidade celular em função da concentração de células ajustadas, na presença de DODAB foi determinada após incubação, colocando para interagir 0,5 ml da suspensão bacteriana com 0,5 ml de DODAB em concentrações que variaram de 0,0005 a 1 mM. O controle positivo foi realizado pela interação de 0,5 ml da suspensão bacteriana e 0,5 mL de solução de D-glicose 0,264 M.

Após interação foi realizada diluição seriada (10^{-1} a 10^{-4}) de cada tubo (em solução de D-glicose 0,264 M), foram tomados 100µl da diluição e semeados, em duplicata, em placas MHA com auxílio de uma alça de Drigalski, a diluição seriada foi realizada para facilitar a contagem células viáveis após o período de 72 horas de incubação a 30°C no caso de *M. smegmatis*. O plaqueamento de *M. tuberculosis* foi feito em placas de Ágar Middlebrook 7H10 suplementado com OADC e glicerol, estas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, 10% de umidade e 37° C por um período de 3 a 4 semanas. A contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada após período de incubação das placas e a partir daí foram plotadas as curvas de viabilidade celular.

3.5 Caracterização físico-química da interação de DODAB com os fármacos

3.5.1 Determinação dos espectros ópticos de rifampicina e isoniazida em diferentes meios

Foi preparada uma solução estoque de rifampicina 1 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO), este é o melhor solvente orgânico para a rifampicina, alíquotas de 5-20µl desta solução foram adicionadas a cubetas contendo água, DMSO, fragmentos de DODAB e vesículas grandes de DODAB para a determinação do espectro UV-visível no melhor solvente e nas dispersões de DODAB (Figura 11). A varredura foi feita em comprimento de onda de 260 a 600 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000.

Figura 11. Determinação dos espectros ópticos da rifampicina em diferentes solventes.

A solução de isoniazida foi preparada na concentração de 1 mg/ml em água (o melhor solvente para este fármaco) essa solução foi diluída e determinado o espectro UV-visível em água e vesículas grandes de DODAB, em comprimento de onda de 240 a 400 nm.

3.5.2 Interação de rifampicina e fragmentos de bicamada de DODAB monitoradas por medida de distribuição de tamanhos e potencial-zeta

Para verificar a solubilidade da rifampicina no fragmento de bicamada de DODAB foi preparada uma solução estoque deste fármaco na concentração de 20 mM em DMSO, 200 µl desta solução foi adicionado a uma cubeta contendo água (concentração final de 2 mM, ou seja, acima do seu limite de solubilidade em água), e outros 200 µl adicionados a cubetas contendo fragmentos de bicamada de DODAB para concentrações finais de 0,5 e 1 mM (Figura 12).

Figura 12. Interação de rifampicina em água e no fragmento de bicamada de DODAB.

As medidas de tamanho e potencial-zeta da droga isolada em água e quando nos fragmentos de bicamada de DODAB foram determinadas usando o equipamento Zeta-Plus (Zeta-Potential Analyser-Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA) equipado com um laser de 570 nm e espalhamento de luz dinâmica a 90°.

3.5.3 Preparação de vesículas grandes (lipossomos) de DODAB com rifampicina ou isoniazida

Rifampicina e isoniazida foram solubilizadas em solução de D-glicose 0,264 M na concentração de 0,1 mM (as soluções foram preparadas isoladamente), e adicionadas ao pó de DODAB pesado para uma concentração final de 2 mM. Após misturar DODAB com rifampicina ou isoniazida, as vesículas foram preparadas conforme descrito no item 3.1. No processo de formação das vesículas, as drogas são incorporadas no compartimento aquoso interno do lipossomo ou na bicamada lipídica, dependendo da característica de solubilidade de cada droga.

3.5.4 Método de diálise para determinação da porcentagem de incorporação dos fármacos nas dispersões de DODAB

As membranas celulósicas para diálise foram obtidas da Sigma-Aldrich, cortadas em um comprimento de aproximadamente 10 cm e fervidas em uma solução 0,1 M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por 30 minutos para abertura dos poros. Depois foram lavadas exaustivamente com água Milli-Q.

Para a diálise, 3 alíquotas de 2 mL da solução de DODAB/RIF foram transferidas para os saquinhos de celulose (Figura 13). Os saquinhos foram mergulhados em um béquer com 250 ml de solução de D-glicose 0,264 M sob leve agitação durante 24 horas, trocando-se a solução de D-glicose após 1, 2, 3 e 8 horas.

Figura 13. Diálise para incorporação dos fármacos no DODAB. Saquinhos de celulose contendo a dispersão DODAB/RIF mergulhados em béquer contendo solução de D-glicose 0,264 M.

Antes da diálise foram feitas as leituras de absorbância das 3 amostras, em comprimento de onda de 334 nm, e depois da diálise também foram feitas leituras de absorbância das amostras para determinar a concentração de rifampicina incorporada no DODAB. Os lipossomos foram tratados com 50% de etanol para o rompimento da vesícula e determinação da concentração de rifampicina incorporada. Saquinhos de celulose contendo somente a solução de RIF 0,1 mM e somente solução de DODAB 2 mM foram dialisadas nas mesmas condições para controle do experimento, para essas amostras também foram feitas as leituras de absorbância antes e depois da diálise em 50% de etanol.

Amostras de 2 ml de isoniazida 0,1 mM foram colocadas em saquinhos de celulose e amarrados como descrito acima. Para este fármaco o tempo de diálise necessário para incorporação foi menor, as amostras foram dialisadas por um período de 12 horas, com duas trocas da solução de D-glicose. Foram realizadas as

leituras de absorbância antes e depois da diálise para determinar a concentração de isoniazida incorporada. Antes da diálise foram feitas as leituras de absorbância das 3 amostras, em comprimento de onda de 260 nm, e depois da diálise também foram feitas as leituras de absorbância das amostras para determinar a concentração de isoniazida incorporada ao DODAB. As amostras foram tratadas com 50% de etanol para o rompimento da vesícula e determinação da concentração de isoniazida. Saquinhos de celulose contendo somente a solução de ISO 0,1 mM e somente solução de DODAB 2 mM foram dialisadas nas mesmas condições para controle do experimento, para essas amostras também foram feitas as leituras de absorbância antes e depois da diálise em 50% de etanol.

3.5.5 Determinação da incorporação de rifampicina em vesículas de DODAB por ultracentrifugação

A preparação lipossomal (DODAB/RIF), foi centrifugada em ultracentrífuga (BECKMAN *optima TLX ultracentrifuge*), por 5 horas a 80.000 rpm, para determinar a incorporação da droga por este método. A dispersão lipídica de DODAB 2 mM e a solução da droga isolada foi centrifugada para controle do experimento, o sobrenadante da dispersão de DODAB isolado foi o branco para a leitura do sobrenadante de droga livre (que não ficou retida no lipossomo). As leituras de absorbância foram feitas em 334 nm, em espectrofotômetro Hitachi 2000. A concentração de droga incorporada (C_{Inc}) foi calculada usando a fórmula abaixo:

$$C_{Inc} = C_{total} - C_{sobrenadante}$$

A porcentagem de incorporação foi calculada da seguinte maneira:

$$\% Inc = (C_{total} - C_{sobrenadante}) / C_{total} \times 100$$

3.5.6 Preparação de lipossomos de DODAB/DPPC na presença de isoniazida

Para a preparação de vesículas de DODAB/DPPC (DPPC-dipalmitoil fosfatidilcolina), o pó foi pesado para uma concentração de 1 mM para cada lípide. A

mistura foi hidratada com solução de clorofórmio e a seguir esse solvente foi evaporado sob fluxo de N₂ para a formação do filme lipídico. Para a remoção total do solvente, o filme lipídico permaneceu sob vácuo por 2 horas à temperatura ambiente. As vesículas foram preparadas por hidratação do filme lipídico com solução de isoniazida 0,1 mM, ou hidratação do filme com água, para controle do experimento. Após hidratação do filme lipídico, as vesículas foram preparadas conforme descrito no item 3.1, as dispersões foram colocadas em banho maria (30 minutos, 60°C), retiradas do banho maria por três vezes para vortexação. A concentração final de lípide foi de 2 mM. (SOBRAL *et al*, 2008). As vesículas DPPC/DODAB contendo isoniazida foram dialisadas para verificação da eficiência de incorporação. As leituras de absorbância também foram realizadas antes e depois da diálise em 50% de etanol, em comprimento de onda de 260 nm.

