Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Preparação e avaliação de sistemas lipossomais para transporte da rifampicina

Tulio Nakazato da Cunha

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ida Caramico Soares

São Paulo
2004

J1926

DEDALUS - Acervo - CQ
30100006015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cunha, Tulio Nakazato da
C972p Preparação e avaliação de sistemas lipossomais para transporte da rifampicina / Tulio Nakazato da Cunha. -- São Paulo, 2004.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Soares, Ida Caramico

1. Farmacotécnica 2. Tecnologia farmacêutica 3. Lipossoma : Biotecnologia 4. Tuberculose : Medicina I. T. II. Soares, Ida Caramico, orientador.

615.4 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tulio Nakazato da Cunha

Preparação e avaliação de sistemas lipossomais para transporte da rifampicina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ida Caramico Soares
orientador/presidente

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez
1°. examinador

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
2°. examinador

São Paulo, 29 de março de 2004.

Dedico este trabalho a todos os enfermos que sofrem ou sofreram de tuberculose,

Agradecimentos

A Deus, por me dar a oportunidade de fazer algo pelo meu próximo. Agradeço também meu querido Deus, pelo Senhor ser sempre tão bom para mim, relevando as minhas inúmeras faltas e me ajudando mais uma vez a realizar todos os meus sonhos.

Aos meus pais, por serem as pessoas maravilhosas que são, pelo seu imenso amor e por sempre estarem ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, em que nem eu mais acreditava.

A minha querida esposa Luiza, sempre tão compreensiva, amável e prestativa. À toda a minha família pelo incentivo e apoio permanentes.

À Profª Drª Ida Caramico Soares, minha orientadora e amiga, por ter me confiado este projeto e acreditado no meu potencial, na hora em que eu mais precisei.

À Profª Drª Maria Helena Bueno da Costa, do Instituto Butantan, por ter me ensinado os primeiros passos na arte dos lipossomas.

À Profª Drª Elizabeth Natal De Gaspari, do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração e ensinamentos nos processos biotecnológicos.

Ao Profº Drº Leoberto Costa Tavares, pela compreensão e apoio logístico indispensável, para a conclusão deste trabalho.

Ao Profº Drº José Abrahão Neto, pela constante boa-vontade e pelas valiosas sugestões e ajuda nas etapas de purificação e separação por gel-filtração e centrifugação.

Ao Profº Drº Humberto Gomes Ferraz, pela grande amizade e gentileza dispensadas, possibilitando as leituras espectrofotométricas.

À Profª Drª Cristina Helena dos Reis Serra, minha mestre dos tempos de faculdade, pelo incentivo e apoio constantes.

Ao Edgar, nosso técnico e amigo, pela "força" e pelos "toques" e à Lúcia, do B14, pela atenção e indispensável ajuda no processo de liofilização.

Aproveito para agradecer a todos os meus amigos do Instituto Butantan, em especial ao Wagner, Mickie, Vivi, Júlia e Dna Maria Inês, que me ajudaram e me tiraram muitas dúvidas.

A todos os meus grandes amigos Luiza, Márcia e Flávia (nossa equipe); Andrea, Sibila, Vanderson, Marcus (minha "outra" equipe); Vanessa; Marina; Marco Aurélio; Leila. Obrigado por vocês existirem!

A todo o pessoal das secretarias de pós-graduação da Farmácia e a

todos os funcionários da USP e do Instituto Butantan.

Aos meus amigos fornecedores, em especial à Maria das Dores (Instrulab); Luciana (Amersham) e Seu Madaleno.

Ao CNPq pelo auxílio concedido na forma de Apoio ao Projeto e Bolsa Mestrado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e injustamente, reconheço, os nomes eu esqueci ou realmente não sei.

Sumário

1-Introdução----------2

2-Revisão bibliográfica

2.1-Tuberculose

2.1.1-Generalidades----------6

2.1.2-Patogenia----------9

2.1.3-Tratamento e profilaxia

2.1.3.1-BCG e quimioprofilaxia----------12

2.1.3.2-Quimioterápicos----------13

2.1.3.3-Esquemas de tratamento----------18

2.1.4-Epidemiologia e resistência

2.1.4.1-Aspectos mundiais----------25

2.2-Lipossomas

2.2.1-Generalidades----------33

2.2.2-Métodos de preparação

2.2.2.1-Constituintes estruturais----------35

2.2.2.1.1-Seleção de componentes----------38

2.2.2.2-Métodos de obtenção----------41

2.2.2.2.1-Hidratação de filme lipídico----------42

2.2.2.2.2-Sonicação----------43

2.2.2.2.3-Extrusão----------45

2.2.2.2.4-Desidratação-reidratação----------46

2.2.2.2.5-Características dos principais métodos de preparação dos lipossomas----------47

2.2.3-Purificação dos lipossomas

2.2.3.1-Remoção de traços de solvente orgânico----------49

2.2.3.2-Remoção de fármaco livre----------49
2.2.4-Caracterização dos lipossomas----------50
2.2.5-Vantagens do uso dos lipossomas----------53
2.2.6-Exemplos de utilização no mercado----------55
2.2.7-Utilização de lipossomas como transportadores de fármacos antimicobacterianos----------56
2.3-Rifampicina
2.3.1-Farmacocinética
2.3.1.1-Absorção----------67
2.3.1.2-Distribuição----------67
2.3.1.3-Biotransformação----------68
2.3.1.4-Eliminação/excreção----------68
2.3.1.5-Características dos pacientes----------69
2.3.2-Farmacodinâmica----------69
2.3.2.1-Mecanismo de ação----------70
2.3.3-Indicações----------70
2.3.4-Contra-indicações----------71
2.3.5-Interações medicamentosas----------71
2.3.6-Reações adversas----------72
2.3.7-Precauções----------73
2.3.8-Advertências----------74
3-Objetivos----------76
4-Material e métodos
4.1-Material
4.1.1-Matérias-primas e reagentes----------78
4.1.2-Equipamentos e materiais de laboratório----------78
4.2-Métodos

4.2.1-Preparação de lipossomas carreando rifampicina

4.2.1.1-Preparação da vidraria e utensílios que irão entrar em contato direto com lipossomas----------79

4.2.1.2-Preparo do tampão fosfato (pH 7,0)----------80

4.2.1.3-Preparo da solução de rifampicina----------80

4.2.1.4-Obtenção dos lipossomas pelo método da extrusão---81

4.2.2-Separação da preparação lipossomal

4.2.2.1- Separação da preparação lipossomal por gel-filtração

4.2.2.1.1-Preparo das microcolunas----------82

4.2.2.1.2-Separando os lipossomas----------83

4.2.2.2-Separação da preparação lipossomal por centrifugação ----------84

4.2.3-Doseamento e avaliação do rendimento do processo

4.2.3.1-Avaliação da estrutura da bicamada----------84

4.2.4-Estudo de estabilidade dos lipossomas de rifampicina "in vitro"----------85

4.2.5-Validação da metodologia analítica----------87

4.2.5.1-Espectro de absorção (curva de varredura) da rifampicina----------87

4.2.5.2-Construção da curva padrão ou reta de calibração de rifampicina

4.2.5.2.1-Preparação das soluções

4.2.5.2.1.1-Solução tampão fosfato pH 7,0----------88

4.2.5.2.1.2-Soluções de rifampicina----------88

4.2.5.2.2.Condições da análise espectrofotométrica----------89

4.2.5.3-Pesquisa de interferentes(especificidade/seletividade)90

4.2.5.3.1-Análise da interferência do detergente Triton-X100 na leitura da rifampicina----------90
4.2.5.3.2-Interferência dos lipossomas vazios----------90
4.2.5.4-Determinação dos limites de detecção e quantificação91
4.2.5.5-Determinação da precisão e exatidão----------91
4.2.6-Obtenção das concentrações de rifampicina nas amostras analisadas----------92
4.2.7.Criofratura----------93
5-Resultados
5.1-Validação da metodologia analítica
5.1.1-Espectro de absorção (Curva de varredura) de rifampicina---------- 95
5.1.2-Curva padrão de rifampicina----------95
5.1.3-Pesquisa de interferentes(especificidade/ seletividade)
5.1.3.1-Influência dos lipossomas vazios na leitura----------97
5.1.3.2-Influência do detergente Triton-X®100 na leitura-------97
5.1.4-Determinação da precisão e exatidão----------98
5.2-Detecção da presença do lipossoma----------99
5.3- Avaliação dos processos de separação
5.3.1- Absorbância antes da quebra por detergente Triton – X100- ----------101
5.3.2- Absorbância após quebra por detergente Triton – X100------ ----------102
5.4-Estudo de estabilidade dos lipossomas de rifampicina "in vitro"----------103
6-Discussão
6.1-Montagem e estruturação do laboratório----------105

6.2-Adaptação da metodologia----------105

6.3-Mecanismo de encapsulamento do fármaco no interior dos lipossomas----------106

6.4-Sistema de separação dos lipossomas por gel-filtração--------107

6.5-Avaliação de concentração de rifampicina pela técnica da espectrofotometria----------109

6.6-Detecção do ponto de saída do lipossoma durante o processo de gel-filtração----------109

6.7-Presença, estrutura e integridade da bicamada lipossomal----110

6.8-Estudo de estabilidade da rifampicina em lipossomas----------110

6.9. Criofratura----------111

7-Conclusão----------113

8-Referências Bibliográficas----------115

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Distribuição das notificações mundiais de tuberculose – 1998.....8

Figura 02 - Casos notificados de tuberculose, no Brasil, por região em 1998.....9

Figura 03 – Fluxograma que leva à resistência- desenvolvimento e propagação de bacilos resistentes.....28

Figura 04 – Prevalência mundial de resistência adquirida a fármacos antituberculose – 1994 a 1997.....31

Figura 05 - Esquema mostrando a estrutura interna de um lipossoma multilamelar.....39

Figura 06 - Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas....40

Figura 07 - Hidratação do filme lipídico seco.....43

Figura 08 - Método de obtenção de lipossomas por sonicação.....45

Figura 09 - Extrusão por membrana de policarbonato.....46

Figura 10 – Mecanismos de interação lipossoma/célula.....60

Figura 11 - Fotomicrografia obtida pela técnica da criofratura. Aumento de 22.500X.....93

Figura 12 – Espectro de absorção da rifampicina em tampão fosfato pH 7,0 de concentração 5 mg/ mL.....96

Figura 13 – Curva padrão de rifampicina.....97

Figura 14 - Reconstituição de lipossomas com CF.....101

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01 - Esquemas quimioterápicos alternativos para cada categoria de tratamento....20

Quadro 02 - Esquemas de tratamento segundo a situação do caso....22

Quadro 03 - Esquema I - 2RHZ/4RH....22

Quadro 04 - Esquema IR - 2RHZE/4RHE....23

Quadro 05 - Esquema II - 2RHZ/7RH....23

Quadro 06 - Esquema III - 3SEtEZ/9EtE[a]....24

Quadro 07 – Tamanhos de lipossomas. **SUV**- Small unilamellar vesicles, **LUV**- Large unilamellar vesicles, **MLV**- Multilamellar vesicles....34

Quadro 08 – Principais características dos métodos de preparação dos lipossomas....48

Quadro 09 – Características e parâmetros para avaliação de preparações de lipossomas....52

Quadro 10 – Fármacos encapsulados em lipossomas disponíveis no mercado ou em fase final de desenvolvimento....55

Quadro 11 – Rifampicina: características farmacopéicas....66

Quadro 12 – Preparo das soluções de rifampicima para padronização do método espectrofotométrico em que: Solução S → solução de rifampicina contendo 1,0 mg/ mL em tampão fosfato pH 7,0.....89

Tabela 01 - Valores de absorbância observados em 475 nm para solução contendo 1 mg/ mL em solução tampão fosfato, conforme descrito no item 4.2.5.2.1.2, "Material e Métodos" e após 5 repetições.....95

Tabela 02 - Valores de absorbância observados em 475 nm para solução contendo 30 µg/ mL de rifampicina em solução tampão fosfato, conforme descrito no item 4.2.5.2.2 de "Materiais e Métodos".....98

Tabela 03 - Resultados da validação do método espectrofotométrico de acordo com metodologia descrita no item 4.2.5.....99

Tabela 04 - Detecção da presença dos lipossomas durante o processo de separação por gel-filtração (sem adição de detergente Triton – X100. As amostras foram diluídas 1 : 10, para possibilitar a leitura.....100

Tabela 05 - Detecção da presença dos lipossomas durante o processo de separação por gel-filtração (após adição de detergente Triton – X100).....100

Tabela 06 – Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da gel-filtração As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura.....101

Tabela 07 - Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da centrifugação As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura.....101

Tabela 08 - Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando

realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da gel-filtração. As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura. Após a adição de mais 1 mL de solução de Triton, a diluição final ficou 1 : 15.....102

Tabela 09 - Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da centrifugação. As amostras foram diluídas 1 : 10, para se possibilitar a leitura. Após a adição de mais 1 mL de solução de Triton, a diluição final ficou 1 : 15.....102

Tabela 10 – Leituras das amostras referentes ao teste de estabilidade.....103

Resumo

A tuberculose pulmonar é uma doença infecto-contagiosa, cuja transmissão se dá através das vias aéreas. Possui evolução crônica e é causada no homem pelo *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum e M.microti.* A tuberculose, que vem ressurgindo nos dias atuais de maneira mais intensa, especialmente devido ao advento da AIDS, tem representado grave problema de saúde pública. Uma das causas da falta de sucesso do seu tratamento vêm do período prolongado no qual o paciente deve receber medicação, levando à grande proporção de abandono durante o mesmo. Percebe-se então, a necessidade do desenvolvimento de formas de liberação prolongada para o tratamento da tuberculose, afim de se possibilitar uma maior adesão, aliada ao bem-estar e comodidade do paciente.

Um dos mais modernos representantes deste tipo de liberação, consiste nos chamados ***vetores medicamentosos.*** Dentre estes vetores, podemos citar como exemplos bem conhecidos, os lipossomas. Todos eles possuem inúmeras vantagens em relação à outras formas farmacêuticas, entre as quais pode-se ressaltar sua grande especificidade, que pode possibilitar o exercício de sua atividade farmacológica com diminuição de efeitos secundários. Como conseguem atingir um "alvo" bem determinado, até mesmo receptores celulares específicos, os fármacos apresentados como vetores medicamentosos tornam-se menos tóxicos e necessitam de posologia menor, para realizarem o mesmo efeito terapêutico.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver lipossomas transportadores de fármacos de primeira escolha no tratamento da tuberculose (rifampicina).

Abstract

The pulmonary tuberculosis is a contagious disease and its transmission happens by air vials. Tuberculosis has a cronical evolution and it is caused by *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum and M.microti* in humans. The tuberculosis is ressurging nowadays harder in special because AIDS advent and it have represented a serious public healthy problem. The long time when the patient should receive is one cause of unsuccessful of this disease treatment. This situation asks for slowly release drugs for tuberculosis treatment. It improved the threatment adesion and to feel good state to patient.

Liposomes are known modern medicine vehicles. These vehicles have many advantages in relation conventional pharmaceutical forms. Liposomes are specific and have less secundary effects. These pharmaceutical forms get to target well determined regions include cell receptors. Liposomes have less toxicity and need a little dosis to get its therapeutical effects.

The objective of this scientific paper is to develop liposomes to anti - tuberculosis drug, the rifampin.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A tuberculose pulmonar é uma doença infecto-contagiosa cuja transmissão se dá através das vias aéreas. Possui evolução crônica e é causada no homem pelo *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum e M. Microti* (Centro Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, 1998).

Esta doença continua sendo um sério problema de saúde pública mesmo nos dias atuais. Os avanços no seu conhecimento e a tecnologia disponível para seu controle e tratamento não têm sido suficientes, principalmente nos países em desenvolvimento, para controlar significativamente, a sua morbidade e a sua mortalidade crescentes (Assis, 2001).

Piorando a situação, a tuberculose ainda é pertencente a um grupo intitulado de "doenças negligenciadas", pelo fato de que tais doenças atinjam principalmente os países em desenvolvimento ou chamados subdesenvolvidos, o que segundo Yves Champey, presidente do Conselho da ONG "Drogas para Doenças Negligenciadas", faz com que dos US$ 70 bilhões investidos anualmente pela indústria farmacêutica mundial, apenas 10% desse investimento seja direcionado para o estudo das doenças que acometem 90% da população global, tendo a tuberculose dentre elas e, que de todas os novos fármacos desenvolvidos no período de 1975 a 1999 apenas, 1% se destinava ás doenças tropicais.

Devido à gravidade da situação e à facilidade de proliferação, já que o bacilo se dissemina pelo ar, a OMS decretou em abril de 1993, Emergência Global contra a tuberculose e desde então, vêm desenvolvendo políticas para conter o crescimento de casos. De acordo com o relatório publicado, que também criticou a falta de estratégias para o controle das doenças, mais

da metade dos novos casos registrados em 1997, ocorreu em países do sul da Ásia, África e América Latina.

Sem uma mudança no quadro atual, a situação se compara a uma bomba relógio e, segundo estimativas alarmantes da própria OMS, surgirão no mundo mais de um bilhão de novos casos de tuberculose até o ano 2020.

Os lipossomas

Uma das principais causas da falta de sucesso no tratamento da doença tuberculosa vem do período prolongado, no qual o paciente deve receber medicação, levando a uma grande proporção de abandono durante o mesmo, principalmente quando é lembrado o fato de que o tratamento à base de uma combinação de antibióticos, gera uma infinidade de efeitos indesejáveis, agravado por uma sensação de melhora logo no início do tratamento. Percebe-se então, a necessidade do desenvolvimento de formas de liberação prolongada para o tratamento da tuberculose, afim de se possibilitar uma maior adesão, aliada ao bem-estar e comodidade do paciente.