3.5.7 Preparação de lipossomos multilamelares de asolecitina na presença de isoniazida

O pó de asolecitina (ASO) foi pesado para uma concentração de 2 mM, o pó foi hidratado com solução de isoniazida 10 mM, ou com água. A preparação foi vortexada várias vezes para a formação das vesículas (Kagawa & Racker, 1966). As vesículas de asolecitina contendo isoniazida foram dialisadas para verificação da eficiência de incorporação. Antes das leituras de absorbância (260 nm) as amostras foram tratadas com Triton X-100 (detergente), para o rompimento das vesículas.

3.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de rifampicina ou DODAB contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*

O método de macrodiluição foi utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para *M. smegmatis* frente à rifampicina e DODAB, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (*Cinical Laboratory Standards Institute* M07-A8 e M24-A), e no caso de *M. tuberculosis* foi utilizada a microplaca para diluição dos fármacos. Foi necessário realizar uma adaptação ao teste, componentes do meio de

cultura (p.ex. aminoácidos) poderiam inativar a ação do DODAB (LINCOPAN *et al.*, 2006). A solução de D-glicose 0,264 M foi utilizada para substituir o meio de cultura para a diluição dos fármacos e padronização do inóculo bacteriano.

As micobactérias foram cultivadas conforme descrito no item 3.3. Após cultivo foram centrifugadas por 10 minutos e lavadas em solução de D-glicose 0,264M, o processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais duas vezes. As suspensões bacterianas em D-glicose foram padronizadas com o tubo 1 da escala de McFarland. Uma vez padronizada, a suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:25 em solução de D-glicose 0,264 M para em seguida fazer a interação com os fármacos.

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de rifampicina e DODAB contra *M. smegmatis* os fármacos foram diluídos em solução de D-glicose em concentrações que variaram de 512 a 1 µg/ml para um volume de 1 ml por tubo, depois da diluição, cada tubo foi inoculado com 1 ml da suspensão bacteriana padronizada (10^5 UFC/ml). Os tubos foram incubados a 30°C por 72 horas. Uma alíquota foi retirada de cada tubo diluídas 1:10 e 1:100 e 100 µl das diluições foram plaqueadas em ágar Miller-Hinton com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas a 30°C por 72 horas para determinação da CIM. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga que matou $\geq 99.9\%$ do inóculo bacteriano. Para *M. tuberculosis* os fármacos foram diluídos em solução de D-glicose em concentrações que variaram de 1 a 0,0039 e 512 a 1 µg/ml para rifampicina e DODAB, respectivamente, para um volume de 100 µl por poço, depois da diluição dos fármacos, cada poço foi inoculado com 100 µl da suspensão bacteriana padronizada (10^5 UFC/ml). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 10% de umidade por 7 dias. Uma alíquota foi retirada de cada poço diluídas 1:10 e 1:100 e 50 µl das diluições foram plaqueadas em ágar 7H10 com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas em estufa 37°C, 5% CO₂ e 10% de umidade por 3 a 4 semanas. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga que matou $\geq 90\%$ do inóculo bacteriano.

O método de plaqueamento foi necessário para determinar a CIM porque com a utilização da solução de D-glicose não é possível a observação da turvação ou

ausência da mesma nos tubos de interação, assim a CIM foi obtida através da observação do crescimento de UFC nas placas com meio de cultura.

3.7 Determinação de efeito sinérgico entre DODAB e rifampicina para *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*

O método de macrodiluição foi utilizado para a realização do teste de sinergismo entre DODAB/BF e RIF frente a cepa de *M. smegmatis*, foi realizada diluição seriada de razão dois para RIF em concentrações finais que variaram de 512 a 1 µg/ml, para um volume de 500 µl por tubo. Nos tubos contendo a diluição seriada de RIF foi adicionado 500 µl de DODAB 2 µg/ml. Por outro lado, foram feitas diluições seriadas de DODAB BF em concentrações finais que variaram de 512 a 1 µg/ml para um volume de 500 µl por tubo, nos tubos contendo DODAB BF foi adicionado RIF em concentração de 2 µg/ml. RIF e DODAB BF foram misturados e deixados interagir por 1 hora antes da adição das células bacterianas. Em cada tubo foi adicionado 1 ml da suspensão bacteriana padronizada (10^5 UFC/ml). Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 72 horas. Uma alíquota de cada tubo foi retirada diluídas 1:10 e 1:100 e 100 µl das diluições foram semeadas em placas de MHA e então incubadas 30°C por mais 72 horas. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga que matou $\geq 99.9\%$ do inóculo bacteriano.

A microplaca foi utilizada para a realização do teste de sinergismo entre DODAB/BF e RIF frente a cepa de *M. tuberculosis*, foi realizada diluição seriada de razão dois para RIF em concentrações finais que variaram de 1 a 0,0039 µg/ml, para um volume de 50 µl por poço. Nos poços contendo a diluição seriada de RIF foi adicionado 50 µl de DODAB 4 µg/ml. Por outro lado, foram feitas diluições seriadas de DODAB BF em concentrações finais que variaram de 512 a 1 µg/ml para um volume de 50 µl por poço, nos poços contendo DODAB BF foi adicionado RIF em concentração de 0,0078 µg/ml (valor menor que a CIM). RIF e DODAB/BF foram misturados e deixados interagir por 1 hora antes da adição das células bacterianas. Em cada tubo foi adicionado 100 µl da suspensão bacteriana padronizada (10^5 UFC/ml). Os tubos foram incubados em estufa 37°C, 5% CO₂ e 10% de umidade por 7 dias. Uma alíquota de cada poço foi retirada e diluídas 1:10 e 1:100 e 50 µl das diluições foram semeadas em placas de ágar 7H10 e então incubadas em estufa

37°C, 5% CO₂ e 10% de umidade por 3 a 4 semanas. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga que matou $\geq 90\%$ do inóculo bacteriano.

A CIM das drogas sozinhas e das mesmas em combinação foi utilizada para determinar o efeito sinérgico. De acordo com ODDS, 2003 o sinergismo pode ser determinado através da soma de concentração inibitória fracional (Σ CIF) das duas drogas em combinação. A CIF é obtida através da razão entre CIM da droga usada em combinação com a CIM da droga isolada. Os valores onde a Σ CIF é ≤ 0.5 corresponde a sinergismo das drogas, enquanto que um índice > 4 indica antagonismo, valores entre 0.5 e 4 indica comportamento independente das drogas.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* em dispersões de DODAB

As curvas de viabilidade celular após 1 hora de interação de *M. smegmatis* $3,5 \times 10^6$ UFC/mL em função da concentração de DODAB disperso como DODAB LV ($\diamond$) ou DODAB BF ($\square$), para uma faixa de 0,0005 a 1 mM de DODAB, estão representadas na Figura 14.

Figura 14. Curva de viabilidade celular (%) para *Mycobacterium smegmatis*, em função de concentração (mM) de DODAB BF ($\square$) preparados por sonicação com tip e DODAB LV ($\diamond$) preparados pelo método de vortexação.

Concentrações micromolares de DODAB foram efetivas contra *M. smegmatis*. Para as duas diferentes dispersões (DODAB BF e DODAB LV), com 0,002 mM de DODAB ocorreu 50% de viabilidade celular para uma concentração final de células viáveis de $3,5 \times 10^6$ UFC/mL com 1 hora de interação.

A figura 15 mostra as curvas de viabilidade celular após 7 dias (144 horas) de interação de *M. tuberculosis* ($1,8 \times 10^6$ UFC/mL) em função de DODAB disperso como DODAB BF ($\square$) ou DODAB LV ($\diamond$), para a concentração de 0,1 mM de DODAB.

Figura 15. Curva de viabilidade celular para *Mycobacterium tuberculosis* em função de 0,1 mM de DODAB BF (□) ou DODAB LV (◇), variando o tempo de interação.

M. tuberculosis mostrou-se mais resistente à ação do DODAB do que *M. smegmatis*, com 1 hora de interação não houve morte bacteriana em nenhuma concentração na faixa de 0,0005 –1 mM. Para 24 h de interação, em 0,1 mM de DODAB, seu efeito micobactericida começou a se manifestar. A partir daí a concentração de DODAB foi fixada em 0.1 mM e foi obtido o efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular (Figura 15). Para a concentração de células viáveis de $1,8 \times 10^6$ UFC/mL, 50% de viabilidade celular foi obtida com aproximadamente 45 horas de interação. 0% de viabilidade foi obtida após 120 horas de interação. DODAB foi ativo contra *M. tuberculosis* em concentrações e tempos de interação bem maiores que os obtidos para o *M. smegmatis*.

4.2 Espectros ópticos de rifampicina em diferentes meios

A Figura 16 mostra o espectro de absorção da rifampicina solubilizada no seu melhor solvente orgânico (Figura 16 A), em água (Figura 16 B), nos fragmentos de bicamada de DODAB (Figura 16 C) e nas vesículas grandes de DODAB (Figura 16 D), para 16(a); 32(b); 48(c); e 64 µg/ml de rifampicina (d).

Figura 16. Espectros de absorção UV-visível de rifampicina. (A) em DMSO, (B) em água, (C) em DODAB BF 1 mM, (D) em DODAB LV 1 mM. Concentrações de rifampicina: 16(a), 32(b), 48(c) e 64 µg/ml(d).

O espectro de absorção de RIF na presença de dispersões de DODAB obtidas por sonicação, vortexação ou em água são similares ao espectro de RIF no seu melhor solvente orgânico (Figura 16 A-D). Na presença desses solventes a RIF permanece na sua forma monomérica, portanto as dispersões de DODAB são bons solubilizadores para este fármaco.

Tabela 4- Comprimentos de onda de absorção máxima e absorptividade molar (ϵ) da RIF em diferentes meios de solubilização.

Meio de Solubilização	$\lambda_{1\text{ máx}}/\text{nm}$	$\lambda_{2\text{ máx}}/\text{nm}$	$\epsilon \lambda_{1\text{ máx}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
DMSO	336	477	15,130
Água	331	468	13,890
DODAB BF	336	476	14,840
DODAB LV	334	476	15,000

A absorptividade molar (ϵ) da droga em dimetilsulfóxido (DMSO) foi determinada como sendo $15,130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Valores semelhantes foram obtidos para a droga nas dispersões de DODAB: para DODAB BF, $14,840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e para DODAB LV ($15,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Tabela 4).

4.3 Medida de distribuição de tamanhos e potencial-zeta de rifampicina nos fragmentos de bicamada de DODAB

A Figura 17 mostra a distribuição de tamanho de DODAB BF 1 mM em água (Figura 17 A), 2 mM de RIF em água (Figura 17 B), e 1 mM de DODAB disperso como DODAB BF em presença de 2 mM de RIF (Figura 17 C).

Em 2 mM, RIF se encontra acima de seu limite de solubilidade em água e apresenta distribuição de tamanhos mostrando ocorrência de agregados (Figura 17 B). Entretanto, em presença dos fragmentos de DODAB, houve uma distribuição de tamanhos típica dos fragmentos apenas, com total solubilização dos agregados de droga. Houve uma grande mudança na distribuição de tamanho da droga isolada em água em relação àquela da droga em presença dos fragmentos de bicamada de DODAB. Rifampicina na concentração de 2 mM apresenta tamanho médio de $760 \pm 20 \text{ nm}$ e potencial-zeta $0 \pm 10 \text{ mV}$ (droga agregada). Quando solubilizada no fragmento de bicamada, o tamanho médio diminui para $80 \pm 1 \text{ nm}$ e potencial-zeta passa a ser $31 \pm 1 \text{ mV}$ (Figura 17 C). O tamanho é o mesmo obtido para os fragmentos de DODAB em ausência de droga: diâmetro médio de $84 \pm 1 \text{ nm}$. Porém, o potencial-zeta resultou menor do que aquele obtido para os fragmentos em ausência de droga ($65 \pm 1 \text{ mV}$). Os grandes agregados da droga foram solubilizados pelos fragmentos de DODAB diminuindo o potencial-zeta.

Figura 17. Figura de distribuição de tamanho: A) DODAB BF 1 mM em água; B) RIF 2 mM em água; C) DODAB BF 1 mM com 2mM de RIF.

Os valores de tamanho (Dz) e potencial-zeta (ζ) das dispersões apresentadas na Figura 17 estão na Tabela a seguir.

Tabela 5- Média de diâmetros (D) e potencial-zeta (ζ) para droga, DODAB e droga com DODAB, em água a 25° C.

Dispersão	Dz $\pm$ δ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)
RIF 2mM	760 $\pm$ 20	0 $\pm$ 10
DODAB BF 1 mM	84 $\pm$ 1	65 $\pm$ 1
RIF 2 mM/ DODAB BF 1 mM	80 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2

Essa mesma solução da droga 2 mM foi solubilizada em menor concentração de DODAB. Na Figura 18 é mostrada a solubilização completa dos agregados de droga, mesmo em 0,5 mM de DODAB. Os valores de tamanho (Dz) e potencial-zeta (ζ) das (Figuras 18 A–C) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Média de diâmetros (D) e potencial-zeta (ζ) para droga, DODAB e droga com DODAB, em água a 25° C.

Dispersão	Dz $\pm$ δ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)
RIF 2mM	760 $\pm$ 20	0 $\pm$ 10
DODAB BF 0.5 mM	86 $\pm$ 2	61 $\pm$ 1
RIF 2 mM/ DODAB BF 0.5 mM	89 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2

Figura 18. Figura de distribuição de tamanho: A) DODAB BF 0,5 mM em água; B) RIF 2 mM em água; C) DODAB BF 0,5 mM com 2mM de RIF.

4.4 Espectros ópticos de isoniazida em diferentes meios

Na Figura 19 estão os espectros ópticos de absorção de luz pela isoniazida em água (Figura 19 A) ou em vesículas grandes de DODAB (Figura 19 B), para concentrações de droga de 10(a), 20(b), 30(c), 40 $\mu\text{g/ml}$ (d). Como a isoniazida é uma droga solúvel em água, a incorporação se dá compartimento aquoso interno do lipossomo de DODAB, diferente da rifampicina cuja incorporação se dá tanto to

compartimento aquoso interno das vesículas quanto na bicamada, por se tratar de uma droga com características hidrofóbicas.

Figura 19. Espectro de absorção UV-visível de isoniazida: (A) em água, (B) em vesículas (DODAB LV) 2 mM. Concentrações de isoniazida: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40 µg/ml.

Na Tabela 7 estão os valores de pico máximo de absorbância e absorptividade molar da isoniazida (20 µg/ml) em água e nas vesículas grandes de DODAB. A isoniazida apresenta apenas um pico de absorbância máxima.

Tabela 7- Comprimentos de onda de absorção máxima e absorptividade molar (ϵ) da ISO em diferentes meios de solubilização.

Meio de Solubilização	$\lambda_{1\text{máx}}/\text{nm}$	$\epsilon \lambda_{1\text{máx}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Água	260	2.995
DODAB LV	260	2.717

Os valores de ϵ da isoniazida em água e nas vesículas grandes são semelhantes. Como a isoniazida é bastante solúvel em água e é uma molécula pequena, eventualmente poderia ser incorporada no compartimento aquoso interno

das vesículas desde que não fosse permeável através da bicamada. Para avaliar sua permeabilidade, foram feitos experimentos de diálise para a separação entre droga incorporada em vesículas e droga livre.

4.5 Incorporação de rifampicina nas dispersões de DODAB pelo método de diálise e ultracentrifugação.

Diálise e ultracentrifugação são técnicas usadas para a separação entre droga incorporada e droga livre. A porcentagem de incorporação da droga no lipossomo de DODAB 2 mM (% Inc) foi determinada pela quantidade de droga retida pela dispersão de DODAB após extensa diálise. A mesma preparação lipossomal (DODAB/RIF) foi ultracentrifugada, para determinação da porcentagem de incorporação também por este método.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de absorbância antes e depois da diálise para a rifampicina livre e rifampicina lipossomal. As amostras foram tratadas com 50% de etanol para rompimento das vesículas, antes da leitura das absorbâncias. As leituras foram realizadas em triplicata e calculada a média e desvio padrão.

Tabela 8- Valores de absorbância (A) da rifampicina livre e rifampicina lipossomal, antes e depois da diálise. Porcentagem de incorporação (%Inc) de RIF em DODAB BF ou DODAB LV.

Dispersão ou solução submetida à diálise	A _{antes}	A _{depois}	% Inc
RIF 0.1 mM	1.98±0.05	0.12±0.05	
DODAB LV 2mM/ RIF 0.1 mM	1.98±0.05	1.62±0.05	75
RIF 0.1 mM	2.30±0.05	0.21±0.05	
DODAB BF 2mM/ RIF 0.1 mM	2.30±0.05	1.75±0.05	67

A concentração de droga incorporada no DODAB foi calculada a partir das leituras de absorbância com a seguinte equação:

$$\% \text{ Inc} = 100 \times [(A_{\text{dd amostra}} / A_{\text{ad amostra}}) - (A_{\text{dd controle}} / A_{\text{ad controle}})]$$

A droga isolada atravessa livremente a membrana de diálise, é possível notar pelas leituras de absorbância, antes da diálise, a rifampicina apresentou valor de absorbância de 1.98 e depois da diálise esse valor diminuiu para 0.12. Quando essa mesma solução de RIF está em DODAB LV o valor de absorbância resultou em de 1,62, mostrando que grande quantidade de RIF ficou incorporada no lipossomo, resultando em 75% de incorporação da droga (Tabela 8). Para confirmar se a incorporação de RIF se dá somente no compartimento aquoso interno do lipossomo ou também no fragmento de bicamada, amostras de DODAB BF contendo rifampicina também foram dialisadas nas mesmas condições, lembrando que os fragmentos de bicamada não possuem o compartimento aquoso interno. Através dos valores de absorbância é possível demonstrar que grande quantidade de RIF está adsorvida na bicamada de DODAB (Tabela 8), RIF em DODAB BF resultou em uma porcentagem de incorporação de 67%. Dispersões de DODAB BF ou DODAB LV sem droga foram dialisadas nas mesmas condições para o controle dos experimentos, DODAB não atravessa a membrana de diálise, sua concentração antes e depois da diálise continua a mesma.