Um dos mais modernos representantes deste tipo de liberação consiste nos **vetores medicamentosos** e dentre estes vetores, podemos citar como exemplos bem conhecidos os lipossomas. Eles possuem inúmeras vantagens, em relação à outras formas farmacêuticas, entre as quais podemos ressaltar a sua grande especificidade, que pode possibilitar o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários. Como conseguem atingir um alvo bem determinado, até mesmo, receptores celulares específicos, os lipossomas tornam-se menos tóxicos e necessitam de posologia menor para realizarem o mesmo efeito terapêutico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tuberculose

2.1.1. Generalidades

2.1.2. Patogenia

2.1.3. Tratamento e profilaxia

2.1.4. Epidemiologia e resistência

2.1.1. Generalidades

No decorrer do século XIX e até meados do século XX, a tuberculose era uma doença comum entre poetas, intelectuais, músicos e demais artistas. Associada a um estilo de vida boêmio e desregrado, era então considerada uma "doença romântica". Foi também nessa época, no ano de 1882, que Robert Koch descobriu a bactéria causadora da moléstia e que por essa razão, acabou por ser denominada de "bacilo de Koch" (*Mycobacterium tuberculosis*) (FUNASA, 2003).

A tuberculose também é apontada por muitos como um "mal social", por estar intimamente ligada às condições precárias das classes sociais menos favorecida. Isso acontece devido ao fato da doença se estabelecer mais facilmente em indivíduos com baixa resistência orgânica, que pode ser causada por inúmeros fatores como má qualidade de vida, falta de higiene, tabagismo, alcoolismo etc.

Atualmente, a tuberculose é a doença infecto-contagiosa que mais causa mortes no Brasil que é, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o único país das Américas que encontra-se entre as 22 nações responsáveis por 70% de casos da enfermidade em todo o mundo (Fiocruz, 2003).

O Brasil elaborou um plano emergencial para o controle da tuberculose, objetivando que 100% dos municípios tenham ações de diagnóstico e tratamento da tuberculose, 80% dos centros de saúde desenvolvam essas ações, 90% dos casos existentes sejam diagnosticados e que 85% dos casos tratados sejam curados (Assis, 2001).

Os alcances atuais do programa são: 1) vacinação de 90% dos menores de 1 ano, 2) descoberta de 75% da estimativa de casos, 3) resultados favoráveis de 75% dos pacientes que iniciam tratamento. Estas

ações governamentais têm colaborado para a redução do problema da tuberculose no Brasil (FUNASA, 2003).

Apesar desse esforço, a tuberculose persiste como importante problema de saúde pública no Brasil, representado por cerca de 90 mil casos novos e mais de 6 mil mortes anuais, segundo dados da Secretaria em Vigilância da Saúde do Ministério da Saúde. A redução da taxa de incidência de casos, embora sustentada, é pouco expressiva (2% ao ano para a forma pulmonar positiva). Há um relatório da OMS falando da situação preocupante da tuberculose no Brasil.

Esse panorama tende a se agravar por várias causas, destacando a crise econômica, a deterioração dos serviços de saúde e a epidemia de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (FUNASA, 2003).

"A declaração pela OMS, do estado de emergência da tuberculose e a sua magnitude na próxima década (90 milhões de casos e 30 milhões de mortes em todo o mundo) valem como um alerta a todos os países" (Figura 01).

O número de casos novos registrados no Brasil em 1996 foi de aproximadamente 100 mil; 85% dos casos de tuberculose no país ocorrem em maiores de 15 anos. No caso de adultos, a forma pulmonar corresponde a 90% do total, enquanto em crianças este percentual é de 75% (Figura 02).

A taxa de mortalidade sofre flutuações, segundo as diversas faixas etárias: alcança valores elevados na faixa de 0 e 4 anos, decresce a partir dessa idade, torna a se elevar na faixa dos 10 e 14 anos, para chegar ao pico máximo entre idosos, a partir dos 60 anos (Ministério da Saúde, 1995).

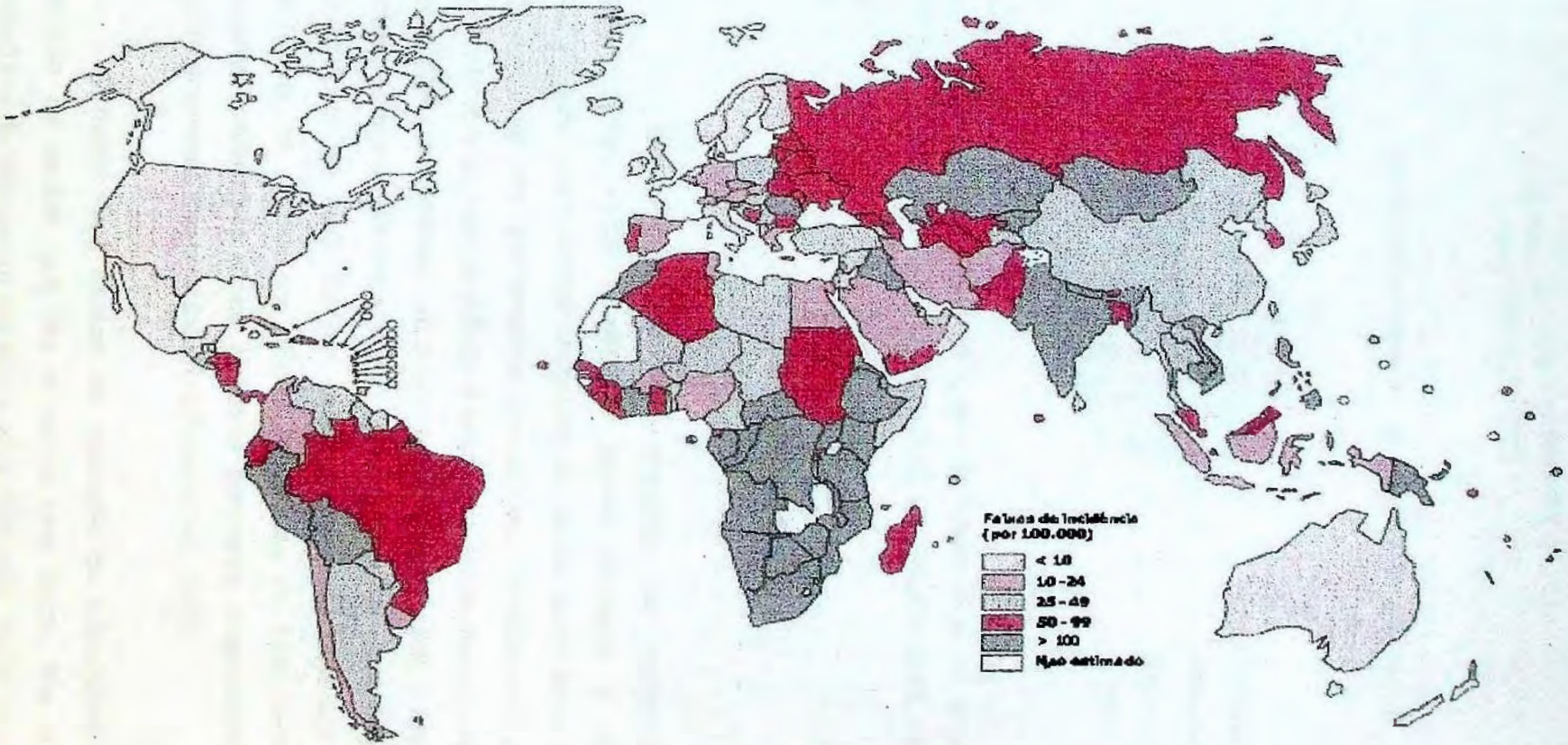

Figura 01 – Distribuição das notificações mundiais de tuberculose - 1998

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Global tuberculosis control. WHO report 2000.*** Geneve, 2000, 187 p.

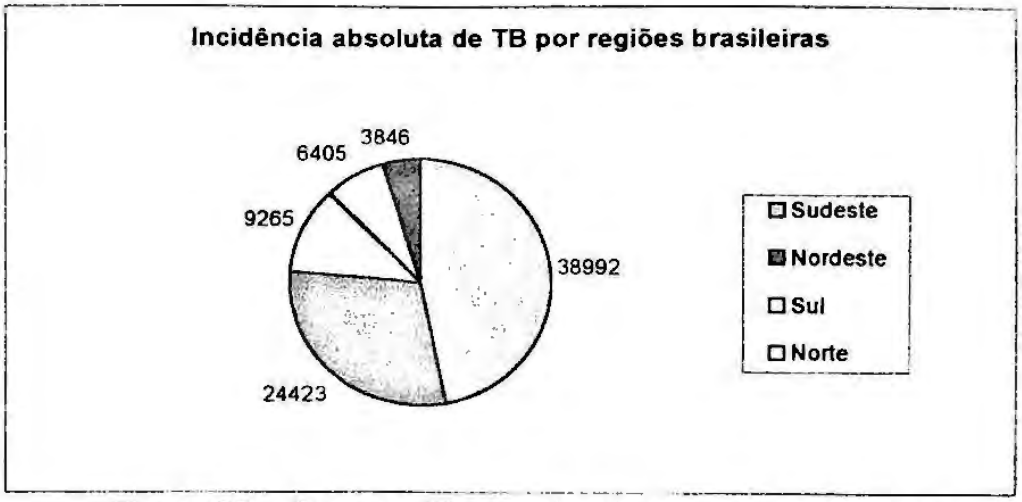

Figura 02 – Casos notificados de tuberculose, no Brasil, por região em 1998. Fonte: FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – MS, 1999.

2.1.2. Patogenia

A tuberculose pode ser causada por várias espécies de micobactérias, sendo o principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis,* bacilo aeróbio obrigatório de caráter álcool-ácido resistente. As micobactérias são caracterizadas pelo alto teor de lipídios em seu envelope, o que confere grande resistência à condições ambientais adversas, podendo sobreviver por semanas em meio completamente seco e resistir a alguns antimicrobianos utilizados como antissépticos e desinfetantes. O *M. tuberculosis* faz parte de um pequeno grupo de espécies capazes de sobreviver no interior de células fagocíticas do hospedeiro animal. É provável, portanto que seu envelope apresente propriedades de defesa contra processos microbicidas (Reichman *et. al.*, 1993).

O modo mais comum de aquisição da tuberculose se dá pela inalação de bacilos que são expelidos pela tosse, fala ou espirro de portadores da doença em sua forma ativa (FUNASA, 2003). Um espirro pode produzir mais de um milhão de núcleos infecciosos, que são muito estáveis e

produzir mais de um milhão de núcleos infecciosos, que são muito estáveis e se mantém suspensos no ar por um longo período de tempo e partículas com diâmetro de até 5 μm, contendo de 1 a 3 bacilos, atingem os espaços alveolares. O número de bacilos inalados necessários para se estabelecer infecção não é exatamente definido por depender da virulência do bacilo e da resistência do hospedeiro, porém estudos indicam que este número esteja entre 10 e 50 unidades, cerca de 6% dos bacilos inalados (Assis, 2001).

Os métodos disponíveis para diagnóstico da tuberculose compreendem exames radiológico, imunológico e bacteriológico, aplicáveis de acordo com a forma e estágio da doença. O exame radiológico é indicado para indivíduos sintomáticos com baciloscopia negativa. A prova tuberculínica é utilizada como método auxiliar de diagnóstico de TB em pessoas não vacinadas com BCG. Realiza-se a cultura do bacilo para indivíduos suspeitos de tuberculose pulmonar, negativos ao exame direto e para diagnóstico de formas extrapulmonares. A baciloscopia direta no escarro é o método de escolha por ser simples, de baixo custo, seguro e principalmente, por permitir identificar casos bacilíferos, fontes de propagação da doença (FUNASA, 2003)

De modo geral, a patogênese da tuberculose pode ser dividida em estágios que ocorrem sequencialmente durante a evolução da doença sem intervenção terapêutica. O primeiro estágio se inicia com a inalação do bacilo da tuberculose e sua subsequente instalação em um alvéolo pulmonar, onde é capturado por macrófagos alveolares (Assis, 2001). A evolução para o próximo estágio é dependente de três fatores: virulência do microrganismo, carga bacilífera e resistência do hospedeiro. Se os macrófagos alveolares falharem em destruir o bacilo, este se multiplica até que o macrófago se rompa, liberando uma nova geração de bacilos que serão então fagocitados por outros macrófagos alveolares e por macrófagos imaturos provenientes da corrente sangüínea (Assis, 2001).

Inicia-se então, o segundo estágio da patogênese, caracterizado por relacionamento simbiótico no qual o macrófago não ativado é incapaz de destruir ou inativar o bacilo, que por sua vez não agride o macrófago pois, o hospedeiro ainda não desenvolveu hipersensibilidade tuberculínica (Assis, 2001). No primo-infecção, como o hospedeiro apresenta-se destituído de resistência específica, os bacilos proliferam-se com desenvolvimento de lesão com reação inflamatória aguda ou sub-aguda.

Quando a multiplicação logarítmica dos bacilos no interior dos macrófagos cessa, se inicia o terceiro estágio da doença, o que se dá de duas a três semanas após a inalação do bacilo. O hospedeiro se torna tuberculina-positivo e as lesões apresentam necrose caseosa. O bacilo é capaz de sobreviver em material caseoso sólido mas aparentemente, não pode multiplicar-se devido à condições desfavoráveis como falta de oxigênio, pH reduzido e presença de ácidos graxos inibitórios. Se o número de bacilos for pequeno, a probabilidade de regressão da lesão é maior porém, se a carga bacilífera for maior, ocorre aumento das lesões que se convertem em tubérculos, caracterizados por formações nodulares constituídas por uma região central onde se encontram células gigantes tipo Langhans, uma região média de células epitelióides e uma camada periférica de fibroblastos, linfócitos e monócitos. Em individuos imunologicamente debilitados o quarto estágio da doença é caracterizado pela fagocitose de bacilos oriundos dos cáseos por macrófagos não ativados ou fracamente ativados que permitem sua multiplicação intracelular, resultando em crescimento da área de necrose caseosa e migração, através dos canais linfáticos e sistema circulatório, para vários órgãos, em especial aqueles de maior oxigenação. Este tipo de disseminação hematogênica pode causar tuberculose miliar, caracterizada pela ocorrência de vários pequenos tubérculos de tamanho uniforme ocorrendo simultaneamente nos pulmões ou fígado, baço e rins. Em indivíduos resistentes, os macrófagos capazes de inibir a multiplicação dos bacilos se acumulam em grande quantidade em torno do centro caseoso, resultando em redução ou interrupção dos danos teciduais (Assis,

2001).

O quinto estágio é caracterizado pela liquefação do cáseo e formação de cavidade. O material liquefeito constitui-se em excelente meio para proliferação dos bacilos que se multiplicam extracelularmente. As paredes de brônquios adjacentes se tornam necróticas, formando uma cavidade que ao se romper, descarrega bacilos e material caseoso liquefeito, atingindo outras regiões do pulmão. Ao tossir, falar ou espirrar, o doente dissemina este material infeccioso para o meio externo. A ruptura de vasos localizados na parede ou lúmen da cavidade é a causa mais comum da hemoptise, presente em estágios avançados da doença (Assis, 2001).

2.1.3. Tratamento e profilaxia

2.1.3.1. BCG e quimioprofilaxia

As medidas de caráter profilático incluem a vacinação e a quimioprofilaxia, sendo a segregação do paciente recomendada apenas em casos severos por curtos períodos.

A vacina BCG, sigla para Bacilo de Calmette-Guérin, é produzida a partir de subcepas vivas e atenuadas derivadas de *Mycobactenum bovis*. Parte integrante de Programas Nacionais de Controle, a vacina confere imunidade a indivíduos não infectados, diminuindo o risco de desenvolvimento da doença ao estimular resposta imunológica mais rápida e intensa à infecção pelo bacilo. A imunidade conferida pela vacina, porém, é de caráter temporário e variável de 70 a 80% (Assis, 2001).

No Brasil, a vacinação é obrigatória para crianças menores de 1 ano

é prioritariamente indicada para crianças de 0 a 4 anos. As recomendações de vacinação abrangem recém-nascidos que tenham peso igual ou superior a 2 Kg, mesmo HIV positivos, desde que não apresentem sintomas da síndrome, bem como para trabalhadores da área de saúde em contato com possíveis infectantes. A revacinacão deve ser realizada para todas as crianças por volta de 6 anos de idade.

A quimioprofilaxia visa a prevenção do desenvolvimento de tuberculose pela administração de quimioterápicos à indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* que não desenvolveram a doença, e à indivíduos sob alto risco de contágio. Além dos beneficios diretos pela proteção individual, a grande importância da quimioprofilaxia está na interrupção da propagação do bacilo a partir de doente bacilífero. A isoniazida tem sido recomendada para este procedimento devido à sua comprovada capacidade de reduzir o desenvolvimento da doença.

O esquema quimioprofilático recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose consiste na administração diária de isoniazida na dosagem de 10 mg/ Kg de peso, com dosagem máxima de 400 mg, por período de 6 meses. O tratamento é indicado para comunicantes intradomiciliares de bacilíferos, adultos e menores de 5 anos ainda não vacinados, recém-nascidos coabitantes de foco bacilífero, comunicantes soropositivos para HIV ou imunodeprimidos (Assis, 2001).

2.1.3.2. Quimioterápicos

A quimioterapia para doenças micobacterianas foi iniciada em 1944 quando pela primeira vez administrou-se estreptomicina, com resultados notáveis, a um paciente com tuberculose pulmonar progressiva, que não respondia aos meios curativos disponíveis na época. Até então, os

procedimentos adotados visando a cura da doença eram baseados em isolamento, repouso do paciente, dieta reforçada, ar puro e em casos muito avançados, procedimentos cirúrgicos, como a toracoplastia (Assis, 2001).

O advento da quimioterapia inaugurou uma nova era no tratamento da tuberculose, reduzindo dramaticamente as taxas de morbi-mortalidade e dando fim ao prolongado período de tratamento que, por vezes, se estendia por toda vida do doente.