A porcentagem de incorporação da RIF no lipossomo de DODAB (DODAB LV) por ultracentrifugação foi obtida através da concentração de droga presente no sobrenadante após centrifugação. A concentração total da droga (0,075 mM) antes da centrifugação menos a concentração no sobrenadante (0,017mM), resultou na concentração de droga incorporada (0,058 mM). Com a concentração de droga incorporada determinada foi possível calcular a porcentagem de incorporação, que resultou em 77,3% de RIF incorporada nos lipossomos de DODAB. Os dois métodos foram eficientes para a incorporação de rifampicina nas vesículas grandes de DODAB.

Na Figura 20 está ilustrado o tamanho do lipossomo de DODAB isolado 2 mM (Figura 20 A), e com a RIF incorporada (Figura 20 B).

Figura 20. Distribuição de tamanho dos lipossomos. (A) Lipossomos de DODAB 2 mM; (B) lipossomo com rifampicina incorporada.

Nesse caso, 0,1 mM de RIF não causou alteração significativa nas propriedades físicas das vesículas de DODAB (tamanho e potencial-zeta) devido à baixa concentração de droga. Na Tabela 9 estão as medidas de tamanho e potencial- zeta dos lipossomos na presença e ausência de RIF.

Tabela 9- Tamanho e potencial-zeta das vesículas de DODAB na presença e ausência de rifampicina.

Dispersão	$Dz \pm \delta$ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)
DODAB 2mM	459 ± 2	45 ± 1
DODAB 2mM / RIF 0,1 mM	473 ± 1	45 ± 1

4.6 Incorporação de isoniazida em diferentes preparações lipossomais (DODAB, DODAB/DPPC 1:1 e asolecitina (ASO) por método de diálise

Foram preparadas diferentes formulações lipossomais com a isoniazida para verificar a porcentagem de incorporação em diferentes lípides, essas formulações foram feitas porque esta droga mostrou-se permeável aos lipossomos de DODAB, diferente da rifampicina em que houve 75% de incorporação pelo método de diálise. A tentativa foi à utilização de um lipíde neutro o DPPC, juntamente com o DODAB e um lipíde natural (asolecitina) que forma lipossomos multilamelares. Na Tabela 10 estão os resultados de porcentagem de incorporação das preparações de DODAB 2 mM com solução de isoniazida 0,1 mM, lipossomo DODAB/DPPC 1:1 com solução de isoniazida de 0,1 mM e ainda lipossomos de asolecitina 2 mM com uma concentração maior de isoniazida 10 mM.

Tabela 10- Valores de absorbância de isoniazida e isoniazida lipossomal, antes e depois da diálise. Porcentagem de incorporação de em diferentes formulações lipossomais

Dispersão ou solução submetida à diálise	A _{260 nm} antes	A _{260 nm} depois	% Inc
ISO 0.1 mM (Controle)	0.542	0.061	-
DODAB 2 mM/ ISO 0.1 mM	0.540	0.052	0
DODAB/DPPC 1:1/ ISO 0.1 mM	0.504	0.058	0
ISO 10 mM (Controle)	20.0	0.017	-
ASO 2 mM/ ISO 10mM	19.5	0.400	0.01

A isoniazida mostrou-se permeável às diferentes formulações lipossomais pelo fato de ser uma molécula pequena e completamente solúvel em água. As porcentagens de incorporação foram próximas a 0 % em todas as preparações lipossomais testadas.

4.7 Concentração inibitória mínima (CIM) de rifampicina e DODAB e formulação DODAB/RIF para determinação de efeito sinérgico das drogas contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*.

A concentração inibitória mínima de rifampicina e DODAB e a formulação DODAB/RIF contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11- Concentração inibitória mínima (CIM) para RIF, DODAB e combinações contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*. *CIF, concentração inibitória fracional foi definida como a razão da CIM da droga usada em combinação com a CIM da droga isolada. ** Σ CIF, foi calculado através da soma de CIF de cada droga em combinação.

<i>Mycobacterium sp</i>		CIM $\mu\text{g/ml}$	CIM $\mu\text{g/ml}$ DODAB/RIF	CIF*	Σ CIF**
<i>M. smegmatis</i>	RIF	32	2 (2 DODAB)	0,0625	
	DODAB BF	4	2 (2 RIF)	0,5	0,5
	DODAB LV	4	2 (1 RIF)	0,5	
<i>M. tuberculosis</i>	RIF	0,015	0,007 (4 DODAB)	0,5	
	DODAB BF	8	4 (0,007 RIF)	0,5	1
	DODAB LV	8	4 (0,007 RIF)	0,5	

A CIM de RIF para *M. smegmatis* é de 32 $\mu\text{g/ml}$ e quando em combinação com DODAB esse valor diminuiu para 2 $\mu\text{g/ml}$ na presença de 2 $\mu\text{g/ml}$ de DODAB. A CIM de RIF para *M. tuberculosis* é de 0,015 $\mu\text{g/ml}$ e quando em combinação com DODAB (4 $\mu\text{g/ml}$) diminui para 0,007 $\mu\text{g/ml}$. A CIM de DODAB nas duas preparações (DODAB LV ou DODAB BF) foi determinada com valor de 4 $\mu\text{g/ml}$ para *M. smegmatis* e 8 $\mu\text{g/ml}$ para *M. tuberculosis*, esse valor foi reduzido para 2 $\mu\text{g/ml}$ quando em combinação de 2 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina, e para *M. tuberculosis*, 8 $\mu\text{g/ml}$ de DODAB foi reduzido para 4 $\mu\text{g/ml}$ quando em combinação com 0,007 $\mu\text{g/ml}$ de RIF. Com os dados apresentados na tabela foi possível verificar que os valores de CIM são menores quando DODAB está presente do que aqueles quando a droga está sozinha. A formulação DODAB/RIF apresenta efeito sinérgico somente para *M. smegmatis* onde a Σ CIF resultou em 0,5 e no caso de *M. tuberculosis* a Σ CIF resultou em 1 mostrando que para esta espécie a formulação exibe comportamento independente das duas drogas quando combinadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Curvas de viabilidade celular

O efeito bactericida de DODAB foi demonstrado para as duas espécies de micobactéria estudadas. Concentrações de micromolar de DODAB apresentaram efeito bactericida para *M. smegmatis* com 1 hora de interação, porém para *M. tuberculosis* um tempo maior de interação foi requerido, *M. tuberculosis* apresenta crescimento lento, o tempo de interação com o DODAB e outros antibióticos é maior do que para outros microrganismos de crescimento rápido.

DODAB apresenta em sua estrutura química o grupo amônio quaternário, é bem descrito na literatura que compostos de amônio quaternário (também conhecidos como detergentes catiônicos) são muito usados como anti-sépticos ou desinfetantes sendo agentes ativos de membrana (Mc DONELL e RUSSEL, 1999). Tetradecil-dimetil-benzil-amônio fluoride (TDBAF) um outro composto de amônio quaternário apresenta atividade bactericida contra cepas de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a isoniazida e rifampicina (BYRNE and HEALY, 1999).

Uma seqüência de eventos foi proposta para microrganismos expostos a agentes catiônicos: a) adsorção e penetração do agente dentro da parede celular; b) reação com a membrana citoplasmática (lipídeo ou proteína) seguido da desorganização da membrana; c) extravasamento de material de baixo peso molecular; d) degradação de proteínas e ácidos nucleicos, e) lise da parede causada por enzimas autolíticas. Há assim uma perda da organização estrutural e integridade da membrana citoplasmática na bactéria, juntamente com outros efeitos prejudiciais para a célula bacteriana (Mc DONELL e RUSSEL, 1999).

O mecanismo de ação biocida para o lipídeo catiônico (DODAB) vem sendo relacionado à reversão de carga da célula de negativa para positiva (CAMPANHÃ *et al.*, 1999). A adsorção de bicamadas catiônicas compostas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) sobre células bacterianas ou fúngicas muda o sinal da carga das células de negativo para positivo, havendo íntima relação entre a carga positiva de bactérias ou fungos e o efeito bactericida ou fungicida (CAMPANHÃ *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2006). Ainda em relação ao mecanismo de

ação de DODAB, não foram observadas lise celular ou ruptura da vesícula catiônica (MARTINS *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 2006).

Essa interação entre carga superficial positiva de vesículas lipídicas e células também foi estudada entre *P. aeruginosa* e vesículas lipídicas compostas por fosfatidilcolina, colesterol e dioleoiloxitrimetilamônio-propano (PC:Col:DOTAP) (DRULLIS-KAWA *et al.*, 2009). Observou-se que os domínios negativamente carregados presentes na estrutura da parede da célula bacteriana favorecem a interação eletrostática com as vesículas lipídicas catiônicas, além disso, foi demonstrado que outros fatores também podem ser responsáveis pela fusão, por exemplo, uma proteína de membrana externa de *P. aeruginosa* de 18-kDA, quando presente, favorece a fusão da célula com as vesículas catiônicas, este processo foi visualizado por microscopia de fluorescência pela marcação das vesículas com rodamina.

Outros estudos de interação entre vesículas catiônicas com células têm demonstrado que o comportamento dos lipossomos nas células depende primeiramente da carga de superfície (MILLER *et al.*, 1998; JUBEH *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2009). E ainda, vesículas catiônicas podem ser capturadas pelas membranas por vários mecanismos, entre eles, endocitose, pinocitose e fagocitose (WEINSTEIN, 1981; LORENZ *et al.*, 2006).

5.2 Solubilização de rifampicina em dispersões de DODAB caracterizada por espectroscopia UV-visível e espalhamento de luz dinâmico

O estado de solubilização de rifampicina no DODAB foi avaliado por meio do espectro de absorção de luz UV-visível e medida de distribuição de tamanhos da droga e da dispersão de DODAB. Rifampicina apresentou-se em sua forma monomérica, ou seja, totalmente solúvel na presença das vesículas grandes e de fragmentos de bicamada de DODAB (Figura 16). As Figuras 17 e 18 mostram a solubilização deste fármaco através da medida de distribuição de tamanhos. Os grandes agregados da droga são solubilizados pelos fragmentos de DODAB diminuindo o potencial-zeta. Outros autores também observaram a diminuição em

módulo do potencial-zeta por interação de bicamadas carregadas com rifampicina e ofloxacina (BERMUDEZ *et al.*, 1999). Foi demonstrado que rifampicina também interage fortemente com lipossomos de DMPC (dimiristoil-L- α -fosfatidilcolina) inserindo-se na bicamada (RODRIGUES *et al.*, 2003). Nossos dados mostram que o potencial-zeta diminuiu nos lipossomos contendo rifampicina quando comparados com aqueles na ausência de droga, sugerindo há ocorrência de fortes interações eletrostáticas. Interações hidrofóbicas também podem ter ocorrido devido ao desaparecimento dos grandes agregados do fármaco na presença dos fragmentos de bicamada de DODAB.

A solubilização de duas drogas antifúngicas hidrofóbicas, anfotericina B (AMB) e miconazol em fragmentos de bicamada de DODAB mostrou a possibilidade de utilizar o DODAB como carreador dessas drogas (PACHECO *et al.*, 2003; VIEIRA, *et al.*, 2001). Estudos físico-químicos caracterizaram a solubilização de AMB em fragmentos de DODAB avaliada por espectrofotometria e distribuição dos tamanhos nas misturas por espalhamento de luz dinâmico. Após interação, o espectro de absorção UV visível da AMB nos fragmentos de DODAB foi similar ao obtido pela solubilização da droga no seu melhor solvente orgânico. A distribuição de tamanhos revelou o desaparecimento de agregados da droga, postulando que os fragmentos de bicamada são excelentes solubilizadores para a AMB (VIEIRA *et al.*, 2001). Estes experimentos foram extrapolados para o antifúngico miconazol, obtendo-se resultados idênticos (PACHECO *et al.*, 2003).

5.3 Incorporação dos fármacos nas dispersões lipídicas

A incorporação de rifampicina foi avaliada por dois métodos: diálise e ultracentrifugação, a porcentagem de incorporação foi de 75 e 77 %, respectivamente, nos lipossomos de DODAB. Devido à hidrofobicidade da rifampicina, esta droga apresenta grande afinidade pelas bicamadas lipídicas de DODAB, enquanto que, isoniazida uma droga hidrossolúvel mostrou-se permeável as diferentes formulações lipossomais, pelo método de diálise.

Tem sido demonstrado na literatura que a porcentagem de incorporação de fármacos depende da composição lipídica do lipossomo. A porcentagem de incorporação de rifampicina já foi avaliada em diferentes formulações lipossomais (PC-fosfatidilcolina; DPPC- dipalmitoil-glicero-fosfatidilcolina; DSPC- disteroyloglycero-fosfatidilcolina) contendo ou não colesterol (Col). DPPC e DSPC apresentam maiores porcentagens de incorporação do que PC, com a adição de colesterol nas três formulações a porcentagem de incorporação diminui. A quantidade de rifampicina incorporada aumenta conforme o grau de saturação do lípide (PC<DPPC<DSPC) (ZARU *et al.*, 2007). Resultados similares foram obtidos em lipossomos compostos de DPPC/Col comparados com PC/Col, a porcentagem de incorporação é maior nos lipossomos de DPPC/Col do que PC/Col (GURSOY *et al.*, 2004). Nessas formulações, rifampicina apresentou maior porcentagem de incorporação em relação à isoniazida (GURSOY *et al.*, 2004).

A incorporação de isoniazida também foi estudada em diferentes formulações lipossomais (SOROKOUMOVA *et al.*, 2004). Lipossomos compostos de fosfatidilcolina e fosfatidilcolina com colesterol apresentaram maiores porcentagens de incorporação (aproximadamente 3.2 e 3.4 %), respectivamente, do que em lipossomos compostos de fosfatidilcolina com fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina (aproximadamente 1%), as baixas porcentagens de incorporação de isoniazida são relatadas pela alta permeabilidade da droga através da membrana (SOROKOUMOVA *et al.*, 2004). A porcentagem de incorporação de drogas hidrofóbicas é maior do que para drogas hidrofílicas (BETAGARI *et al.*, 1992; DI GIULIO *et al.*, 1991).

5.4 Concentração inibitória mínima de RIF e DODAB e determinação de efeito sinérgico para a formulação DODAB/RIF

A concentração inibitória mínima (CIM) de rifampicina e DODAB e a combinação de DODAB/RIF contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* estão apresentadas na Tabela 11. Com os resultados obtidos foi possível verificar que os valores de CIM são menores quando DODAB está presente do que aqueles quando a droga está isolada. Vários trabalhos descritos na literatura têm mostrado que o

encapsulamento de antibióticos em lipossomos reduz a CIM quando testados contra cepas de *Mycobacterium*. A CIM para *M. bovis* é de 0,2 e 0,8 μM em lipossomos contendo rifampicina e rifampicina livre, respectivamente (Changsan et al., 2009), dentre os lipossomos estudados, àqueles menos negativamente carregados mostraram melhor atividade. O uso de rifampicina lipossomal aumenta a eficácia terapêutica por aumento do tempo de liberação do fármaco e conseqüente redução de dose (Zaru et al., 2007; Pandey et al., 2004b; Vyas et al., 2004) em infecções por *Mycobacterium*. Para as duas espécies de micobactérias estudadas a CIM de rifampicina foi reduzida quando incorporada no lipossomo de DODAB, entretanto, a melhor atividade da formulação foi observada quando testada contra *M. smegmatis*, esta micobactéria de crescimento rápido apresenta resistência intrínseca a rifampicina (CIM= 32 $\mu\text{g/ml}$) e quando na formulação a CIM foi reduzida para 2 $\mu\text{g/ml}$. A cepa estudada de *M. tuberculosis* é sensível a rifampicina (CIM= 0,015 $\mu\text{g/ml}$), na formulação essa concentração foi reduzida pela metade (CIM = 0,007 $\mu\text{g/ml}$). A grande redução na concentração de rifampicina foi observada para a cepa resistente a este fármaco. Para futuros estudos, cepas de micobactérias de crescimento rápido e de *M. tuberculosis* resistentes poderiam ser estudadas para melhor visualização desta atividade.