O objetivo da quimioterapia é erradicar os bacilos nos vários ambientes onde se encontram no organismo do hospedeiro. A maior carga bacilífera é representada pelos bacilos extracelulares que se multiplicam nas paredes das cavidades e meio líquido necrótico. Mas, ainda se faz necessário combater os bacilos extracelulares, de crescimento lento, encontrado em material caseoso e bacilos de crescimento lento encontrados no interior dos macrófagos. Os bacilos em estado latente não podem ser atacados, pela quimioterapia convencional, até que iniciem processo de multiplicação (Assis, 2001).

Esta necessidade de combater o bacilo da tuberculose em diferentes ambientes, em parte, explica a utilização de mais de um fármaco no tratamento da tuberculose, uma vez que cada um deles tem um espectro de ação específico, porém a razão principal consiste na prevenção da emergência de cepas resistentes a um ou mais fármacos, pois a ação combinada de dois ou mais destes agentes resulta em rápida destruição dos bacilos em seus vários estágios evolutivos.

Os fármacos correntemente utilizados no tratamento da tuberculose (TB) são divididos em dois grupos de acordo com a eficácia e toxicidade apresentada. Os fármacos de primeira linha, ou também chamados fármacos de escolha são a isoniazida, a rifampicina, a pirazinamida, a estreptomicina e o etambutol. O grupo de fármacos de segunda linha é

formado por etionamida, ácido p-amino-salicílico, canamicina, amicacina, ciclosserina, capreomicina, tioacetazona e ofloxacino (Assis, 2001).

A isoniazida (INH), principal fármaco do arsenal antituberculose, surgiu da observação de atividade antimicobacteriana da nicotinamida e subsequente avaliação de seus análogos. Seu mecanismo de ação não está completamente esclarecido, porém sabe-se que envolve a inibição da síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular do bacilo. Outros mecanismos de ação foram propostos, incluindo a ação como antimetabólito para NAD ou piridoxal fosfato.A INH é um bactericida efetivo contra bacilos em crescimento do complexo *M. tuberculosis*, tendo atividade variável *in vitro* contra micobactérias não causadoras de tuberculose e nenhuma atividade contra *M. Avium*.

A isoniazida é bem absorvida, atingindo concentrações plasmáticas entre 3 e 5 μg/ml de 1 a 2 horas após uma dose oral de 300 mg. É metabolizada pelo figado a acetilhidrazida, ácido nicotínico e isonicotinil glicina. Aproximadamente 75 a 95% da dose administrada é excretada na urina após 24 horas, como INH e seus metabólitos. O efeito adverso mais comum é a neuropatia periférica, causada pelo aumento da excreção de piridoxina (Vitamina B6) induzida peta INH (Assis, 2001).

A pirazinamida (PZA) também é um análogo da nicotinamida cujo mecanismo de ação não é conhecido. Possui espectro restrito de ação, apresentando atividade bacteriostática contra *M. tuberculosis* porém, é inativa contra *M bovis*. A importância da utilização de pirazinamida reside em sua capacidade de destruir bacilos no interior dos monócitos. Estudos sugerem que PZA seja um pró-fármaco do ácido pirazinóico, sendo este último responsável pela atividade. A maior importância do emprego de PZA está em sua aplicação em terapias de curto prazo, complementando a atividade da isoniazida e rifampicina. Os efeitos adversos mais comuns estão relacionados à hepatotoxicidade e hiperuricemia.

A rifampicina (RMP), sintetizada pela primeira vez em 1965, é resultante de modificações moleculares efetuadas em compostos com atividade antimicrobiana, as rifamincinas. É um fármaco bactericida importante no tratamento de doenças causadas por micobactérias em geral, apresentando boa atividade contra *M. tuberculosis* intra e extracelular, atividade mediana contra o complexo *M. avium* e baixa atividade contra *M. Fortuitum.* O mecanismo de ação da RMP parece ser a inibição de β-subunidade de RNA polimerase DNA-dependente. De grande importância para o desenvolvimento dos regimes de curta duração, combinado à isoniazida, permitiu a redução do tratamento de 18-24 meses para 6-9 meses. A rifampicina é metabolizada no fígado por deacetilação, sendo o metabólito eliminado na urina. A administração de doses elevadas, acima de 15 mg/ Kg, tem sido associada à ocorrência de anemia, falha renal aguda e leucopenia (Assis, 2001).

Antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a estreptomicina (SM) tem atividade bactericida contra micobactérias extracelulares. O mecanismo de ação parece ser a inibição de síntese protéica por ligar-se á subunidade 30 S ribossômica. O que resulta em danos à membrana do bacilo. É administrada por via parenteral por ser escassamente absorvida a partir do intestino. Distribui-se amplamente pelos fluidos orgânicos, acumulando-se nos tecidos, com liberação lenta. Entre os efeitos adversos, pode causar dano ao oitavo nervo craniano, nefropatia e ototoxicidade.

O etambutol (EMB) é um tuberculostático desenvolvido a partir de um programa de *screening* no qual vários análogos de N, N'-diisopropil-etilenodiamina foram sintetizados e testados, resultando o etambutol como o composto mais ativo. Quase todas as cepas de *M. tuberculosis* e *M. kankansasii,* e muitas cepas do complexo *M. avium* são sensíveis a este fármaco e a importância de seu emprego reside em sua capacidade de suprimir o crescimento da maioria dos bacilos resistentes à isoniazida e estreptomicina. Embora o mecanismo de ação não esteja completamente

esclarecido, EMB parece inibir a incorporação de ácido micólico na parede celular micobacteriana. A dose usual de 15 mg/Kg é bem tolerada, com raros relatos de neurite retrobulbar, seu mais importante efeito adverso, que está relacionado à dose e duração da terapia. A acuidade visual deve ser acompanhada durante o decorrer do tratamento.

A etionamida (ETH), derivado da α-etiltioisonicotinamida, parece atuar inibindo a síntese protéica pelo bloqueio de aminoácidos que contém enxofre, inibindo a síntese de ácidos micólicos. Apesar de apresentar apenas 10% da atividade da INH, sua toxicidade é 15 vezes menor. Os efeitos colaterais mais freqüentemente observados são anorexia, vômitos e desconforto gastrintestinal (Assis, 2001).

A canamicina (KN) e a amicacina são aminoglicosídeos, portanto, apresentam o mesmo mecanismo de ação da estreptomicina. A KN apresenta atividade inferior à SM e tem sido usada na terapia da tuberculose em combinação com outros fármacos. A amicacina apresenta atividade superior à KN e semelhante à SM, porém não é utitizada no tratamento inicial principatmente devido a seu custo elevado, sendo indicada no tratamento de tuberculose resistente.

A ciclosserina (CS) é um análogo da D-alanina que atua pelo bloqueio da alanina racemase e D-alanina sintetase, o que resulta em inibição da síntese da parede micobacteriana. Doses elevadas do fármaco podem causar sintomas relacionados ao sistema nervoso central, como sonolência, dores de cabeça, letargia e depressão entre outros.

A capreomicina (CM) é um polipeptídeo bacteriostático obtido a partir do *Streptomyces capreolus*, cujo mecanismo de ação, ainda desconhecido, parece estar relacionado com a inibição de síntese de proteínas. Devido à pequena absorção intestinal é administrada por via intramuscular e sua distribuição no organismo ainda não é conhecida. Alguns dos efeitos

adversos relatados são ototoxicidade, nefrotoxicidade e eosinofilia.

A tioacetazona (TZA) é uma tiosemicarbazona de baixa atividade anti-micobacteriana, porém indicada para utilização com isoniazida e estreptomicina por não apresentar resistência cruzada em relação a estes fármacos. Seu uso clínico apresenta limitações devido á sérios efeitos adversos quando de sua administração, como perturbações gastrointestinais e anemia. Seu mecanismo de ação é desconhecido.

O ácido p-aminossalicílico (PAS) é um agente fracamente bactericida que recebeu renovado interesse devido ao surgimento de TB resistente. Seu mecanismo de ação está relacionado com a sintese de tetraidrofolato e ao transporte de ferro. Sua atividade se aplica apenas contra *M. tuberculosis* em crescimento, sendo inativo contra bacilos intracelulares e não apresenta atividade contra a maioria das demais micobactérias. Atualmente é usado em combinação a outros agentes mais potentes para aumentar sua eficácia e impedir ou retardar o surgimento de resistência.

O ofloxacino é um antimicrobiano da classe das quinolonas, que atua por inibição da DNA girase. Em geral é bem tolerado, podendo apresentar efeitos colaterais como náuseas, diarréia e dor abdominal em até 10% dos pacientes. O ofloxacino tem sido incluído como parte de regimes multidroga para tratamento de infecções em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Assis, 2001).

2.1.3.3. Esquemas de tratamento

Em linhas gerais, o tratamento da tuberculose é dividido em duas fases uma fase intensiva ou de ataque, durante a qual o objetivo é destruir a

população de bacilos que estão se multiplicando, e uma fase de manutenção ou continuação, que visa destruir os bacilos que se encontram em estado latente e aqueles não atingidos pela primeira fase. Um número maior de fármacos é usado na primeira fase, que pode variar de 1 a 2 meses, do que na fase de manutenção, cuja duração varia de 4 a 10 meses. Nos regimes para tratamento de casos novos são empregados fármacos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Em alguns países subdesenvolvidos emprega-se a tioacetazona por seu baixo custo.

Os regimes de tratamento de TB são expressos utilizando-se um código padrão composto de números e letras, onde os números indicam a duração do tratamento, em meses, e as letras representam o fármaco utilizado a saber: H para isoniazida, T para tioacetazona, R para rifampicina, S para estreptomicina. E para etambutol e Z para pirazinamida. Um número subscrito após a letra que designa o fármaco indica o número de vezes por semana em que este deve ser administrado (Quadro 01). Na década de 60, o regime padrão, 2STH/10-16TH, utilizado em muitos programas nacionais de controle, demandava de 12 a 18 meses de tratamento. Este prazo foi reduzido para 6 meses em 1993, com o regime de curta duração 2HRZE/4HR, recomendado pela OMS e "American Thoracic Society". Apesar dos custos elevados dos fármacos utilizados nos regimes de curta duração comparados ao aplicado anteriormente, a sua adoção resultou em benefícios evidentes, índices de cura mais elevados, maior aderência do paciente ao tratamento e notável redução do surgimento de resistência micobacteriana. Além destas vantagens, a quimioterapia de curto prazo demonstrou melhor relação custo-benefício.

Existem várias combinações de fármacos para elaborar diferentes regimes adequados ao orçamento e sistema de saúde de cada país. O Quadro 01 mostra possíveis alternativas de regimes para cada categoria de tratamento recomendada pela OMS. Em situações especiais os esquemas descritos no quadro não se aplicam, sendo necessária prescrição

individualizada (FUNASA, 2003).

Quadro 01 - Esquemas quimioterápicos alternativos para cada categoria de tratamento. Fonte: Funasa, 2003.

CATEGORIA	DESCRIÇÃO	REGIMES ALTERNATIVOS	
		Fase inicial (diário ou 3 vezes por semana)	Fase de manutenção
I	Bacilífero positivo novo; Bacilífero-negativo com envolvimento parenquimal extensivo; Novos casos de formas severas de TB extra-pulmonar	2 EHRZ (SHRZ) 2 EHRZ (SHRZ) 2 EHRZ (SHRZ)	6 HE 4 HR 4 H_3R_3
II	Bacilífero com retomo após abandono; Falência do tratamento; Tratamento após interrupção	2 SHRZE/1 HRZE 2 SHRZE/1 HRZE	5 $H_3R_3E_3$ 5 HRE
III	Bacilífero negativo em categoria diferente de I; Formas menos severas de TB extra-pulmonar.	2 HRZ 2 HRZ 2 HRZ	6 HE 4 HR 4 H_3H_3

IV	Caso crônico/resistência (ainda bacilífero após re-tratamento)	Não aplicável. Procurar normas de procedimento da OMS para uso de drogas de segunda linha em centros especializados	

Legenda: H para isoniazida, T para tioacetazona, R para rifampicina, S para estreptomicina, E para etambutol e Z para pirazinamida. Um número subscrito após a letra que designa o fármaco indica o número de vezes por semana em que este deve ser administrado.

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento da TB é de uso seguro para mulheres grávidas, com exceção da estreptomicina que é ototóxica para o feto e pode ser substituida por etambutol. Durante a amamentação a mãe deve continuar o tratamento, sem risco para o bebê, como forma de prevenir a transmissão do bacilo. O bebê deve receber tratamento profilático com isoniazida e imunização com BCG. Mulheres que fazem uso de contraceptivos orais correm o risco de ter reduzido a proteção contra a gravidez caso sejam tratadas com rifampicina. Nesta situação, o contraceptivo deve ser substituído por outro com maior teor em estrogênio ou usar outra forma de contracepção (Assis, 2001). No Brasil, o tratamento é desenvolvido em regime ambulatorial, sendo admitida hospitalização apenas em casos de meningite tuberculosa, indicações cirúrgicas, complicações graves ou quando o estado geral do doente não permite tratamento em ambulatório. Em todos os esquemas adotados no Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde, a medicação deve ser administrada diariamente. O Quadro 02 apresenta os esquemas adotados de acordo com as possíveis situações de tratamento. Os Quadros 03, 04, 05 e 06 descrevem os esquemas citados (FUNASA, 2003).

Quadro 02 - Esquemas de tratamento segundo a situação do caso. Fonte: COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA - FNS – MS, 1995.

SITUAÇÃO	ESQUEMA INDICADO
Sem tratamento anterior[a]	I
Com tratamento anterior: Recidivante do Esquema I	IR
Retorno após abandono do Esquema I	
Meningite tuberculosa	II
Falência dos Esquemas I ou IR[b]	III

[a]Considera-se **sem tratamento** os pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia antituberculosa ou o fizeram por menos de 30 dias. [b]Entende-se por **falência** a persistência da positividade na baciloscopia no escarro ao final do tratamento.

Quadro 03 - Esquema I - 2RHZ/4RH. Fonte: COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA — FNS —MS, 1995.

		PESO DO DOENTE			
FASES DO TRATAMENTO	**DROGAS**	**ATÉ 20 Kg (mg/Kg/dia)**	**20 A 35 (mg/dia)**	**35 A 45 (mg/dia)**	**MAIS DE 45Kg (mg/dia)**
1ª FASE (2meses)	R	10	300	450	600
	Z	10	200	300	400
	H	35	1000	1500	2000
2ªFASE (4meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

Legenda: H para isoniazida, R para rifampicina e Z para pirazinamida.

Quadro 04 - Esquema IR - 2RHZE/4RHE. Fonte: COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA-FNS-MS, 1995.

		PESO DO DOENTE			
FASES DO TRATAMENTO	**DROGAS**	**ATÉ 20 Kg (mg/Kg/dia)**	**20 A 35 (mg/dia)**	**35 A 45 (mg/dia)**	**MAIS DE 45Kg (mg/dia)**
1ª FASE (2meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
	E	25	600	800	1200
2ªFASE (4meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1200

Legenda: H para isoniazida, R para rifampicina, E para etambutol e Z para pirazinamida.

Quadro 05 - Esquema II - 2RHZ/7RH. Fonte: COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA - FNS -MS, 1995.

FASES DO TRATAMENTO	**DROGAS**	**mg/ kg de peso/ dia**	**DOSE MÁXIMA (mg)**
1ª FASE (2meses)	R	20	600
	H	20	400
	Z	35	2000
2ªFASE (7meses)	R	10 a 20	600
	H	10 a 20	400

Legenda: H para isoniazida, R para rifampicina e Z para pirazinamida.

Quadro 06 - Esquema III - 3SEtEZ/9EtE[a]. Fonte: COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA - FNS –MS, 1995.

		PESO DO DOENTE			
FASES DO TRATAMENTO	**DROGAS**	**ATÉ 20 Kg (mg/Kg/dia)**	**20 A 35 (mg/dia)**	**35 A 45 (mg/dia)**	**MAIS DE 45Kg (mg/dia)**
1ª FASE (3meses)	S	20	500	1000	1000
	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200
	Z	35	1000	1500	2000
2ªFASE (9meses)	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200

Legenda: S para estreptomicina, E para etambutol, Et para etionamida e Z para pirazinamida.

O controle do tratamento consiste na aplicação de meios que permitam o acompanhamento da evolução da doença e utilização correta dos fármacos. Faz-se necessária realização de baciloscopia de controle, acompanhamento clínico periódico e monitorização da entrega e uso dos medicamentos.

Em 1993, o Programa Global para Tuberculose (GTB) da OMS, iniciou a divulgação de uma estratégia de detecção e cura que se tornou a base da maioria dos planos de controle de vários países. Denominada DOTS (Directly Observed Treatment Short-course), a estratégia combina cinco elementos: compromisso político, serviços de microscopia, provimento de fármacos, sistemas de monitoramento e observação direta do tratamento. O GTB tem provido as informações necessárias, tais como diretrizes técnicas e material de treinamento para divulgação e implantação da estratégia DOTS, fornecendo assistência para mais de 60 países.

Em 1998, o Ministério da Saúde declarou a tuberculose como problema de saúde prioritário no Brasil, implantando a estratégia DOTS em projeto piloto na Região Centro-Oeste. A adesão ao projeto tem sido encorajada através de incentivos financeiros com reembolso aos Estados pelas baciloscopias realizadas e por cada paciente curado (Assis, 2001).

Apesar de haver drogas eficientes para o combate à tuberculose, a vacinação representa ainda a melhor alternativa para a proteção contra essa doença. A vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), uma vacina viva baseada em *Mycobacterium bovis* atenuado foi introduzida para uso humano em 1921. Embora venha sendo amplamente utilizada, sua eficácia permanece controversa. Tem sido demonstrado por meio de estudos clínicos, que o nível de proteção alcançado em diferentes populações varia de 0 a 75% além disso, a utilização de uma importante ferramenta de diagnóstico, o teste de hipersensibilidade cutânea, é dificultado em indivíduos que foram vacinados com BCG.

No que concerne à segurança da BCG, existe uma preocupação crescente no uso de organismos vivos em indivíduos imunocomprometidos, fato especialmente agravante se considerarmos que no caso da tuberculose a co-infecção pelo HIV têm-se tornado cada vez mais comum. Por todos os motivos acima expostos, a procura por uma alternativa de imunização mais eficaz tem levado a investimentos no desenvolvimento de uma nova vacina contra a tuberculose.