Neomicina B apresenta baixa atividade contra cepas de MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) e *P. aeruginosa*, enquanto que, kanamicina A apresenta baixa atividade contra MRSA, MRSE (*S. epidermidis* resistente a meticilina), e *P. aeruginosa*. A conjugação de lípides com grupamento catiônico restaurou a atividade para MRSA de ambos os aminoglicosídeos e a atividade de kanamicina A para MRSE. A conjugação do lípido catiônico nos fármacos aumenta a atividade dos dois aminoglicosídeos contra cepas resistentes: a concentração inibitória mínima (CIM) de neomicina B para MRSA era de 256 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que neomicina B associada com lípido apresentou CIM de 8 $\mu\text{g/ml}$ (BERA et al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Lincopan et al., 2006, a combinação de DODAB BF com miconazol (MCZ) ou DODAB BF com anfotericina B (AMB) contra cepas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, mostrou que a concentração fungicida mínima (CFM) é menor na formulação lipossomal do que quando as drogas foram testadas sozinhas. Do cálculo de sinergismo para *C. albicans*, a ação combinada do lípido catiônico e as drogas puderam ser consideradas sinérgicas somente para

miconazol. No caso de *C. neoformans* a ação combinada de DODAB/AMB e DODAB/MCZ mostrou ação independente de lipídeo e droga. Para a formulação desenvolvida neste trabalho (DODAB/RIF), o efeito sinérgico foi demonstrado somente para *M. smegmatis*.

Nas combinações de DODAB e drogas, uma pequena concentração de DODAB é requerida, apenas o suficiente para produzir uma camada lipídica circundando os grânulos hidrofóbicos das drogas. Para futuros estudos, como os de toxicidade, acreditamos que esta poderá ser minimizada dada às baixíssimas doses na combinação. É importante ressaltar a citotoxicidade diferencial do DODAB, ele é muito menos citotóxico para células de mamíferos do que para bactérias e fungos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O brometo de dioctadecildimetilamônio ou DODAB apresenta atividade bactericida contra *Mycobacterium smegmatis* e contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- ✓ A bicamada de DODAB oferece ótimos sítios de solubilização para rifampicina adsorvendo 67 % de droga em 2 mM de DODAB BF ou 75% em 2 mM de DODAB LV.
- ✓ Rifampicina solubilizada em bicamadas de DODAB apresenta um predomínio de sua forma monomérica, com um espectro de absorção UV-visível idêntico ao obtido para a droga em seu melhor solvente orgânico, o DMSO.
- ✓ Tanto o DODAB quanto suas combinações com RIF mostraram atividade *in vitro* contra *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis*.
- ✓ O índice de sinergismo para a combinação DODAB/RIF igual a 0.5 mostrou ação sinérgica da combinação contra *M. smegmatis*; igual a 1.0, indicou comportamento independente das drogas contra *M. tuberculosis*.
- ✓ Dentre as vantagens associadas ao uso de DODAB/RIF destacam-se: o baixo custo, a facilidade de manipulação, a estabilização de rifampicina na sua forma monomérica e a baixa concentração dos dois compostos utilizada para o efeito bactericida. Vantagens estas que mostram boas perspectivas de aplicações terapêuticas futuras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIN, Q.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Chemotherapy potencial of orally administered Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles containing isoniazida, rifampin, and pyrazinamide against experimental tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.9, p.3005-3007, 2003.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.79-85.

ANDERSEN, P. Host responses and antigens involved in protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.45, n.2, p.115-131, 1997.

BARENHOLZ, Y.; CROMMELIN, D.A. Liposomes as pharmaceutical dosage forms. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C., eds. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, 1994. v.9, p.1-39.

BARROW, E.L.W.; WINCHESTER, G.A.; STAAS, J.K.; QUENELLE, D.C.; BARROW, W.W. Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampicin to Mycobacterium tuberculosis – infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.10, p.2682-2689, 1998.

BATES, I.; FENTON, C.; GRUBER, J.; LALLOO, D.; MEDINA, L.A.; SQUIRE, S.B.; THEOBALD, S.; THOMSON, R.; TOLHURST, R. Vulnerability to malaria, tuberculosis, and HIV/AIDS infection and disease. Part 1. Determinants operating at individual and household level. **Lancet Infectious Diseases**, v.4, n.5, p.267-277, 2004.

BERA, S.; ZHANEL, G.G.; SCHWEIZER, F. Design, synthesis, and antibacterial activities of neomycin-lipid conjugates: polycationic lipids with potent gram-positive activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.19, p.6160-6164, 2008.

BERMUDEZ, M.; MARTINEZ, E.; MORA, M.; SARIGRAS, M.L.; MADARIAGA, M.A. Molecular and physicochemical aspects of the interactions of the tuberculostatics ofloxacin and rifampicin with liposomal bilayers: a P-NMR and DSC study. **Colloids and Surfaces**, v.158, p.59-66, 1999.

BETAGARI, G.V.; PARSONS, P.L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.81, p.235-241, 1992.

BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; RICCI, M. Fighting tuberculosis: old drugs, new formulations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.6, p.977-993, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Tuberculose no Brasil: avanços e perspectivas**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010. [IV Encontro Nacional da Tuberculose; I Fórum da Parceria Brasileira contra Tuberculose].

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf. Acesso em: 10 Maio 2010.

BURMAN, W.J.; GALLICANO, K.; PELOQUIN, C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p.327-341, 2001.

BYRNE, C.; HEALY, M.T. Efficacy of a new quaternary ammonium compound against TB. **Irish Journal of Medical Science**, v.168, p.45-46, 1999.

CALHEIROS, C.S. **Encapsulação de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas para administração por inalação**. Campinas, 2001. 117p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A. Interactions between cationic vesicles and *Candida albicans*. **Journal of Physical Chemistry B**, v.105, n.34, p.8230-8236, 2001.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **Journal of Lipid Research**, v.40, p.1495-1500, 1999.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayers vesicles and liposomes as interface agents. **Chemical Society Reviews**, v.30, p.241-247, 2001.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, p.39-43, 2000.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chemical Society Reviews**, v.21, p.209-214, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.733, p.172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; VIEIRA, D.B.; LINCOPAN, N. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, n.1, p.33-54, 2006.

CLSI. **Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes**: approved standard. Wayne: NCCLS, 2003. 71p. (NCCLS document, v.23, n.18) (CLSI/NCCLS, M24-A).

DEOL, P.; KHULLER, G.K.; JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampicin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against Mycobacterium tuberculosis infection induced in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p.1211-1214, 1997.

DI GIULIO, A.; MAURIZI, G.; ODOARDI, P.; SALETTI, M.A.; AMICOSANTI, G.; ORATORE, A. Encapsulation of ampicillin in reverse-plane evaporation liposomes: a direct evaluation by derivative spectrophotometry. **International Journal of Pharmaceutics**, v.74, n.2/3, p.183-188, 1991.

DRULIS-KAWA, Z.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; GUBERNATOR, J.; GULA, G.; BOCER, T.; DOROSZKIEWICZ, W. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v.367, n.1/2, p.211-219, 2009.

DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. Micobactérias. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.423-435.

DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HORSBURG, C.R.; SALFINGER, M.; SIMONE, P.M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.161, p.1376-1395, 2000.

DUTT, M.; KHULLER, G.K. Chemotherapy of *Mycobacterium tuberculosis* infections in mice with a combination of isoniazida and rifampicin entrapped in Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.829-835, 2001.

FENDLER, J.H. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents – characterization and utilization. **Accounts of Chemical Research**, v.13, p.7-13, 1980.

GANGADHARAM, P.R.J.; GEETA, N.; HSU, Y.Y.; WISE, D.L. Chemotherapy of tuberculosis in mice using single implants of isoniazid and pyrazinamid. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.3, n.6, p.515-520, 1999.

GILLESPIE, S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.267-274, 2002.

GREGORIADIS, G.; FLORENCE, A.T. Liposomes in drug delivery: clinical, diagnostic and ophthalmic potential. **Drugs**, v.45, p.15-28, 1993.

GURSOY, A.; KUT, E.; OZKIRIMLI, S. Co-encapsulation of isoniazid and rifampin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.271, p.115-123, 2004.

HEEP, M.B.; BRANDSTATTER, U.; RIEGER, N.; LEHN, E.; RICHTER, S.; RUSCHGERDES, S.; NIEMANN, S. Frequency of *rpo* mutations inside and outside the cluster region in rifampicina-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.107-110, 2001.

HOLDINESS, M.R. Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.9, n.6, p.511-544, 1984.

ISEMAN, M.D.; MADSEN, L.A. Drug-resistant tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, v.10, n.3, p.341-353, 1989.

JESENKÁ, A.; SEDLACEK, I.; DAMBORSKÝ, I. Dehalogenation of haloalkanes by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and other mycobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.219-222, 2000.

JUBEH, T.T.; BARENHOLZ, Y.; RUBISNSTEIN, A. Differential adhesion of normal and inflamed rat colonic mucosa by charged liposomes. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.3, p.447-453, 2004.

KAGAWA, Y.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. IX. Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v.241, n.10, p.2467-2474, 1966.

KATZUNG, B.G., ed. **Farmacologia básica e clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 854p.

LABANA, S.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KRULLER, G.K. Chemoterapheutic activity against murine tuberculosis of once weekly administred drugs (isoniazida and rifampicin) encapsulated in liposomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p.301-304, 2002.

LASIC, D.D. Liposomes in the treatment of infectious diseases. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.9, p.1679-1688, 1999.

LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v.16, n.7, p.307-321, 1998.

LIANG, C.-H.; CHOU, T.-H. Effect of chain length on physicochemical properties and cytotoxicity of cationic vesicles composed of phosphatidylcholines and dialkyldimethylammonium bromides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.158, n.2, p.81-90, 2009.

LINCOPAN, N.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.66-67, 2006.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.727-734, 2005.

LORENZ, M.R.; HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; NOTHELFER, K.; WALTHER, P.; FRANK, H. Uptake of functionalized, fluorescence-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. **Biomaterials**, v.27, p.2820-2828, 2006.

LOUNIS, N.; ROSCIGNO, G. *In vitro* and *in vivo* activities of new rifamycin derivatives against mycobacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, p.3229-3238, 2004.

MACDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.

MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic liposomes as antimicrobial agents. In: MÉNDEZ-VILAS, A., dir. **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badajoz: Formatex, 2007. v.2, p.636-647.

MARTINS, L.M.S.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic vesicles as bactericides. **Langmuir**, v.13, p.5583-5587, 1997.

MERCK Index. 12.ed. Whitehouse Station: Merck, 2000. p. 816 e 1308.

MILLER, C.R.; BONDURANT, B.; McLEAN, S.D.; McGOVERN, K.A.; O'BRIEN, D.F. Liposome-cell interactions *in vitro*: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. **Biochemistry**, v.37, p.12875-12883, 1998.

MIMS, C.; DOCKRELL, H.M.; GOERING, R.V.; ROITT, I.; WAKELIN, D. In: Infecções do trato respiratório inferior. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.250-252.

MITCHISON, D.A. Rifabutin in the treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis. **Tubercle and Lung Disease**, v.76, n.3, p.277, 1995.

MORTARA, R.A.; QUINA, F.H.; CHAIMOVICH, H. Formation of closed vesicles from a simple phospholipid diester: preparation and some properties of vesicles of dihexadecylphosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.81, p.1080-1086, 1978.

MOULDING, T.S.; REDEKER, A.G.; KANEL, G.C. Twenty isoniazid-associated deaths in one state. **American Review of Respiratory Disease**, v.140, p.700-705, 1989.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H., eds. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999. 1773p.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 289-293.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.1, p.1, 2003.

ONOSHITA, T.; SHIMIZU, Y.; YAMAYA, N.; MIYAZAKI, M.; YOKOYAMA, M.; FUJIWARA, N.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K.; TERADA, H.; HAGA, M. The behavior

of PLGA microspheres containing rifampicin in alveolar macrophages. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.76, p.151-157, 2010.

PACHECO, L.F.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.258, n.1, p.146-154, 2003.

PANDEY, R.; KHULLER, G.K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.430-435, 2005.

PANDEY, R.; SHARMA, A.; ZAHOR, A.; KHULLER, G.K.; PRASAD, B. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.981-986, 2003b.

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Lung specific stealth liposomes as antitubercular drug carriers in guinea pigs. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.42, n.6, p.562-566, 2004b.

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nebulization of liposome encapsulated antitubercular drugs in guinea pigs. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.93-94, 2004.

PANDEY, R.; ZAHOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**, v.83, p.373-378, 2003a.

PRABHAKARAN, D.; SINGH, P.; JAGANATHAN, K.S.; VYAS, S.P. Osmotically regulated asymmetric capsular system for simultaneous sustained delivery of antitubercular drugs. **Journal of Controlled Release**, v.95, n.2, p.239-248, 2004.

QUENELLE, D.C.; STAAS, J.K.; WINCHESTER, G.A.; BARROW, E.L.W.; BARROW, W.W. Efficacy of microencapsulation rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1144-1151, 1999.

RIEDER, H.L. **Bases epidemiológicas do controle da tuberculose**. Lisboa: Direção Geral da Saúde, 2001.

RODRIGUES, C.; GAMEIRO, P.; PIETRO, M.; CASTRO, B. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1620, n.1/3, p.151-159, 2003.

RUSSEL, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.39-47, 2007.

SCHALES, O.; SCHALES, S.S. A simple e accurate method for the determination of choride in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**, v.140, p.897-884, 1941.

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

SICCHIEROLLI, S.M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bactéria flocculation and death by cationic vesicles. **Langmuir**, v.11, p.2991-2995, 1995.

SMEUDERS, M.J.; KEER, J.; SPEIGHT, R.T.; WILLIAMS, H.D. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.270-283, 1999.

SOBRAL, C.N.C.; SOTO, M.A.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Characterization of DODAB/DPPC vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.152, p.38-45, 2008.

SOROKOUMOVA, G.M.; SELISHCHEVA, A.A.; MALIKOVA, N.M.; MININA, A.S.; SHVETS, V.I. Incorporation of isoniazid into liposomes with different lipid composition: biophysics and biochemistry. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.137, p.24-26, 2004.

SUAREZ, S.; O'HARA, P.; KAZANTSUVA, M.; NEWCOMER, C.E.; HOPFER, R.; McMURRAY, D.N.; HICKEY, A. Airways delivery of rifampicin microparticles for the

treatment of tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.28, p.431-434, 2001.

TAPIAS, G.N.; SICCHIEROLLI, S.-M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and Escherichia coli. **Langmuir**, v.10, p.3461-3465, 1994.

UNITED States Pharmacopeia: USP29. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Hospital das Clínicas. **Tuberculose – padronização de condutas**: normas para o diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose. São Paulo: Hospital das Clínicas FMUSP, 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/normas-para-o-diagnostico-tratamento-e-prevencao-da-tuberculose-pdf-a51982.html>. Acesso em: 02 Maio 2010.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.70, n.2, p.95-111, 1995.

VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Syntetic bilayer for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.244, p.427-431, 2001.

VIEIRA, D.B.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Competitive adsorption of cationic bilayers and chitosan on latex: optimal biocidal action. **Langmuir**, v.19, p.924-932, 2003.

VIEIRA, D.B.; PACHECO, L.F.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Assembly of a model hydrofobic drug into cationic bilayer fragments. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.293, p.240-247, 2006.

VYAS, S.P.; KANNAN, M.E.; JAIN, S.; MISHRA, V.; SINGH, P. Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. **International Journal Pharmaceutics**, v.269, n.1, p.37-49, 2004.

VYNNYCKY, E.; FINE, P. Interpreting the decline in tuberculosis: the role of secular trends in effective contact. **International Journal of Epidemiology**, v.28, n.2, p.327-334, 1999.

WEINSTEIN, J.N. Liposomes as "targeted" drug carrier: a physical chemical perspective. **Pure and Applied Chemistry**, v.53, p.2241-2254, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control**: a short update to the report. Geneva: Global Tuberculosis Programme, 2009. p. 4-6.

ZARU, M.; MOURTAS, S.; KLEPETSANIS, P.; FADDA, A.M.; ANTIMISIARIS, S.G. Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67, p.655-666, 2007.

ZARU, M.; SINICO, C.; De LOGU, A.; CADDEO, C.; LAI, F.; MANCA, M.L.; FADDA, A.M. Rifampicin-loaded liposomes for the passive targeting to alveolar macrophages: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of Liposome Research**, v.19, n.1, p.68-76, 2009.

APÊNDICES

Apêndice 1. Notification of Acceptance Book Chapter

Apêndice 2. Novel formulations for tuberculostatics drugs based on cationic lipid. Abstract In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ), Brazil, 2010

ANEXOS

Anexo 1. Currículo Lattes

Anexo 2. Ficha do Aluno

Apêndice 1. Notification of Acceptance Book Chapter

INTECH OPEN ACCESS
PUBLISHER
T/F +385 51 315 152
E info@intechweb.org
www.intechweb.org

TO:
Ana Carmona-Ribeiro
São Paulo SP
Brazil

DATE: Jun 08, 2010

INTECH NOTIFICATION OF ACCEPTANCE

Dear Professor Ana Carmona-Ribeiro,

On behalf of the Editorial Board it is my pleasure to inform you that the manuscript entitled "Antimicrobial Biomimetics", written by Ana Carmona-Ribeiro, Lilian Barbassa and Leticia Melo has been accepted to be published in the book "Advances in Biomimetics", ISBN 978-953-7619-X-X.