2.1.4. Epidemiologia e resistência

2.1.4.1. Aspectos mundiais

A tuberculose é atualmente, um sério problema de saúde pública em escala global. No âmbito das doenças infecciosas é a principal causadora de

mortes de jovens e adultos: uma em cada quatro mortes evitáveis é atribuida à tuberculose. Estima-se que cerca de um terço da população mundial, aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas, esteja infectado com o *M. tuberculosis,* a grande maioria residindo em países em desenvolvimento (World Health Organization, 1998; World Health Organization, 1999).

Segundo dados da OMS, no ano de 1998, foram notificados 3.617.045 casos (61 por 100.000 pessoas) em todo o mundo, o que representa aumento de 7% em relação ao ano anterior. Este número representa apenas 45% dos 8,08 milhões de casos estimados. Deste total, 77% dos casos ocorrem em um grupo de 22 países acompanhados pela OMS com prioridade, devido às elevadas taxas de incidência e mortalidade, do qual o Brasil faz parte, na 13ª colocação, em número absoluto de casos estimados (124.000) e na 22ª colocação em números relativos, 74,7 por 100.00 habitantes. A Índia é o país com maior incidência absoluta, com 1.828.000 casos, seguida de China, Indonésia e Bangladesh. O Zimbabwe aparece como o país de maior incidência relativa, 560,1 casos por 100.000 habitantes

Associada à pobreza e negligência por parte dos órgãos de saúde, a tuberculose prevalece em países subdesenvolvidos. São oriundos destes países 95% dos casos notificados à OMS e, 98% das mortes. Como agravante 75% dos casos ocorrem em população economicamente ativa, entre 15 e 45 anos, alimentando vínculo entre a pobreza e a doença (World Health Organization, 2000).

Como principais fatores contribuintes para o crescimento alarmante dos índices epidemiológicos pode-se citar o movimento migratório de pessoas para regiões de alta incidência e prevalência, programas ineficientes de controle da doença, surgimento de cepas resistentes à um ou mais fármacos antimicobacterianos e principalmente, a combinação letal entre tuberculose e AIDS (Raviglione, 1997).

O efeito da migração se faz sentir particularmente em países industrializados, causando elevação no número de casos, especialmente entre minorias étnicas e raciais. De todos os casos notificados nos Estados Unidos em 1996, 37% ocorreram em indivíduos nascidos em outros países. Em países como Dinamarca, Suécia, Suíça e Nova Zelândia este número ultrapassa 50% (World Health Organization, 2000).

A chave para o controle da tuberculose está na rápida detecção e cura de casos infecciosos. Para que estas medidas sejam efetivas, faz-se necessária a elaboração e implantação de planos nacionais de controle da doença, estabelecendo estratégias e diretrizes que proporcionem métodos eficazes de diagnóstico, registro de índices estatísticos, esquemas terapêuticos adequados e aplicação de medidas profiláticas. Em muitos países, a concepção errônea do controle sobre a doença associada à programas inconsistentes tem resultado em baixos índices de cura, reincidência e o mais alarmante, o surgimento de resistência aos agentes quimioterápicos usualmente empregados (World Health Organization, 1998).

Nas últimas décadas, o crescente emprego de agentes antimicrobianos e, principalmente, seu uso inadequado, resultaram em desenvolvimento de microorganismos resistentes aos principais anti-micobacterianos em uso, isoniazida, rifampicina, pirazinamida, streptomicina e etambutol (World Health Organization, 1998). A resistência representa assustadora ameaça pois, são poucos os fármacos disponíveis no arsenal terapêutico e em particular, a propagação de cepas resistentes aos dois mais importantes fármacos, isoniazida e rifampicina, pode resultar em agravamento do quadro epidemiológico e falência dos atuais esquemas de controle (Bloom, 1994).

A resistência em microrganismos ocorre naturalmente pelo surgimento de mutantes durante o processo de multiplicação, independente da interação com antibióticos. A exposição de *M. tuberculosis* a um único

agente antimicobacteriano resulta em seleção, por eliminar ou suprimir os microrganismos susceptíveis, permanecendo vivos os bacilos resistentes (Figura 03). Neste contexto, a resistência pode ser classificada como primária, quando ocorre em pacientes que nunca receberam tratamento ou secundária, também chamada de adquirida, quando após exposição ao agente antimicobacteriano, o bacilo resistente é selecionado (Goble, 1994).

A ocorrência espontânea de tuberculose multi-resistente (MDR), definida como resistente à isoniazida e rifampicina, com ou sem resistência à outras drogas, é extremamente improvável, visto que a probabilidade de mutações que resultem em resistência simultânea à isoniazida e rifampicina é o produto das probabilidades individuais ou seja 1 em 10 (as probabilidades para surgimento de resistência para isoniazida e rifampicina foram estimadas em 10^6 e 10^8, respectivamente). Portanto a emergência de MDR-TB está inequivocamente relacionada ao emprego inadequado de fármacos antimicobacterianos (Raviglione, 1997).

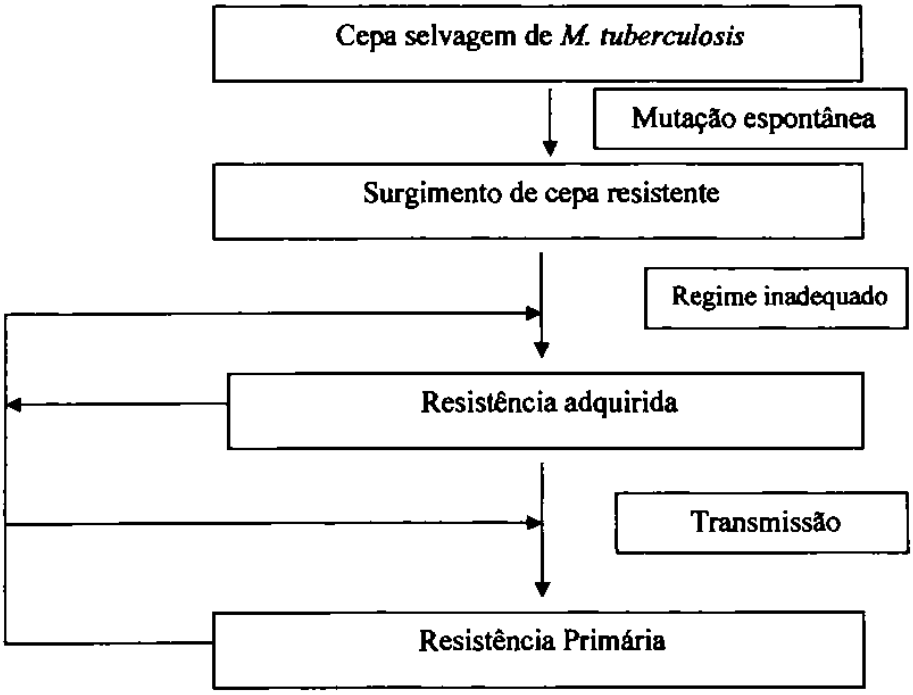

Figura 03 – Fluxograma que leva à resistência - desenvolvimento e propagação de bacilos resistentes. Fonte: ASSIS, 2001.

Sob a perspectiva mundial, a prevalência média entre novos casos de tuberculose é de 10% de resistência à uma única droga e de 1,4% para MDR. Em países como Argentina e República Dominicana a prevalência para MDR-TB ultrapassa 4,5%, índice considerado alarmante pela OMS (vide Figura 04) (World Health Organization, 1998).

A assustadora elevação na ocorrência de MDR tem sido associada à aplicação de regimes terapêuticos não padronizados ou inadequadamente conduzidos, a incapacidade de manutenção de um suprimento regular de medicamentos, levando à interrupção do tratamento, à utilização de medicamentos de qualidade insatisfatória e à associação com a também crescente epidemia de AIDS (Iseman, 1993).

A ocorrência de tuberculose entre portadores do vírus HIV tomou-se uma epidemia dentro de uma pandemia, que tem causado aumentos notáveis na incidência de tuberculose em muitos países. Devido a sua capacidade de debilitação do sistema imunológico do hospedeiro, o HIV tem sido considerado como o mais importante fator de risco para desenvolvimento da doença (Snider *et. al.*, 1994). Indivíduos HIV-positivos têm probabilidade de adoecer de tuberculose aumentada em 30 vezes em relação a um indivíduo não-portador. Cerca de um terço do aumento na incidência de TB nos últimos seis anos pode ser atribuído ao HIV. Ao final desta década haverão 1,5 milhões de casos de tuberculose ocorrendo por associação com a AIDS (Snider *et. al.*, 1994).

Em 1996, cerca de 22 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV, 90% residindo em países em desenvolvimento onde ocorrem 98% das mortes causadas por TB. Estimativas prevêem a existência de mais de 9,5 milhões de pessoas duplamente infectadas, 70% destas na região sub-Sahariana da África. O risco anual de evolução da infecção latente para tuberculose ativa é de 5 a 10% para indivíduos portadores dos agentes etiológicos para TB e AIDS, estes mesmos percentuais são aplicados a um

período correspondente à expectativa de vida de um indivíduo não infectado por HIV. As consequências deste risco elevado são evidentes, quando se observam os números relativos à incidência de TB em vários países africanos onde, após anos de declínio, o número de casos relatados se elevou dramaticamente. (Narain *et. al.*, 1992).

Percebe-se então, a extrema necessidade de se desenvolver melhores estratégias de combate e prevenção para a tuberculose afim de se agilizar e aumentar a penetração do tratamento, aliada à redução de efeitos adversos, possibilitando uma maior adesão e bem-estar para o paciente, com conseqüente diminuição da resistência (Fig.04) (Ministério da Saúde, 1995).

Vindo de encontro à esta necessidade, temos o desenvolvimento de formas de liberação modificada, que têm os lipossomas como um de seus principais representantes. Embora a produção de lipossomas em larga escala seja ainda um processo caro, acreditamos que esta é justificada, devida sua alta capacidade de penetração e especificidade, o que tornaria o tratamento da tuberculose mais efetivo, rápido e de baixa toxidade reduzindo-se assim, taxa de abandono, resistência (tanto primária, secundária e multiresistente - MDR) e conseqüentemente custos, relativos a ações de tratamento e possíveis complicações devido longo período, interrupções de tratamento e rescindivas, sem falar em estarmos afastando o risco crescente e perigoso da expansão da tuberculose MDR.

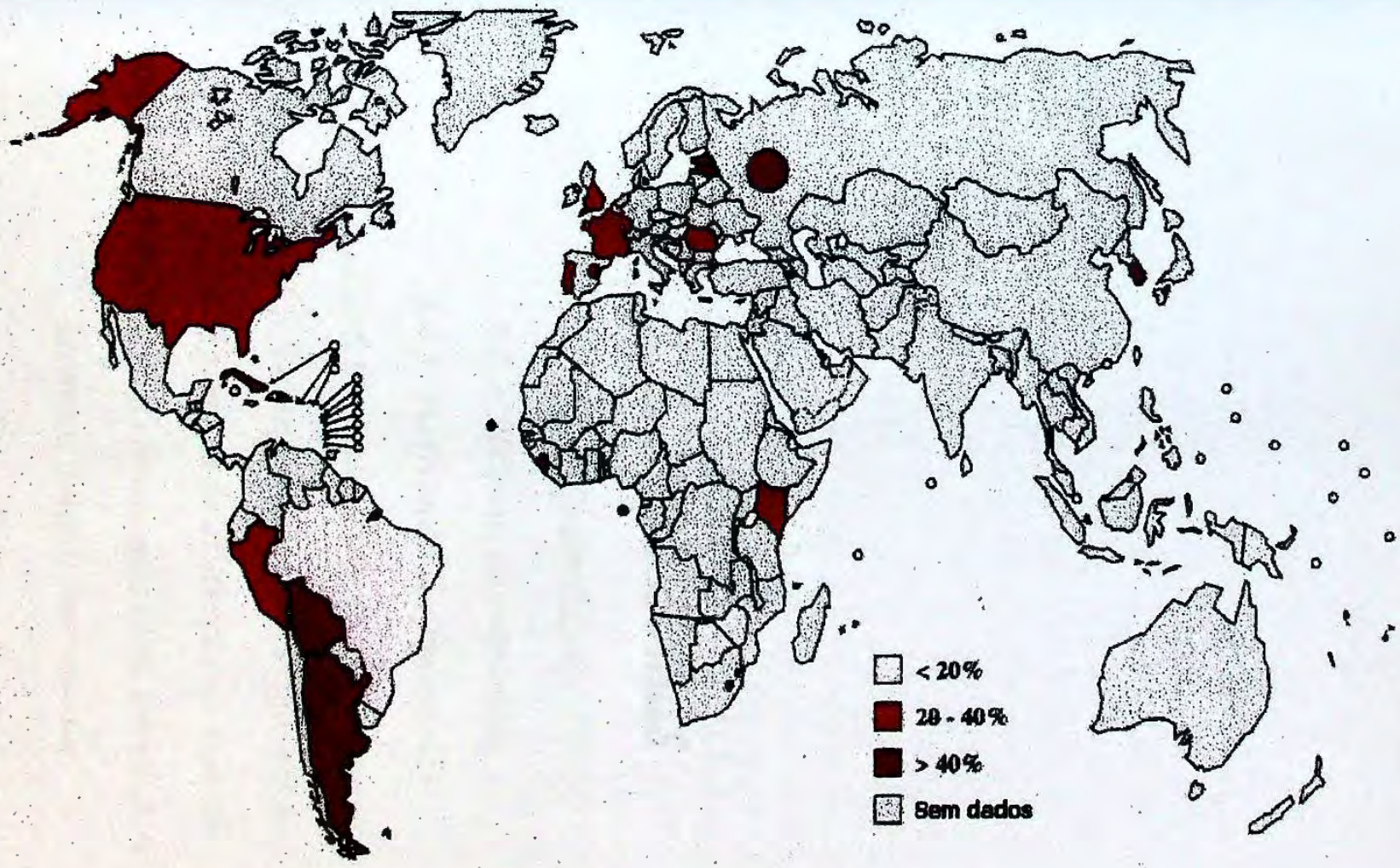

Figura 04 - Prevalência mundial de resistência adquirida a fármacos antituberculose - 1994 a 1997
Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. WHO report 2000. Geneve, 2000, 187p.

2.2. Lipossomas

2.2.1. Generalidades

2.2.2. Métodos de preparação

2.2.3. Purificação dos lipossomas

2.2.4. Caracterização dos lipossomas

2.2.5. Vantagens do uso dos lipossomas

2.2.6. Exemplos de utilização no mercado

2.2.7. Utilização de lipossomas como transportadores de fármacos antimicobacterianos

2.2.1. Generalidades

Os chamados ***vetores medicamentosos*** são um dos mais modernos representantes dos medicamentos de liberação prolongada. Dentre estes vetores, podemos citar como exemplos os lipossomas. Lipossomas são estruturas vesiculares e microscópicas, formadas basicamente por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. Devido suas propriedades anfifílicas, os lipossomas podem incorporar substâncias tanto no compartimento aquoso como na bicamada lipídica. Eles são formados espontaneamente, quando lipídios anfifílicos são dispersos em água. Os componentes formadores dos lipossomas 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. Eles possuem inúmeras vantagens, em relação à outras formas farmacêuticas, entre as quais podemos ressaltar a sua grande especificidade, o que possibilita o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários. Como conseguem atingir um alvo bem determinado, até mesmo receptores celulares específicos, os vetores medicamentosos tornam-se bem menos tóxicos e necessita de posologia menor para realizarem o mesmo efeito terapêutico o que leva também, a uma diminuição drástica no tempo total do tratamento (Puisieux *et. al.*, 1988).

A primeira descrição sobre os lipossomas foi feita pelo cientista britânico Alec Bangham, na década de 1960 e desde então, eles têm sido usados como carreadores de fármacos em uma série de aplicações farmacêuticas. Várias formulações envolvendo lipossomas e fármacos convencionais como a anfotericina B e a doxorrubicina assim, como proteínas, oligonucleotídeos e genes encontram-se atualmente em estágios avançados de desenvolvimento, sendo que alguns dos quais já estão sendo comercializados. Os numerosos estudos pré-clínicos e clínicos mostram que,

quando veiculados em lipossomas, os fármacos exibem toxicidade reduzidas a tecidos normais, enquanto retém ou melhoram a sua eficácia. Sistemas liposssomais com materiais fusogênicos (Ex.: polietilenoglicol), atualmente em desenvolvimento, têm o potencial de liberar fármacos intracelularmente melhorando e muito a sua atividade terapêutica.

Os lipossomas podem ter em sua composição várias combinações lipídicas que resultam em diversas propriedades relacionadas com estabilidade em diferentes temperaturas; grau de rigidez de suas camadas e carga de superfície das vesículas formadas. Além disso, podem ser produzidos em uma vasta gama de tamanhos (Quadro 07) e, terem a sua superfície modificada de modo a permitir o direcionamento específico e a liberação controlada do material encapsulado. Tais características devem ser consideradas, de acordo com a aplicação desejada, e a escolha das partículas é capaz de garantir em grande parte, o sucesso esperado. De uma maneira geral, o desenvolvimento de lipossomas como veículo eficiente para liberação sistêmica de fármacos implica na correta escolha dos compostos lipídicos que irão compô-lo e de quais características (presença de carga na sua superfície ou não; maior ou menor fluidez; presença de promotores de especificidade, como enzimas etc) lhe serão adequadas tanto em relação ao fármaco que irá transportar quanto o sítio de ação que irá atingir.

Quadro 07 – Tamanhos de lipossomas. **SUV**- Small unilamellar vesicles, **LUV**- Large unilamellar vesicles, **MLV**- Multilamellar vesicles

	diâmetro *(nm)*	*Relação fármaco encapsulado/ qtd de lipídio usada na produção do lipossoma* (µl/mg *lipídio)*
SUV	20-50	0,5
LUV	200-1000	13,7
MLV	400-3500	4,1

Além da administração por via intravenosa, os lipossomas possuem flexibilidade de composição, de modo a permitir também, sua administração por todas as vias conhecidas. Na via pulmonar, por exemplo, podem ser usados lipossomas tanto convencionais como do tipo "stealth", com composição adequadas, produzindo diferentes taxas de liberação do material encapsulado.