We firmly believe that your contribution will be of great importance for the scientific community.

Sincerely yours,

Aleksandar Lazinica, President and CEO

INTECH

INTECH International Offices:

OFFICE RIJEKA:
Janeza Trdine 9
51000 RIJEKA
Croatia

OFFICE VIENNA:
Zieglergasse 14
A-1070 Vienna
Austria

DISTRIBUTION CENTRE:
Phoenix Consulting Services Ltd.
3/240 Vivek Khand, Gomti Nagar.
Lucknow-226010, India

Abstract of Book Chapter: Antimicrobial Biomimetics**Ana Maria Carmona-Ribeiro, Lilian Barbassa and Letícia Dias de Melo**

A vast territory for research is open from mimicking the behavior of microorganisms to defend themselves from competitors. Antibiotics secreted by bacteria or fungi can be copied to yield efficient molecules which are active against infectious diseases. In this review, peptides, lipids, particles and films are overviewed unraveling novel antimicrobial approaches against infectious diseases.

Apêndice 2. Novel formulations for tuberculostatics drugs based on cationic lipid

XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Brazil, 2010.

Novel Formulations for Tuberculostatic Drugs Based on Cationic Lipid

Barbassa, L.^{1,2}, Mamizuka, E. M.², and Carmona-Ribeiro, A. M.^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Cationic bilayers in form of bilayer fragments (BF) or large vesicles (LV) provide adequate environment for solubilization and stabilization of antimicrobial drugs with the advantage of being also antimicrobial agents. In this work, BF or LV interaction with two tuberculostatic drugs, rifampicin (RIF) and isoniazid (ISO) is characterized and the assemblies tested against *Mycobacterium smegmatis*. Methods were determination of cell viability, minimal bactericidal concentration and entrapment efficiency for both drugs from dialysis experiments. The occurrence of synergism between cationic lipid and rifampicin was a major result of this investigation. The cationic lipid alone killed *M. smegmatis* over a range of low concentrations. Rifampicin drug particles above its solubilization limit could be solubilized by BF at 0.5 mM lipid. LV were leaky to isoniazid whereas RIF could be incorporated in the cationic bilayer at high percentiles. The novel assemblies may become useful in chemotherapy against tuberculosis.

Key words: tuberculostatics drugs, cationic lipid, *Mycobacterium*.

Acknowledgements: FAPESP and CNPq

Anexo 1. Currículo Lattes

Lilian Barbassa

Bolsista de Mestrado do CNPq

Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Araraquara (2004). Especialista em Análises Clínicas pela Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto (2006). Atualmente é mestranda no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Análises Clínicas) da Universidade de São Paulo- USP. Tem experiência na área de Microbiologia Clínica e sistemas de *drug delivery*.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 17/09/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/3723322252407914>

Dados pessoais

Nome Lilian Barbassa

Nome em citações bibliográficas BARBASSA, L.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Rua Lineu Prestes 580 bloco 17 (Laboratório de Microbiologia)
Cidade Universitária - Butantã
05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913663
URL da Homepage: www.usp.br

Formação acadêmica/Titulação

2008 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em

dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* contra micobactérias, *Orientador*: Elsa M. Mamizuka; *Co-orientador* Ana M. Carmona-Ribeiro.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
Palavras-chave: tuberculose; fármacos tuberculostáticos; bicamada catiônica.

- 2005 - 2006** Especialização em Especialização em Análises Clínicas. (Carga Horária: 480h).
 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Brasil.
Título: Principais infecções fúngicas em pacientes submetidos a transplante renal.
Orientador: Prof. Dr. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.
- 2007 - 2007** Aperfeiçoamento em Análises Clínicas. (Carga Horária: 1800h).
 Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Brasil.
Título: Infecção de sítio cirúrgico: principais agentes infecciosos.
Orientador: Dr. Cecília H. Godoy Carvalhaes.
Bolsista do(a): Fundação de Desenvolvimento Administrativo (FUNDAP)
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
 Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Formação complementar

- 2007 - 2007** Prevenção de resistência microbiana. (Carga horária: 12h).
 Universidade Federal de São Paulo.
- 2007 - 2007** Importância dos exames de urina de rotina e microb. (Carga horária: 5h). Instituto Fleury.
- 2006 - 2006** Aplicação da Enzimologia no diagnóstico de patologias. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 2005 - 2005** Diagnóstico de Doenças Auto imunes. (Carga horária: 8h).
 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 2005 - 2005** A contribuição do laboratório clínico na avaliação hormonal. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 2005 - 2005** Atualidades em Doenças de Chagas. (Carga horária: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2005 - 2005 Células tronco e o futuro da terapia. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 40,
Regime: Dedicção exclusiva.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ BARBASSA, L. ; MAMIZUKA, EM. ; CARMONA-RIBEIRO, AM. Novel formulations for tuberculostatics drugs based on cationic lipid. In: 3rd International Symposium of Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules, 2010.
2. ★ BARBASSA, L.; MAMIZUKA, EM.; CARMONA-RIBEIRO, AM. Novel formulations for tuberculostatics drugs based on cationic lipid. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ), 2010.

3. BARBASSA, L.; MAMIZUKA, EM. ; CARMONA-RIBEIRO, AM. Novel formulations for tuberculostatics drugs based on cationic lipid. In: International Liposome Society 2009. Meeting, Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, 2009, London. Abstract Book. London, 2009.

Apresentações de Trabalho

1. BARBASSA, L.; MAMIZUKA, EM.; CARMONA-RIBEIRO, AM. Novel formulations for Tuberculostatics Drugs Based on Cationic Lipid. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. FERREIRA, CES; SALVARANI, NAC; BARBASSA, L.; GHORAYEB, N.; CARVALHAES, C.H.V.F.G . "Avaliação da BNP e NT pro BNP pré e pós-maratona de São Paulo". 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos

1. Congresso Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular. Novel Formulations for Tuberculostatics Drugs Based on Cationic lipid. 2010. (Congresso).
2. II Simpósio de Pós- graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2010. (Simpósio).
3. I Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2009. (Simpósio).
4. VIII Simpósio de Biossegurança e Descarte de produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa. 2009. (Simpósio).
5. Programa de Educação para a prevenção e o controle da resistência microbiana e o uso racional de antimicrobianos. 2007. (Outra).
6. Jornada farmacêutica da UNESP. 2006. (Outra).
7. Jornada Farmacêutica da UNESP. 2005. (Outra).
8. Semana da Biologia. 2004. (Outra).

9. Semana da Biologia. 2003. (Outra).
10. Semana da Biologia. 2002. (Outra).
11. Semana da Biologia. 2001. (Outra).

Outras informações relevantes

O projeto de mestrado: “Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* contra micobactérias” foi desenvolvido junto ao laboratório de Biocolóides (Depto Bioquímica, Instituto de Química da USP- SP) e junto ao Depto de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF-USP).

Anexo 2. Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6603514/1 - Lílian Barbassa

Email: lilianb@usp.br
Data de Nascimento: 27/01/1982
Cédula de Identidade: RG - 30.232.888-9 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciatura plena e Bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais - Centro Universitário de Araraquara - São Paulo - Brasil - 2005

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 04/08/2008
Início da Contagem de Prazo: 04/08/2008
Data Limite: 04/02/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elsa Masae Mamizuka - 04/08/2008 até o presente. E.Mail: mamizuka@usp.br

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 16/06/2010

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

**Data de Aprovação da
Banca:**

**Data Máxima para
Defesa:**

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

**Histórico de
Ocorrências:** Ingressou no Mestrado em 04/08/2008
Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6603514/1 - Lílían Barbassa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-1/3	Seminários em Análises Clínicas II	11/08/2008	24/11/2008	30	2	85	A	N	Concluída
BMM5818-1/5	Seminários Gerais de Microbiologia II	18/03/2009	27/05/2009	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5793-9/1	Tópicos em Análises Clínicas I	23/03/2009	05/07/2009	30	2	87	A	N	Concluída
FBA5728-2/9	Aprimoramento Didático	02/04/2009	29/04/2009	60	4	100	A	N	Concluída
BMM5789-4/1	Mecanismos de Ação de Agentes Antimicrobianos	04/05/2009	01/06/2009	60	4	100	A	N	Concluída

ICB5709-4/3	Ensaio Pedagógico	04/05/2009	08/06/2009	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5707-5/2	Infecção Hospitalar: Recursos Laboratoriais Tradicionais e Avançados na Investigação, Epidemiologia, Profilaxia e Controle	21/09/2009	11/10/2009	75	5	90	A	N	Concluída
QBQ5716-4/1	Biomoléculas e Superfícies (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/10/2009	30/11/2009	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	25
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010