Várias metodologias usando vários princípios físicos e bioquímicos vêm sendo propostos para examinar o desenvolvimento de sistemas com um grau terapêutico aceitável para alvos específicos (Prista *et. al.*, 1981).

Lipossomas vêm sendo extensivamente testados em animais. O maior desenvolvimento nos últimos anos, tem sido o desenvolvimento desses vetores com um prolongado tempo de circulação no sangue, comumente chamado lipossomas de circulação longa. Lipossomas contendo monosialogangliosídeo GM_1 (Lima, 1995), polietilenoglicol ou derivado de fosfatidiletanolamina não são rapidamente englobados por macrófagos do sistema retículo-endotelial e permanecem na circulação por muito mais tempo que os lipossomas ditos convencionais.

2.2.2. Métodos de preparação

2.2.2.1. Constituintes estruturais

Os lipossomas podem ser formados, a partir de vários fosfolipídeos: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina etc. O mais usado é a fosfatidilcolina, pura ou em combinação com colesterol (Pierri *et. al.*, 1999).

Fosfolipídeos: consistem de uma cadeia principal de glicerol, os glicerofosfolipídeos, com suas funções álcool esterificadas pelos ácidos

graxos que formam a porção hidrofóbica da molécula. A outra extremidade comporta um grupo polar, que constitui a "cabeça polar" do lipídio (geralmente um fosfato, no caso de fosfolipídeo). Os ácidos graxos são principalmente aqueles com 16 ou 18 carbonos, e podem possuir uma ou mais insaturações, não conjugadas. A fosfatidilcolina é a mais comumente utilizada conhecida também como lecitina de soja ou de ovo. A diferença entre elas é a proporção relativa dos ácidos graxos esterificantes, o que vai determinar um maior número de insaturações nas cadeias carbônicas da lecitina de soja (Weiner *et al*, 1989). Há também um número razoável de fosfolipídeos sintéticos disponíveis para a preparação de lipossomas dos quais o mais utilizado é o cloreto de dioctadecildimetil-amônio (DODAC) (Carmona-Ribeiro *et. al.*, 1983).

O fosfolípide mais abundante em plantas e animais é a fosfatidilcolina, a qual representa o principal constituinte estrutural da maioria das membranas biológicas. Por esta razão, os lipossomas de lecitina apresentam vantagens em relação aos de outros anfifílicos do ponto de vista biológico, principalmente para emprego farmacêutico.

Segundo Crommelin (1984), a adição de fosfolipídeos carregados negativa ou positivamente permite diminuir os fenômenos de agregação das vesículas, o que pode ser favorável para a estabilidade da preparação.

Diferenças na composição dos ácidos graxos da molécula podem alterar as características dos fosfolipídeos. Os ácidos graxos podem diferir no número de átomos de Carbono e no grau de insaturação.

Os fostolipídeos insaturados devem ser manipulados com precaução afim de diminuir os riscos de oxidação na presença do oxigênio do ar. Os fosfolipídeos devem ser conservados na sua forma sólida ou em solução, à -20^{0}C ou à -70^{0}C, em atmosfera de gás inerte. Os solventes mais utilizados para dissolver os fosfolipídeos são o clorofórmio ou uma mistura metanol/

clorofórmio (1:2, v/ v) (Fattal *et. al.*, 1993).

O grau de pureza dos fosfolipídeos utilizados para a preparação dos lipossomas deve ser elevado (superior a 99%), sendo que a lisofosfatidilcolina (liso PC) não deve estar presente. A presença de liso PC é resultante da hidrólise da função éster sobre o carbono da posição 1 ou 2 do glicerol, o que causa um aumento considerável da permeabilidade das membranas dos lipossomas.

Esteróides: são lipídios estruturais presentes nas membranas da maioria das células. Abundante nos tecidos animais, localizando-se primariamente nas membranas celulares (Lehninger *et. al.*, 1993).

Devido à estrutura de sua molécula e as suas propriedades de lipofilia, o colesterol orienta-se na bicamada lipídica entre as moléculas de fosfolipídeo com o grupo hidroxila dirigido para a fase aquosa e o anel tricíclico ancorado entre os carbonos das cadeias graxas. O resultado é um efeito de empacotamento de moléculas na bicamada (Fornés & Procópio, 1987).

Blume & Cevec (1990) relataram um experimento desenvolvido com diestearoilfosfatidilcolina e colesterol na proporção molar de 1 : 1. Os autores destacam a dificuldade extrema em preparar estas vesículas e também alertam para o risco potencial da administração de grandes quantidades de colesterol, principalmente a pacientes com alta predisposição à hipercolesterolemia.

Lipossomas sem colesterol interagem rapidamente com as proteínas plasmáticas (albumina, transferrina), que tendem a extrair os fosfolipídeos estruturais dos lipossomas, depletando a monocamada externa das vesículas, levando a uma instabilidade física da preparação (Weiner *et. al.*, 1989). Sua inclusão na parede dos lipossomas exercem 3 efeitos:

- Diminui a fluidez e aumenta a microviscosidade da bicamada.
- Diminui a permeabilidade da membrana a moléculas hidrossolúveis.
- Estabiliza a membrana na presença de fluídos biológicos, como o plasma.

2.2.2.1.1. Seleção de componentes

Não existe uma regra geral para a seleção dos componentes estruturais a serem empregados na formulação de lipossomas para uso farmacêutico. Cada produto formulado com lipossomas possui seus próprios requisitos de estabilidade, segurança e grau de pureza, desta forma uma grande variedade de lipídios, incluindo produtos naturais, semi-sintéticos e sintéticos com vários graus de pureza podem ser empregados não havendo recomendações estritas. Assim fica claro que a escolha das matérias-primas depende da intenção de uso e do tipo de preparação que se pretende obter (Maierhofer, 1988).

Ao se preparar lipossomas é indispensável fixar um certo número de parâmetros tais como: a razão molar dos diferentes constituintes lipídicos, a concentração final de lipídios na suspensão, bem como o volume da suspensão (por exemplo: fosfatidilcolina de gema de ovo/ colesterol/ fosfatidilglicerol, razão molar 7/ 2/ 1, 20 mM, 2 mL). Tais parâmetros permitem calcular as quantidades de cada um dos componentes a serem utilizados para a preparação (Figura 05).

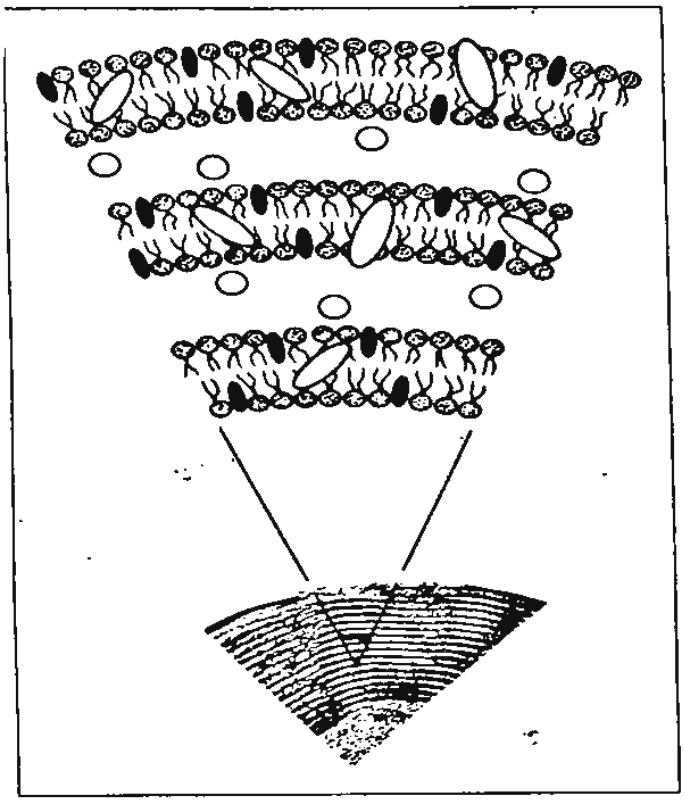

Figura 05 – Esquema mostrando a estrutura interna de um lipossoma multilamelar. ○ fosfolipídeos ⬭ fármaco lipossolúvel; ● colesterol; ○ fármaco hidrossolúvel. Fonte: GREGORIADIS, 1995.

Todos os métodos empregados na preparação dos lipossomas envolvem algumas etapas comuns (Figura 06):

- Dissolução dos lipídios em um solvente orgânico.
- Evaporação do solvente orgânico.
- Dispersão dos lipídios secos em uma solução aquosa.
- Dissolução da substância a encapsular na solução orgânica ou na solução aquosa, em função do seu equilíbrio hidrófilo/ lipófilo.
- Eliminação das substâncias não encapsuladas através de técnicas de separação (filtração em gel, diálise, centrifugação).

- Análise do produto final.

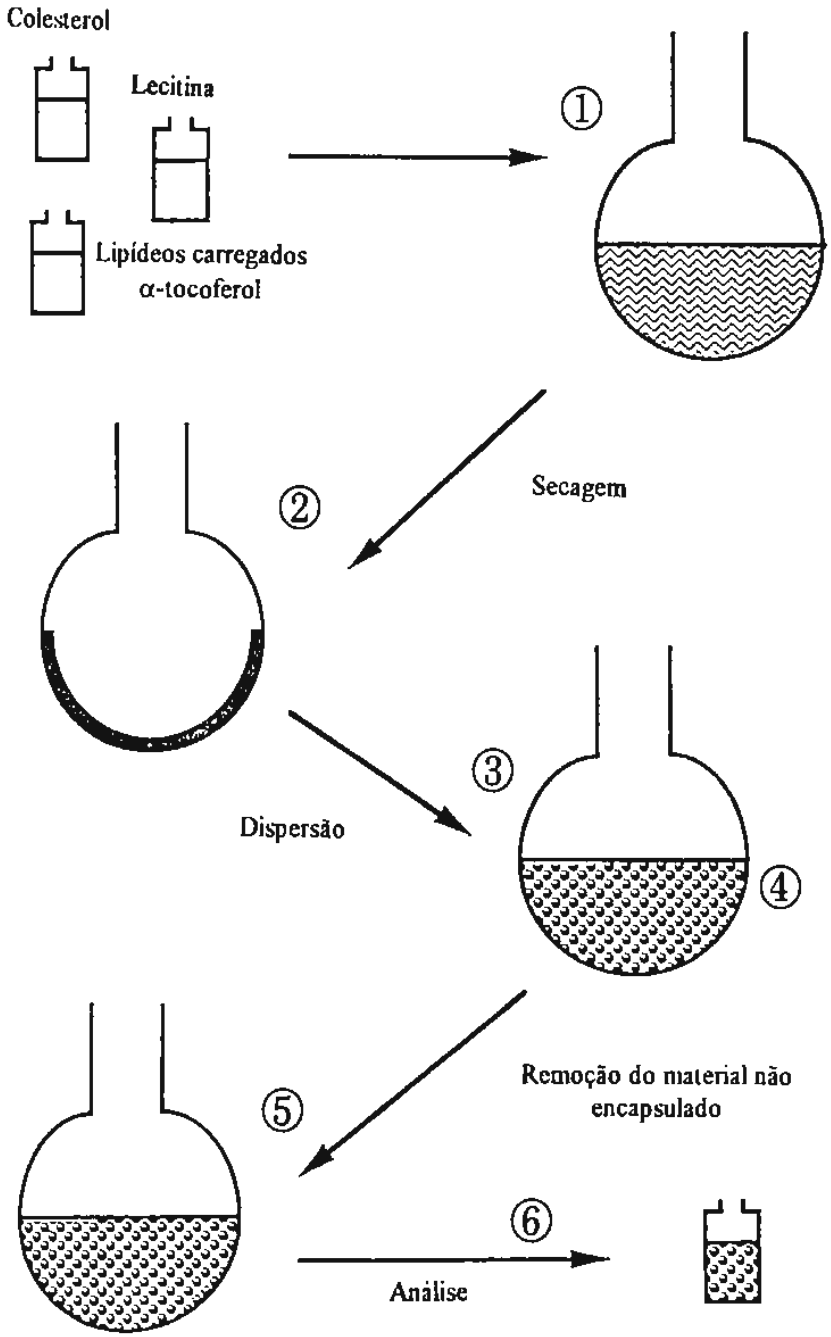

Figura 06 – Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas. Fonte: LIMA, 1995.

Os vários métodos de preparação de lipossomas diferem entre si geralmente pelo modo de dispersão dos fosfolipídios na fase aquosa. Para uma melhor comparação entre os métodos de preparação, é importante descrever algumas das características principais na preparação de vesículas. As características que mais refletem as variações decorrentes dos diferentes métodos são aquelas envolvendo a encapsulação das substâncias pelas vesículas. A eficácia de encapsulação pode ser expressa por exemplo, pela porcentagem ou taxa de encapsulação a qual corresponde à proporção de soluto associada aos lipossomas em relação à quantidade inicialmente encontrada no meio. (Pierri *et. al.*, 1999)

2.2.2.2. Métodos de obtenção

Os métodos de preparação de lipossomas são numerosos e levam à formação de vários tipos de vesículas que diferem entre si pelo tamanho, estrutura e capacidade de encapsulação (Pierri *et. al.*, 1999).

De acordo com o método, é possível obter vesículas multi ou unilamelares. Lasic ressalta a influência da energia sobre a formação dos vários tipos de vesículas. Por exemplo, as MLVs formam-se espontaneamente, quando o filme fosfolipídico é hidratado em excesso de água ou tampão. Já as LUVs e SUVs possuem maior energia livre e, portanto, deve haver a dissipação de alguma forma de energia no sistema para a sua obtenção.

Requisitos básicos para um método de preparação ideal de lipossomas:

- Simples.

- Padronizado.
- Reprodutível.
- Com boa relação custo/ eficácia.
- O produto obtido deve ser estável e homogêneo por um período de tempo suficiente.
- Capaz de produzir lipossomas homogêneos em pequena e larga escala.
- O tamanho dos lipossomas deve ser controlável.

2.2.2.2.1. Hidratação de filme lipídico

Uma solução aquosa é adicionada a um filme de fosfolipídios obtidos pela evaporação de um solvente orgânico onde os fosfolipídios estavam solubilizados. A dispersão é facilitada pela utilização de um vórtex e/ ou pela introdução de pérolas de vidro no balão. O filme fosfolipídico, em contato com a solução aquosa, engolfa parte dela, até que se desloca das paredes do balão para formar espontaneamente as vesículas.

O diâmetro das vesículas obtidas é bastante elevado, da ordem de alguns micrômetros, e a distribuição de tamanho é muito heterogênea. Dependendo da energia empregada (agitação leve, vórtex, natureza do fosfolipídio, força iônica, natureza dos íons, concentração, pureza), formam-se MLV de diferentes distribuições de tamanhos.

No caso de uma leve agitação, o diâmetro, a lamelaridade, e distribuição de tamanho dos lipossomas variam dentro de uma ampla faixa (0,1 a várias dezenas de micrômetros). Uma distribuição de tamanho relativamente bem definida (1 a 4 micras) pode ser obtida se a energia adicionada ao sistema (vórtex por 10 minutos) assim como, a composição e a concentração forem rigorosamente controladas.

O volume aquoso encapsulado varia entre 0,5 e 4,1 µl/ µmol de fosfolipídio. As taxas de encapsulação obtidas por este método variam de 2 a 15%. Segundo Maierhofer, 1988, o índice de encapsulação das vesículas obtidas por esse método é mais elevado quanto mais lentamente for realizada a hidratação. A adição de fosfolipídios carregados origina um aumento na distância entre as bicamadas lipídicas, reduzindo a tendência à agregação das MLVs após sua formação.

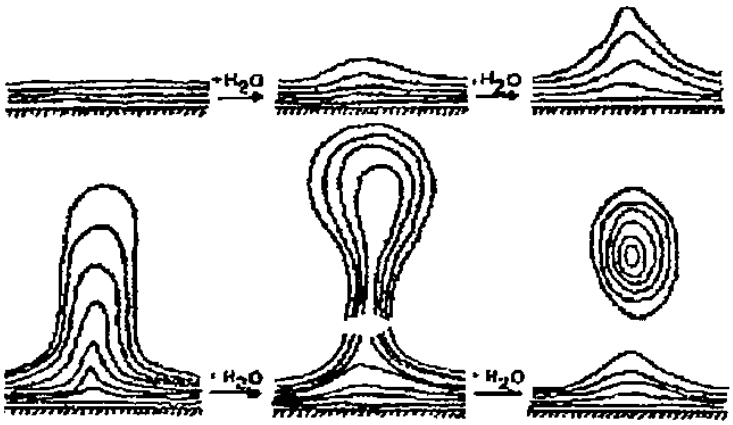

Figura 07 – Hidratação do filme lipídico seco. Fonte: PIERRI & GREMIÃO, 1999.

2.2.2.2.2. Sonicação

Com a finalidade de reduzir o diâmetro dos lipossomas MLV obtidos por hidratação do filme lipídico, a dispersão de lipossomas pode ser submetida à ação de ultrassom. A sonicação de dispersões de fosfolipídios resulta em preparações com baixa turbidez, as quais consistem de microvesículas de bicamadas lipídicas circundando compartimentos aquosos. Por este método, introduzido por Saunders (1962), obtém-se lipossomas SUV de diâmetros que variam de 20 a 50 nm.

O processo de irradiação de ultrassom pode ser feito por sonicadores

de banho ou por sonda (Figura 08). Este último é mais eficiente que o de banho para reduzir o tamanho dos lipossomas. Entretanto, os aparelhos do tipo TIP, que possuem sondas metálicas de titânio de onde partem as ondas de ultrassom, podem liberar resíduos do metal, promovendo a degradação do lipídio estrutural da vesícula.

Os sonicadores de banho evitam esse problema, mas os detalhes experimentais requerem maior atenção, como o tempo de sonicação, a forma do recipiente usado para conter os lipídios, volume da solução e a posição do recipiente no banho para obter vesículas com menor diâmetro possíveis e reprodutíveis.

Na preparação de SUV por essa técnica, é essencial que a sonicação seja efetuada numa temperatura superior à Temperatura de Transição de Fases (T_G), que no caso representa a temperatura necessária para que o lipídio passe para a forma líquida, do lipídio de mais alto ponto de fusão na mistura e que as vesículas permaneçam acima da T_G por pelo menos 30 minutos para formar uma preparação estável. Abaixo da T_G, formam-se estruturas semelhantes a agregados de SUV com defeitos na bicamada.

O alto raio de curvatura dessas vesículas proporciona uma maior percentagem de fosfolipídeos na monocamada externa (60 a 70%) comparado à monocamada interna, levando a uma distribuição assimétrica dos componentes lipídicos nas bicamadas quando são utilizadas misturas.

Em relação ao volume de encapsulação no espaço aquoso, as SUV são limitadas com valores na faixa de 0,2 a 1,5 µl/ µmol de lipídio, variando com a composição lipídica da vesícula e o tempo de sonicação. Apresenta taxa de encapsulação baixa entre 0,1 e 1%. A inclusão de colesterol aumenta o volume de captura. O pequeno espaço aquoso limita o tamanho das macromoléculas que podem ser encapsuladas (até 40.000 daltons).

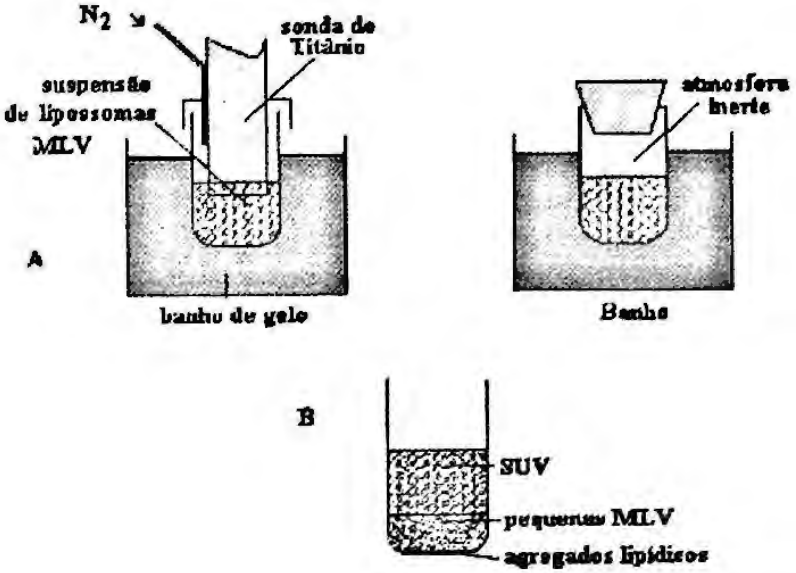

Figura 08 – Método de obtenção de lipossomas por sonicação. Fonte: PIERRI & GREMIÃO, 1999.

2.2.2.2.3. Extrusão

Estas técnicas baseam-se na utilização de uma prensa ou de membranas de policarbonato.

Extrusão de membrana:

Esse método consiste em calibrar o tamanho dos lipossomas forçando-os a passar através de uma membrana de policarbonato, cujo diâmetro dos poros é bem definido (Figura 09).

Os lipossomas são filtrados em membranas com poros decrescentes (1/ 0,8/ 0,6/ 0,4/ 0,2 μm), e são do tipo MLV com diâmetro médio de 0,27 μm.

O volume aquoso encapsulado está entre 1 e 3 µl/ µmol de lipídios e taxa de encapsulação de 5 a 30%.

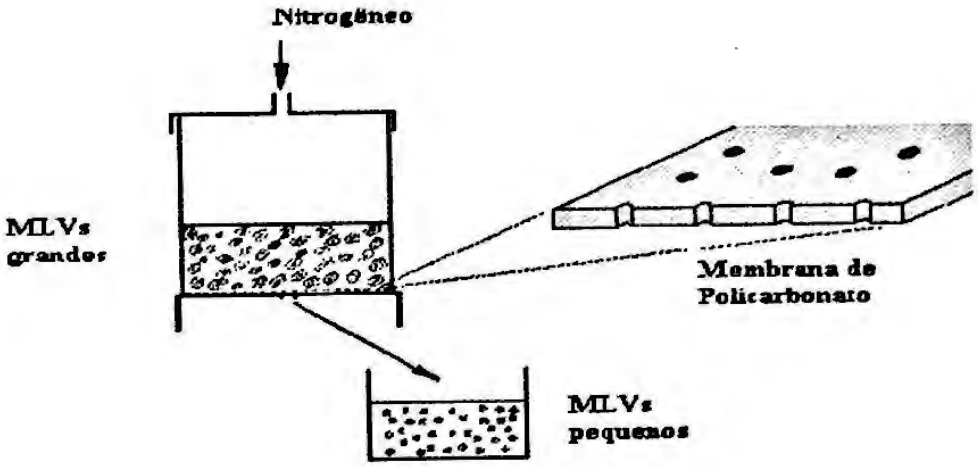

Figura 09 – Extrusão por membrana de policarbonato. Fonte: PIERRI & GREMIÃO, 1999.

2.2.2.2.4. Desidratação – Reidratação

Consiste em dispersar, numa dissolução aquosa, os lipossomas previamente liofilizados. Compreende várias etapas:

- Prepara-se lipossomas por uma das técnicas descritas anteriormente.
- A solução aquosa contendo o soluto a encapsular é adicionada aos lipossomas e liofilizada.
- Após reconstituição em solução aquosa, são obtidos lipossomas com diâmetro inferior a 1 micra e com 40% de encapsulação.

As vesículas sonicadas são misturadas a uma solução aquosa contendo o soluto que se deseja encapsular, e a mistura é seca sob corrente de N_2 (ou liofilizada). Com a desidratação da amostra, as vesículas

pequenas fundem-se para formar um filme multilamelar que intercala as moléculas do soluto entre sucessivas camadas. Na reidratação, são formadas vesículas maiores, as quais encapsulam uma porção significante do soluto.

2.2.2.2.5. Características dos principais métodos de preparação dos lipossomas

As características dos principais métodos de preparação dos lipossomas estão resumidos no quadro abaixo. De acordo com este quadro, vários critérios devem ser considerados para a formulação de lipossomas. Sua composição, estrutura (uni ou multilamelares) e tamanho são determinados em função de critérios de estabilidade e de suas aplicações. O volume de encapsulação deve ser elevado caso se pretenda encapsular macromoléculas. Além do que, o método de preparação não deve ser agressivo à substância a encapsular. Por outro lado, a característica da vesícula obtida depende da técnica utilizada, e disso depende sua aplicabilidade em terapêutica.

Ainda hoje, a obtenção industrial de lipossomas está sendo desenvolvida. Métodos ideais para a produção de lipossomas em larga escala que originem lotes consideráveis ou uma preparação contínua, assim como a uniformidade do produto e a reprodutibilidade do processo estão ainda em estudo e discussão.

Quadro 08 – Principais características dos métodos de preparação dos lipossomas. Fonte: NEW, 1990; FATTAL *et. al.*, 1993; MEMOLI *et. al.*, 1995.

Método de preparação	Estrutura	Diâmetro (µm)	Volume de encapsulação (µl/µmol lipídio)	Eficiência de encapsulação (%)
Hidratação do filme	MLV	1,0	1,4-1,8	9-27
Sonicação de MLV	SUV	0,02-0,05	0,2-1,5	0,1-1,0
Extrusão por "French Pressure Cell"	SUV	0,02-0,08	0,2-1,5	5-25
Extrusão de MLV por membrana de policarbonato 0,1 µm 0,2 A 1 µM	 SUV MLV	 0,06-1,0 0,05-2,0	 1-3 1,8-3,7	 5-30 15-60
Microfluidização	SUV	< 0,1	0,7-1,0	5-78
Injeção de etanol	SUV	0,03		0,5
VER (Evaporação em fase reversa)	LUV	0,1-1,0	11-17	30-68
Infusão de éter	LUV	0,05-0,25	13-25	2,0
Congelamento/ Descongelamento (SUV)	LUV	0,09		25-30
Congelamento/ Descongelamento (MLV)	MLV		2-5	31-89
Fusão induzida por cálcio	LUV	0,2-1,0	1-7	10-15
Desidratação/ Reidratação	MLV	0,02-2,0		26-72

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2.2.3. Purificação dos lipossomas

2.2.3.1. Remoção de traços de solvente orgânico

É fundamental a retirada total dos solventes orgânicos utilizados no processo de produção de lipossomas, para dispersar o material lipídico no meio aquoso. Além de evitar problemas de desestabilização futuros dos lipossomas, uma vez que podem gerar "solubilização" da bicamada lipossomal depois do lipossoma pronto, o que tiraria a barreira lipídica que está separando e protegendo o princípio ativo que está no interior. Resíduos de solventes orgânicos junto a formulação lipossomal final, também poderiam gerar graves riscos à saúde, quando do momento de sua utilização.

Para retirada desses resíduos de solvente, podemos utilizar a técnica da rotaevaporação ou evaporação "overnight" (por 12 horas) (Vemuri *et. al.*., 1995).

2.2.3.2. Remoção de fármaco livre

Outro ponto fundamental na purificação dos lipossomas é a retirada de fármaco não encapsulado, que se encontra livre no lado exterior do lipossoma. Este fármaco precisa ser retirado porque em primeiro lugar, queremos a ação do lipossoma com fármaco e não apenas do fármaco de forma isolada e também, a presença desse fármaco poderia trabalhar no intuito de formar um meio de desestabilização osmótica dos lipossomas, gerando uma diferença de concentração e possibilitando a saída do fármaco já encapsulado para o meio externo, desestruturando totalmente a formulação.

Diferentes técnicas podem estar sendo utilizadas para a retirada deste fármaco livre. Dentre elas, podemos citar (Vemuri *et. al.*, 1995):

- Cromatografia de troca iônica: pode ser utilizada desde que os lipossomas e o fármaco que se encontra encapsulado no interior do lipossoma possuam cargas e de polaridade diferente, para se possibilitar a separação.

- Ultrafiltração e ultracentrifugação: utilizada quando os tamanhos entre lipossomas e fármacos não se sobrepõem.

- Gel filtração: que é uma cromatografia de exclusão, vai utilizar uma coluna cromatográfica para separar o fármaco livre do lipossoma "carregado"com fármaco, baseado no princípio das diferenças de velocidade através da coluna, devido diferença de tamanhos entre o fármaco lipossomado (maior → demora menos para sair da coluna pois, "passa por fora" do gel) e do fármaco livre (menor → demora mais para sair da coluna pois, "passa por dentro", percorrendo os poros do gel).

2.2.4. Caracterização dos lipossomas

A caracterização detalhada da estrutura dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, uma vez que ela fornece informações sobre diferenças na estrutura causadas por mudanças no método de preparação e na composição lipídica. Estas diferenças na estrutura afetam o comportamento das vesículas "in vitro", assim como "in vivo". Assim, uma definição apropriada da estrutura é essencial para a obtenção de resultados

reprodutíveis, um pré-requisito fundamental para o emprego satisfatório dos lipossomas na terapêutica (Juliano, 1981; Jousma *et. al.*, 1987).

Dentre as características que mais refletem as variações entre os distintos tipos de lipossomas estão aquelas relacionadas à encapsulação de substâncias pelas vesículas. A eficácia de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras:

- A porcentagem ou taxa de encapsulação corresponde à proporção de soluto incorporada aos lipossomas em relação à quantidade inicialmente encontrada no meio.

- A massa de substância encapsulada por unidade de massa de lipídio corresponde á quantidade de soluto encapsulado (μg/ mol ou em μg/ mg).

- O volume aquoso encapsulado corresponde ao volume ou à massa de fase aquosa encapsulada por unidade de massa de lipídio (μg/ mol).

Várias técnicas podem ser utilizadas para caracterizar preparações de lipossomas, entre as quais: espalhamento de luz ("light scattering"), cromatografia, centrifugação, diálise, eletroforese, ressonância nuclear magnética, espectrofotometria e a microscopia eletrônica (Lesieur *et al*, 1991) (Quadro 09).

A microscopia eletrônica por criofratura fornece excelente caracterização morfológica dos lipossomas, entretanto é uma técnica laboriosa e que demanda um longo tempo para ser realizada (Guiot et al, 1980; Lima, 1995 a, b). Um método também adequado e, especialmente válido para avaliações mais rápidas é a técnica de espalhamento dinâmico de luz ("light scattering"), a qual é suficientemente capaz de detectar

alterações de tamanho sofridas pela dispersão de lipossomas (Vemuri & Rhodes, 1995).

Quadro 09 – Características e parâmetros para avaliação de preparações de lipossomas. Fonte: RHEE, 1982; AITZETMULLER, 1986; MOUNTS & NASH, 1990, PERKINS *ET. AL.*, 1993; LASIC, 1997.

Parâmetro avaliado	Metodologia
Estudos de caracterização geral	
pH	Determinação por pHmetro
Condutividade	Condutivimetria
Osmolaridade	Osmometria
Concentração de fosfolipídeos	Quantificação de fósforo (método de Bartlet)
Composição em fosfolipídeos	CCD, CLAE
Concentração de colesterol	Ensaio por colesterol oxidase, CLAE
Volume de Captura	Determinação do volume aquoso no interior do lipossoma
Concentração da substância encapsulada	Espectrofotometria, CLAE, CG, etc.
Concentração de solvente residual	RMN, CG
Relação fármaco/fosfolipídeo	Determinação da concentração de fármaco e fosfolipídeo
Caracterização física e ensaios de estabilidade	
Distribuição de tamanho	*Light scattering*, cromatografia de exclusão em gel, turbidez, microscopia eletrônica
Comportamento termotrópico, transição de fase	DSC, RMN, ESR
Determinação do fármaco não encapsulado	Cromatografia de exclusão em gel, cromatografia de troca iônica
Ensaios de estabilidade química	
pH	Determinação por pHmetro
Oxidação das cadeias graxas dos fosfolipídeos	Dienos conjugados, peróxidos, composição em ácidos graxos (CG), UV/Vis
Hidrólise de fosfolipídeos	CCD, CLAE, concentração de fosfolipídeos ou de ácidos graxos livres
Oxidação do colesterol	CCD, CLAE
Degradação do antioxidante	CCD, CLAE
Degradação da substância encapsulada	CCD, CLAE, espectrofotometria
Ensaios biológicos	
Esterilidade	Culturas em meios aeróbicos e anaeróbicos
Pirogenicidade e endotoxinas	Testes em coelho ou LAL (*limulus amebocyte lysate)*
Toxicidade	Em relação ao fármaco livre comparando-se ao produto em lipossomas

2.2.5. Vantagens do uso dos lipossomas

Dentre as diversas vantagens dos lipossomas, podemos ressaltar:

- Sistema de liberação controlada,

- Biodegradável, não tóxico, uma vez que é constituído de fosfolípides de origem natural,

- Pode carregar hidro e lipossolúveis, seu orifício central possui características hidrossolúveis. Já entre as bicamadas de fosfolípides, encontramos uma região de característica mais lipossolúvel. Pode-se inclusive transportar fármacos hidro e lipossolúveis ao mesmo tempo, devido a essa separação mecânica promovida pelas bicamadas lipídicas do centro hidrofílico do lipossoma,

- Previne contra a oxidação, devido a formação de uma barreira lipídica protegendo o fármaco do meio exterior,

- Aumenta a eficácia e o índice terapêutico, uma vez que reduz a perda do fármaco concentrando mais sua ação. Isto é especialmente importante em fármacos, por exemplo, que são rapidamente eliminados, o que faz com que seja administrado grandes doses, para se possibilitar sua eficácia,

- Reduz toxicidade de agentes encapsulados, concentra os princípios ativos no sistema retículo-endotelial do fígado e do baço, reduzindo a absorção em nível de coração, rins e trato gastro-intestinal. Ex: doxorrubicina » cardiotóxico e anfotericina B » nefrotóxico, com o uso destes fármacos na forma lipossomada, conseguimos diminuir e muito a toxidade, pois eles ficam em menor e menor tempo em contato com o organismo

separado momentaneamente do mesmo pela barreira lipossomal além, de diminuirmos a dose de administração necessária para obtenção de eficácia,

- Reduz eliminação, aumentando tempo de circulação. Como o lipossoma separa o fármaco do contato direto com o organismo, até o momento de sua liberação, o fármaco fica menos sujeito a metabolização precoce e conseqüentemente sua eliminação rápida,

- Especificidade,

- Aumento de estabilidade do vetorizado. Pois, a barreira lipídica funciona como protetor físico-químico frente à reações de hidrólise, oxidação entre outras, que poderiam estar desestabilizando o fármaco transportado.

2.2.6. **Exemplos de utilização no mercado**

Quadro 10 – Fármacos encapsulados em lipossomas disponíveis no mercado ou em fase final de desenvolvimento. Fonte: OSTRO & CULLIS, 1989; GREGORIADIS & FLORENCE, 1993; CHONN & CULLIS, 1995; SHARMA & SHARMA, 1997.

Fármaco	Companhia/Instituição	Aplicações
Anfotericina B	The Liposome Company NeXstar Pharmaceuticals Inc Sequus Pharmaceuticals	Tratamento de aspergilose, outras micoses sistêmicas graves, leishmaniose visceral
Gentamicina	The Liposome Company	Infecções por Gram-neg
Doxorrubicina	The Liposome Company Sequus Pharmaceuticals	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama e próstata recorrentes
Prostaglandina E_1	The Liposome Company	Síndrome de angústia respiratória aguda
^{111}Indio	Vestar	Contraste
Salbutamol	Sequus Pharmaceuticals	Asma
Daunorrubicina	NeXstar Pharmaceuticals Inc	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama, câncer de pulmão, leucemia e linfoma
Ácido trans-retinóico	Argus Pharmaceuticals Inc.	Leucemia aguda, sarcoma de Kaposi em AIDS
Interleucina-2	Oncotherapeutics	Câncer de rim
Oligonucleotídeos, ribozimas, DNA, RNA, genes	Várias companhias, instituições de pesquisa e universidades	Diversas aplicações, em estágio de triagem clínica

2.2.7. Utilização de lipossomas como transportadores de fármacos antimicobacterianos

A emergência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à drogas múltiplas vem despertando a necessidade urgente do desenvolvimento de novos medicamentos por meio da compreensão, em nível molecular, dos mecanismos de ação e sítios alvo, bem como de desenvolver formulações mais adequadas para os fármacos já existentes, a fim de aumentar a sua eficiência terapêutica. Neste último aspecto, a pesquisa em tecnologia farmacêutica tem orientado seus objetivos, enfatizando principalmente o estudo do destino dos fármacos após administração *in vivo*, reforçando o conceito de biodisponibilidade. Assim, surgiram novos sistemas de veículação de fármacos, entre os quais os "Sistemas de Liberação Controlada de Fármaco" (Controlled Drug Delivery System), cuja preocupação fundamental inclui o estudo da velocidade de liberação do fármaco no sitio de administração e a velocidade com que essas substâncias atravessam as barreiras biológicas, penetram na circulação e atingem o alvo farmacológico. Mais recentemente, têm sido explorados com grande detalhamento científico os "Sistemas de Direcionamento de Fármacos" (Drug Targeting System), cuja biotecnologia e funções biológicas vai muito além daquilo que se propunha anteriormente. Esses sistemas, quando adequadamente idealizados, podem ser capazes de determinar o destino do fármaco no organismo, evitando assim os tecidos não específicos, muitas vezes caracterizados como locais potencialmente tóxicos, proporcionando, dessa forma, altas concentrações de fármaco diretamente no local onde devem exercer seu efeito farmacológico (Oliveira *et al.*, 1997).

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, tais como nanocápsulas, nanopartículas, lipossomas e microemulsões têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica desde que podem proporcionar um microambiente restrito, com propriedades bastante

diferentes daquelas apresentadas pelo meio externo, capaz de compartimentalizar eficientemente diversos grupos de substâncias de uso terapêutico.

Os lipossomas enquadram-se exatamente nesse conceito e, com suas características particulares, possuem a habilidade de direcionar fármacos para sítios específicos, principalmente para o interior de células do Sistema Fagocitário Mononuclear (MPS).

Para um fármaco livre, sua absorção e distribuição no organismo é diretamente dependentes das propriedades físico-químicas da molécula. Porém, quando a substância está compartimentalizada num transportador coloidal, como o lipossoma, as propriedades físico-químicas que prevalecem inicialmente são as do agregado, desde que este é que entra em contato direto com o sistema biológico. Dessa forma, é possível desenvolver sistemas transportadores com diferentes finalidades, entre as quais a de liberar substâncias farmacologicamente ativas diretamente no interior das células. Isso adquire uma especial importância no tratamento de doenças cujos microrganismos, em alguma fase da doença, desenvolvem-se no interior das células (Oliveira *et al.*, 1997).

A tuberculose é um exemplo concreto de doença na qual os bacilos localizam-se principalmente no interior dos monócitos, células fagocitárias e células gigantes. Estas células infectadas podem funcionar, então, como um reservatório das micobactérias. A localização intracelular é justamente um dos fatores que dificultam acentuadamente o tratamento e favorecem a persistência microbiana. Resistência de infecções bacterianas intracelulares à terapia pode ser em decorrência da baixa fração de antibiótico capturado pela célula ou da reduzida atividade terapêutica deste no pH ácido dos lisossomas. Por exemplo, antibióticos que possuem caráter básico, como os aminoglicosídeos, penetram em alta quantidade no interior dos lisossomas, mas não exibem efeito terapêutico desejável em meio ácido ; 55 antibióticos

negativamente carregados, como os β-lactâmicos, não possuem habilidade de atravessar membranas em razão de seu carater iônico no meio neutro extracelular ou do citoplasma, outros antibióticos, como a clindamicina, penetram rapidamente e em grande proporção mas, pelo fato de serem retidos precariamente no interior da célula, não exibem atividade antibiótica apreciável.

Por outro lado, a resistência micobacteriana à antibioticoterapia pode também decorrer da existência de uma barreira de permeabilidade ou de mecanismos de exclusão que afetam a penetração dos fármacos no interior do microrganismo. Foi notado que o acesso das drogas às moléculas alvo são fatores decisivos na determinação de suscetibilidade e de resistência micobacteriana. Cepas do complexo *Mycobacterium avium-intracelulare* são significativamente mais resistentes à maioria das drogas contra *Mycobacterium tuberculosis* em decorrência de uma menor permeabilidade da sua parede celular. Tem sido proposto que ácidos micólicos e lipídios associados à superfície celular formam uma barreira de permeabilidade análoga à da membrana externa dos bacilos gram-negativos. Descobrir, portanto, modos de transportar drogas através da barreira hibrofóbica da parede micobacteriana poderá implementar significativamente a terapia.

A necessidade de vetorização intracelular de antibióticos na terapia antibacteriana é reconhecida há cerca de 10 anos. Neste sentido, a maioria dos problemas citados anteriormente pode ser contornada veiculando-se os fármacos associados a agregados coloidais como os lipossomas ou nanopartículas, de forma a modular o direcionamento de acordo com o alvo a ser atingido. Tem sido demonstrado que, em cultura de macrófagos, agentes antimicobacterianos encapsulados em lipossomas têm maior atividade, quando comparados com drogas não encapsuladas. Semelhantemente, estudos empregando modelo de camundongo infectado com micobactérias também têm maior eficácia para as drogas encapsuladas (Oliveira *et al.*, 1997).

A utilização dos lipossomas e outros transportadores coloidais de fármacos é, portanto, de óbvia relevância, sendo amplas as possibilidades de aplicações, com perspectivas de atingir os agentes patogênicos de forma mais eficiente que as formas farmacêuticas convencionais, por meio de diversas vias de administração.

Administração por via intravenosa

Os lipossomas e outros agregados coloidais não escapam por si só da circulação sanguínea, em razão da barreira endotelial, com exceção do tecido do endotélio descontínuo que recobre os capilares como os do fígado, baço e medula óssea. Esses sistemas particulados são capturados pelos fagossomas das células do MPS através da endocitose. No interior da célula os fagossomas se juntam aos lisossomas ocorrendo liberação intracelular eficiente dos antibióticos. O *M. tuberculosis* também é capturado pelos macrófagos de maneira semelhante, tornando-se alvo fácil dos fármacos encapsulados em lipossomas.

Alguns estudos relativos à interações de lipossomas com o MPS levaram ao estabelecimento de algumas conclusões:

1 Majoritariamente o órgão responsável pela remoção dos lipossomas da corrente circulatória é o fígado, através das células de Küpffer, cujo número no homem é da ordem de 10^9. A razão principal reside na importância do fluxo de sangue nesse órgão, no número de células fagocitárias e na localização dessas células, que forram os canais sanguíneos. O baço e a medula também contribuem em menor extensão.

2 O principal modo de interação do lipossoma com os macrófagos é a fagocitose. Macrófagos podem capturar lipossomas por fagocitose não específica (Figura 10), mas esta captura aumenta dramaticamente se os lipossomas contiverem marcadores com capacidade de ligar-se a receptores

expressos na superfície das células do MPS. Esses marcadores podem ser derivados de proteínas opsonizantes. O processo é conhecido como endocitose mediada por receptores (Figura 10).

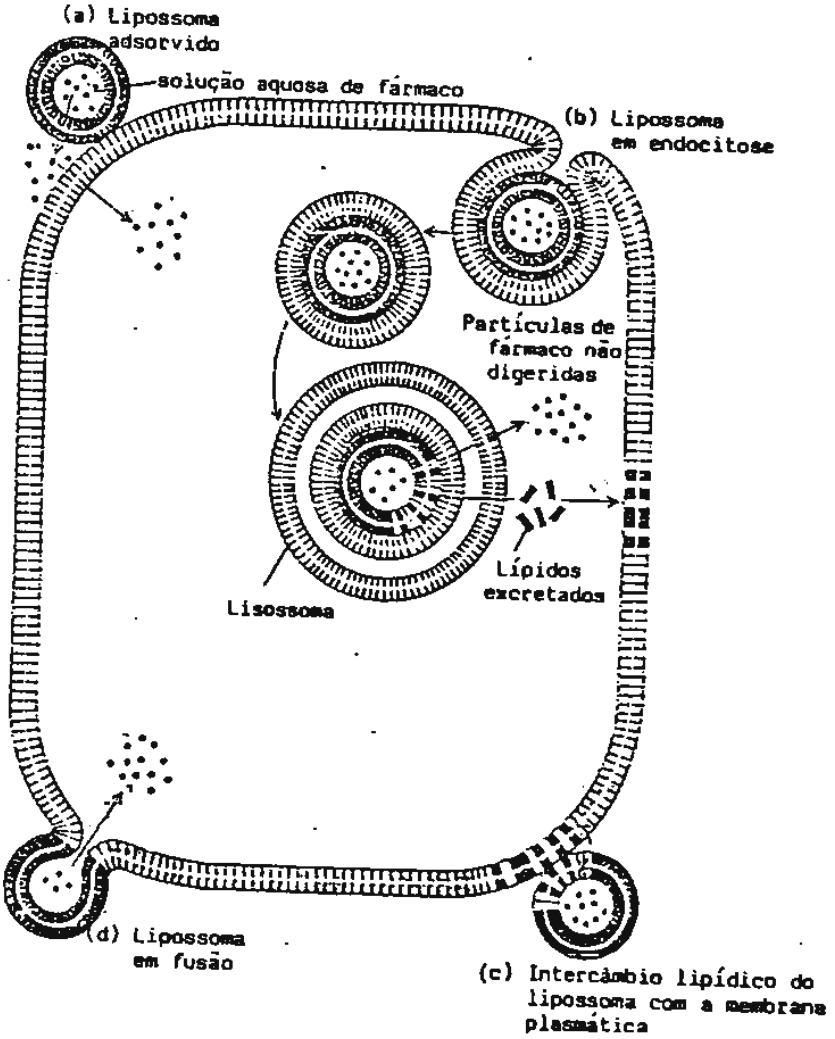

Figura 10 – Mecanismos de interação lipossoma/célula. (a) Adsorção; (b) endocitose; (c) intercâmbio; (d) fusão. Fonte: PRISTA *et. al.*, 1981.

3 O compartimento intracelular final é, para lipossomas convencionais, o lisossoma, onde sua estrutura é destruída pelas fosfolipases e o fármaco é, então, liberado.

A literatura mostra vários exemplos de formulações capazes de atingir o alvo intracelular. Desidério & Campbell verificaram que a encapsulação da cefalotina aumentou a captação do antibiótico por macrófagos *in vitro* a 37°C. A 4°C não detectaram cefalotina intracelular após a incubação com cefalotina encapsulada em lipossomas, demonstrando a necessidade da endocitose dos lipossomas para a liberação do antibiótico no interior da célula.

Antibióticos aminoglicosídicos também possuem a habilidade de eliminar bactérias de órgãos infectados quando encapsulados em lipossomas. Cobaias infectadas com *Brucella canis* foram tratadas com estreptomicina encapsulada em lipossomas, verificando-se morte total das bactérias com a dose de 2 mg/kg, enquanto a mesma dose de estreptomicina livre causou uma redução insignificante nas bactérias. A estreptomicina encapsulada em lipossomas unilamelares grandes, aniônicos ou neutros, contendo fosfatidilcolina de ovo, mostrou-se inativa contra *Escherichia coli* em ensaio de diluição homogênea em tubo de ensaio. No entanto, quando a *Escherichia coli* foi colocada no interior de macrófagos "murina J774.2" houve um aumento da atividade antibiótica da estreptomicina encapsulada em lipossomas neutros de fosfatidilcolina por fator de dez vezes. Essa superioridade na atividade antibactenana também foi detectada no efeito de lipossomas contendo estreptomicina no tratamento de infecções experimentais com *Mycobacterium tuberculosis.*

Administração pelo sistema respiratório

Entre os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, os lipossomas têm sido amplamente estudados como direcionadores de substâncias para os pulmões. Os lipossomas são particularmente apropriados para essa finalidade, uma vez que os anfifílicos usualmente utilizados em sua estruturação, como a fosfatidilcohna são bastante biocompatíveis, além do

que também podem ser preparados com os fosfolipídeos encontrados naturalmente nos pulmões como componentes dos tensoativos alveolares. A encapsulação de fármacos em lipossomas pode ser utilizada com vários objetivos, entre os quais o de alterar a farmacocinética da substância ativa, de prolongar o tempo de residência do fármaco com as vias aéreas, diminuindo a distribuição para outros tecidos do organismo, ou ainda como meio de proporcionar níveis plasmáticos adequados. Desde que a tortuosidade do trato respiratório representa uma barreira para a penetração profunda de partículas nos pulmões, a administração de lipossomas ou outro sistema coloidal, no nível de bronquíolos e alvéolos, requer preparações com diâmetros menores que 5-6 μm, sendo os lipossomas adequados a essa aplicação.

O destino dos lipossomas nos pulmões, após administração, é um importante aspecto para que a liberação do fármaco seja eficaz do ponto de vista terapêutico. Fatores como a estabilidade ou tempo de residência dos lipossomas nos pulmões exercem uma influência muito significativa no tempo de liberação do fármaco *in vivo*. Foi verificado que vesículas unilamelares pequenas (SUV) de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) marcada, administradas em coelhos, são rapidamente associadas ao parênquima pulmonar. Sabe-se que, em geral, a composição do lipossoma pode alterar tanto a velocidade como a extensão da captação pelos pulmões, sendo que vesículas de fosfatidilglicerol são captadas muito rapidamente. Geralmente, em comparação com os tensoativos pulmonares, quando fosfolipídeos são administrados na forma de lipossomas a remoção destes, dos pulmões, ocorre mais lentamente. As células epiteliais tipo II são capacitadas em remover fosfolipídeos exógenos do espaço alveolar, sendo que esse processo é agilizado por apoproteínas tensoativas. A incubação de lipossomas com células tipo II isoladas e macrófagos alveolares mostrou que a proteína alveolar SP-A aumenta drasticamente a captação de lipídios pelos macrófagos. Dessa forma, a administração de fármacos nos pulmões poderia ocorrer em dois níveis distintos:

Não fagocitária: Tem o objetivo de modular a liberação de fármacos de modo a obter um efeito local intenso ou prolongado. Sabe-se que vesículas simplesmente depositadas na superfície dos alvéolos pulmonares proporcionam liberação prolongada do fármaco encapsulado. A velocidade desse processo pode ser controlada pela inclusão de colesterol, por exemplo, o qual aumenta a estabilidade da estrutura *in vivo*, diminuindo a velocidade de liberação do fármaco. Estudos com tensoativos exógenos mostram claramente que a inclusão de fosfatidilglicerol na estrutura do lipossoma aumenta a difusão na superficie alveolar proporcionando uma diminuição potencial da estabilidade de lipossomas unilamelares e promovendo a liberação mais rápida do fármaco. Outro aspecto interessante é que se o principal mecanismo de liberação de fármacos nos pulmões é a fusão das vesículas com a superfície dos alvéolos pulmonares ou a troca lipídica (Figura 10) entre os constituintes da bicamada lipídica do lipossoma e tensoativo alveolar, então lipossomas multilamelares possuem maior potencial de retardar a liberação do fármaco do que vesículas unilamelares. Esses aspectos constituem boas alternativas para a administração de antimicobacterianos com o objetivo de intensificar o efeito farmacológico destes nos pulmões.

Considerando que o foco inicial da tuberculose aparece muito frequentemente nos pulmões, devido à maior facilidade de transmissão aérea, e considerando que aproximadamente 85% dos casos notificados no Brasil são de tuberculose pulmonar, seguido pela pleural, é de especial interesse o uso da propriedade dos lipossomas de se acumularem nos pulmões, utilizando-se a via de administração pulmonar.

Fagocitária: Desde que os lipossomas podem ser rapidamente captados pelas células fagocitárias dos pulmões, essa propriedade pode ser utilizada para direcionar compostos com atividade antibiótica para os macrófagos alveolares. A incorporação de antibióticos em lipossomas tem proporcionado

aumento da atividade antibacteriana em relação à substância livre, especialmente no tratamento de infecções de monócitos e macrófagos. Desde que foi demonstrado *in vitro* que macrófagos alveolares captam rapidamente lipossomas, a inalação de lipossomas contendo antibióticos pode constituir um importante meio de direcionar esses fármacos para macrófagcs alveolares infectados. A variação da composição dos lipossomas por inclusão da proteína tensoativa alveolar SP-A proporcionou aumento significativo da captação das vesículas pelas células alveolares tipo II. Estudos *in vitro* mostraram que a rápida velocidade de captura dos lipossomas pelos macrófagos alveolares permitiu formular lipossomas contendo amicacina. O antibiótico encapsulado foi utilizado no tratamento de macrófagos alveolares infectados com *Mycobacterium avium-intracellulare*, sendo que a formulação aumentou em aproximadamente cem vezes a atividade do fármaco em relação à dose equivalente da amicacina em solução (Oliveira *et al.*, 1997).

2.3. Rifampicina

Quadro 11 – Rifampicina: características farmacopéicas

2.3.1. Farmacocinética

2.3.2. Farmacodinâmica

2.3.3. Indicações

2.3.4. Contra-indicações

2.3.5. Interações medicamentosas

2.3.6. Reações adversas

2.3.7. Precauções

2.3.8. Advertências

Quadro 11 – Rifampicina: características farmacopéicas. Fonte: BP, 1993.

MATERIAL: RIFAMPICINA		
PROPRIEDADES	**ESPECIFICAÇÃO**	**MÉTODO**
Aparência	Pó cristalino vermelho tijolo a marrom avermelhado, praticamente inodoro	visual
Solubilidade	Levemente solúvel em água, acetona, etanol (96%) e éter, livremente solúvel em clorofórmio e metanol	BP 93
Acidez (solução a 1%)	Entre 4,5 e 6,5	BP 93
Cinzas sulfatadas	Máx 0,1%	BP 93
Teor	97% A 102%	BP 93

INFORMAÇÕES GERAIS	
Formula / Peso Molec.:	$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ / PM= 823
Sinônimos:	Antibiótico semi- sintético obtido da rifampicina SV
CAS	# 13292-46-1 #
Armazenagem::	Manter em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e estocado em lugar frio.

2.3.1. Farmacocinética

2.3.1.1. Absorção

A substância ativa se absorve rápida e completamente. Após uma dose única de 600 mg de rifampicina em jejum, alcançam-se concentrações plasmáticas máximas de aproximadamente 10 µg/mL, depois de 2 a 3 horas. A ingestão simultânea com alimentos reduz a absorção da rifampicina. Uma infusão intravenosa gota a gota de rifampicina no espaço de 1 a 3 horas produz perfis no plasma similar aos que origina a administração das mesmas doses em forma de cápsulas. Com uma infusão de 600 mg durante 3 horas, se alcançam concentrações plasmáticas aproximadamente de 10 µg/mL.

2.3.1.2. Distribuição

O volume de distribuição aparente é de 1,6 L/kg em adultos e 1,1 L/kg em crianças. A união à proteínas séricas é de 84 a 91%. A rifampicina penetra rapidamente em diversos líquidos e tecidos corporais, incluindo o tecido ósseo. A rifampicina cruza a barreira cerebral hemato-encefálica, apenas se houver inflamação das meninges, porém as concentrações no líquido céfalo-espinhal podem permanecer sobre a concentração inibitória máxima para *Mycobacterium tuberculosis* até por dois meses com terapia contínua de 600 mg/ dia por via oral. A rifampicina cruza a barreira placentária humana e passa ao leite materno. Contudo, um bebê

amamentado não receberia mais de 1% da dose terapêutica usual.

2.3.1.3. Biotransformação

A rifampicina é metabolizada no fígado, sendo o principal metabólito o 2,5-O-diacetilrifampicina, o qual é microbiologicamente ativo. A rifampicina induz seu próprio metabolismo.

2.3.1.4. Eliminação/excreção

A vida média de eliminação no plasma da rifampicina se incrementa com as doses altas, e alcança 2,5 horas, 3 a 4 horas e aproximadamente 5 horas depois de doses únicas de 300, 600 e 900 mg, respectivamente.

Depois de poucos dias de administração diária repetida, a biodisponibilidade da rifampicina diminui, e o valor da vida média que segue às doses repetidas de 600 mg, cai de 1 a 2 horas.

Devido ao seu efeito indutor de enzimas no fígado, a rifampicina acelera seu próprio metabolismo, assim sua eliminação sistêmica, na qual alcança aproximadamente 6 L/h depois da primeira dose, chega a aproximadamente 9 L/h depois de uma dose repetida. Porém a maior parte do fármaco se elimina na bílis. A rifampicina também aparece na urina.

Numa faixa de dose entre 150 a 900 mg; 4 a 18% da dose se excretam sem transformação, na urina.

2.3.1.5. Características dos pacientes

Em pacientes idosos, as concentrações no plasma são comparáveis às dos pacientes jovens. Com insuficiência renal, a vida média de eliminação se prolonga só nas doses que excedem os 600 mg diários. Supondo que a função excretora hepàtica é normal, a dose em pacientes com função renal prejudicada não necessita ser reduzida abaixo dos 600 mg diários. A rifampicina se elimina via peritônio e hemodiálise. O ajuste da dose não é necessário durante a diálise. Em pacientes com insuficiência hepática, as concentrações no plasma se elevam e a vida média de eliminação se prolonga. Na presença de disfunção hepática severa, é necessário ajustar a dose.

2.3.2. Farmacodinâmica

A rifampicina é um antibiótico de rifamicina a qual exerce, *in vitro*, um efeito bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto que sua atividade contra outras espécies atípicas de *Mycobacterium* é variável. O espectro de sua ação bactericida também inclui *M. leprae*, assim como diversas outras bactérias gram-positivas e gram-negativas.

In vivo exerce seu efeito bactericida não só sobre os microorganismos nos espaços extracelulares sendo também, naqueles localizados intracelularmente. Também é de significância clínica seu efeito esterilizante.

2.3.2.1. Mecanismo de ação

A rifampicina inibe a polimerase do RNA dependente do DNA de cepas bacterianas sensíveis, mas sem afetar a enzima do mamífero correspondente. Devido à uma seleção relativamente rápida de "um passo" das bactérias resistentes com rifampicina, o fármaco não deve ser utilizado como monoterapia para tratar infecções evidentes. As bactérias resistentes à rifampicina não desdobram resistência cruzada a outros antibióticos com exceção das rifampicinas.

2.3.3. Indicações

Tuberculose: Em todas as suas fases, incluindo os casos recentes, avançados, crônicos e os resistentes a vários medicamentos. A rifampicina necessita ser sempre administrada associada a pelo menos um outro fàrmaco tuberculostático. *Hanseníase:* No tratamento da lepra multibacilar, em particular para converter o estado infeccioso e não-infeccioso. A rifampicina deve ser usada em associação em pelo menos outro medicamento anti-hanseníase. *Portadores assintomáticos de "M. meningititis".* Para eliminar os meningococos da nasofaringe. A rifampicina não está indicada para o tratamento da infecção meningocócica, devido à

possibilidade do rápido desenvolvimento de germes resistentes. *Portadores assintomáticos, "H. influenzae":* Indicada tanto para os portadores assintomáticos de *H. influenzae* como também na quimioprofilaxia de crianças menores de 4 anos que tenham sido expostas ao contágio com este microrganismo. *Brucelose:* No tratamento da brucelose deve ser associada à doxiciclina. Infecções estafilocócicas graves e meticilina resistentes, desde que esteja sempre associada a outro antibiótico apropriado. Outras infecções causadas por germes sensíveis à rifampicina, tais como: estafilococos, estreptococos, gonococos, *Proteus* sp., *H. influenzae*, *E. coli* e *Legionella* sp. Para prevenir o aparecimento de cepas resistentes, a rifampicina deverá ser administrada com outro agente antibacteriano para o qual o microrganismo tenha se mostrado sensível.

2.3.4. Contra-indicações

Em pacientes com antecedentes de hipersensibilidade às rifampicinas.

2.3.5. Interações medicamentosas

Interferência de rifampicina na ação de outros medicamentos: A rifampicina possui propriedades indutoras das enzimas hepáticas, podendo reduzir a atividade de alguns fármacos como anticoagulantes orais, ciclosporina, quinidina, analgésicos, narcóticos, dapsona, corticosteróides, digitálicos, anticoncepcionais orais e agentes hipoglicemiantes orais. Tem-se relatado também diminuição da atividade dos seguintes medicamentos quando administrados simultaneamente com rifampicina: metadona, barbitúricos, diazepam, verapamil, betabloqueadores adrenérgicos, clofibrato, progesterona, disopiramida, mexiletina, teofilina, cloranfenicol e anticonvulsivantes. Pode ser necessário o ajuste das doses destes

medicamentos se forem administrados concomitantemente com rifampicina. A rifampicina pode causar deficiência de niacina e de piridoxina (neurite periférica). A rifampicina pode prejudicar a eficiência dos anticoncepcionais orais com aumento do risco de gravidez. *Interação de outros medicamentos com rifampicina:* Têm-se evidenciado que os antiácidos interferem com a absorção de rifampicina. Também quando a rifampicina é administrada junto com o ácido paramino salicílico (PAS), os níveis séricos de rifampicina podem diminuir; conseqüentemente estes medicamentos devem ser tomados com intervalo de pelo menos 6 horas. No caso de cetoconazol, pode haver diminuição da concentração sérica de ambos os medicamentos e as dosagens podem necessitar de ajustes, dependendo da condição clínica do paciente. O uso concomitante de rifampicina e outros fármacos hepatotóxicos (por exemplo: paracetamol, halotano, isoniazida) pode aumentar o risco de hepatotoxicidade. O uso concomitante de rifampicina e depressores medulares podem aumentar os efeitos leucopênicos ou trombocitopênicos desses fármacos. Probenecida aumenta a concentração sérica de rifampicina. O seu uso concomitante não é recomendado.

2.3.6. Reações adversas

Nas doses recomendadas, a rifampicina é geralmente bem tolerada. Podem ocorrer as seguintes reações adversas, tanto com o tratamento diário como no intermitente: *Reações cutâneas:* Podem ocorrer erupções leves a autolimitadas que não parecem ser alérgicas. Tipicamente incluem prurido e eritema com ou sem erupção. As reações cutâneas de hipersensibilidade são mais graves e muito mais raras. *Reações digestivas:* Anorexia, náuseas, vômitos, mal-estar, diarréia e colite pseudomembranosa. *Hepatite:* Ocorre principalmente em pacientes alcoólatras e/ou que ingerem concomitantemente outros fármacos hepatotóxicos. *Trombocitopenia:* Pode apresentar-se com ou sem púrpura.

Está geralmente associada a tratamento intermitente e é reversível com a suspensão do medicamento. Foram relatados alguns casos de hemorragia cerebral e morte quando administração de rifampicina foi continuada ou se reiniciou depois do aparecimento de púrpura. *Reações do sistema nervoso:* Cefaléia, sonolência, ataxia, fadiga, tontura, confusão mental, dificuldade de concentração, distúrbios visuais, torpor. Em pequena porcentagem de pacientes foi verificada: eosinofilia, leucopenia, edema, fraqueza muscular, miopatia, alterações do ciclo menstrual e nefrite intersticial. *Outros:* a rifampicina pode causar deficiência de niacina e de piridoxina, com possibilidade de desenvolvimento de nefrite periférica. Algumas reações de rifampicina geralmente ocorrem com o seu uso intermitente, sendo provavelmente de origem imunológica. Síndrome pseudogripal: caracterizada por epsódios de febre, calafrios, cefaléia, tonturas e dores muculoesqueléticas, que geralmente aparecem entre o terceiro e o sexto mês de tratamento. Esta síndrome pode ocorrer em até 50% dos pacientes que recebem dose de 25 mg/kg por dia ou mais, uma vez por semana. Quando se utilizam doses menores e com intervalos menores (2 ou mais vezes por semana) a freqüência é bem menor. Insuficiência renal aguda: geralmente devido à necrose tubular aguda, embora tenham sido relatados casos de necrose cortical. Outras: dispnéia, sibilos, hipotensão, choque, anemia hemolítica e alterações menstruais.

2.3.7. Precauções

A rifampicina pode produzir uma coloração avermelhada na urina, saliva e lágrima. As lentes de contato gelatinosas poderão ficar manchadas permanentemente. Em alguns casos pode ocorrer hiperbilirrubinemia nos primeiros dias de via de execução do fígado. Isto não constitui por si só uma indicação para interromper o tratamento; deve-se tomar esta decisão na repetição dos exames laboratoriais e levando-se em consideração a

condição clínica do paciente e a tendência dos níveis enzimáticos. A administração de rifampicina pode provocar reações imunológicas. Portanto, os pacientes devem ser advertidos para que não interrompam o tratamento e deve-se controlá-los cuidadosamente. A rifampicina possui propriedades indutoras enzimáticas, incluindo relatos isolados, tem-se associado uma exacerbação da porfiria. Para soluções que contenham metassulfitos, este pode desencadear reações alérgicas, incluindo sintomatologia de choque anafilático, ou crises de asma menos severas. A sensibilidade ao sulfito se observa mais freqüentemente em pessoas asmáticas. Não existem estudos bem controlados com rifampicina em mulheres grávidas e na lactação. Em altas doses, a rifampicina tem mostrado ação teratogênica em roedores. A rifampicina é excretada no leite materno. Embora se tenha relatado que a rifampicina atravessa a barreira placentária e aparece no cordão umbilical, o efeito da rifampicina isolada ou em combinação com outro antibiótico no feto humano não é ainda conhecido. A administração de rifampicina durante as últimas semanas de gravidez pode causar hemorragias pós-nuais na mãe e no recém-nascido; o tratamento indicado é a administração de vitamina K. Portanto, a rifampicina não deve ser administrada em mulheres grávidas e lactantes, a menos que, a critério do médico, os prováveis benefícios para a paciente superem os riscos para o recém-nascido.

2.3.8. Advertências

Os pacientes com disfunção hepática devem ser tratados com rifampicina só em caso de real necessidade, e mesmo assim sob estrita supervisão de transaminases glutâmico-pirúvica (TGP) e glutâmico-oxalacético (TGO), antes do início do tratamento e a cada 2 a 4 semanas. Se detectados sinais de lesão hepatocelular, a rifampicina deve ser imediatamente suspensa.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto é o desenvolvimento de sistemas lipossomais de transporte de fármacos, usados no tratamento da tuberculose (rifampicina), visando a modificação e melhoramento de sua atividade tuberculostática.

- Incorporação em sistemas lipossomais de fármacos de primeira escolha no tratamento da tuberculose (rifampicina).

- Otimização da metodologia. Doseamento e avaliação do rendimento do processo. Avaliação da estrutura e integridade da bicamada.

- Avaliação da estabilidade da formulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias-primas e reagentes

- água bidestilada, através do sistema Milli-Q® (Millipore);
- colesterol (Sigma);
- clorofórmio P.A. (Merck);
- detergente neutro especial para laboratório Extran® MA 02 Neutral (Merck);
- fosfatidilcolina de gema de ovo (Sigma);
- fosfato de potássio monobásico P.A. (CAAL);
- gel de cromatografia Sephadex® G-50 Medium (Amersham Bioscience);
- hidróxido de sódio P.A. (Merck);
- metanol P.A. (Merck);
- gás nitrogênio (White Martins);
- rifampicina (Henrifarma);
- trehalose (Sigma);
- Triton-X100.

4.1.2. Equipamentos e materiais de laboratório

- balança analítica (Ohaus);
- banho de ultrassom DX-20624B (Daigger);
- bomba de vácuo Q-355B (Quimis);
- centrífuga refrigerada RC 5C Plus (Sorvall);
- centrífuga refrigerada U 32-R (Boeco Germany);
- espectrofotômetro UV/Visível DU-640 (Beckman Coulter);

- extrusor LiposoFast Basic® (Avestin);
- lã de vidro puríssima (CAAL);
- liofilizador (Boc Edwards);
- membrana filtrante para extrusor – 0,22 µm (Avestin);
- membrana filtrante para seringa - Millex® - 0,45 µm (Millipore);
- micropipeta automática Nichipet® EX (Nichiryo);
- papel de filtro qualitativo (Millipore);
- pHmetro (Gehaka);
- seringas plásticas descartáveis de 1 mL;
- vórtex Zx^3 (Velp Scientifica).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação de lipossomas carreadores de rifampicina

4.2.1.1. Preparação da vidraria e utensílios que irão entrar em contato direto com os lipossomas

Deve-se ressaltar, que o cuidado com a vidraria e demais utensílios que entraram em contato direto com o lipossoma foi fundamental. Para isso, foi utilizada vidraria nova e de uso exclusivo para os lipossomas. Além disso, na limpeza do material foi tido um cuidado especial de forma que fosse usado o mínimo de detergente possível e de que não sobrassem resíduos deste na vidraria e utensílios, que entrariam em contato direto com o lipossoma, o que acabaria por atrapalhar de forma significativa a produção das vesículas lipossomais, uma vez que estas são constituídas por fosfolípides. Para isso se fez necessário trabalhar com detergente neutro, de baixo nível de resíduo, especial para laboratório Extran® (Merck) e diluído à

0,1%, de forma que quase não houvesse formação de espuma. Mesmo assim, foi importantíssimo se enxaguar diversas vezes com água de torneira após a lavagem, terminando com dois enxágues de água bidestilada Milli-Q®.

4.2.1.2. Preparo do tampão fosfato (pH 7,0)

Este foi preparado segundo método descrito na Farmacopéia Americana (USP XXV). O tampão fosfato foi escolhido por se adequar à natureza da rifampicina. Teve-se o cuidado de se trabalhar em pH 7,0, para que não houvesse problemas nem com a atividade da rifampicina nem com relação à integridade das bicamadas do lipossoma. Para o preparo de 400mL de tampão deve-se em primeiro lugar pesar 2,722g de fosfato de potássio monobásico P.A. (CAAL) e completar com água Milli-Q isenta de CO_2 para 100mL. Depois, deve-se preparar uma solução de hidróxido de sódio 0,2M, pesando-se 0,4656g de hidróxido de sódio P.A. (Merck) e completar com água Milli-Q isenta de CO_2 para 58,2 mL. Em uma proveta foram adicionadas as duas soluções anteriormente preparadas e completou-se o volume novamente com água Milli-Q, isenta de CO_2. Mediu-se o pH obtido através de pHmetro.

4.2.1.3. Preparo da solução de rifampicina

Em um balão volumétrico de 100mL foram adicionados 500mg de rifampicina (Henrifarma) e completou-se o volume com água Milli-Q (que numa segunda fase do trabalho, foi substituída por tampão fosfato a fim de se conferir melhor solubilização da rifampicina e maior estabilidade à preparação lipossomal).

Devido à baixa solubilidade da rifampicina em água ou solução aquosa, promoveu-se agitação constante e aquecimento em torno de 37°C por 4 horas em agitador magnético. Posteriormente, a solução foi mantida protegida da luz, envolta em papel alumínio e em geladeira, "overnight" (desta forma foram observados conceitos de biossegurança, não se deixando equipamentos elétricos ligados durante a noite). Seguiu-se com uma filtração em papel de filtro qualitativo, completando novamente o volume, usando-se para isso solução tampão fosfato.

4.2.1.4.Obtenção dos lipossomas pelo método da extrusão

1. Foram dispersos 18 mg de fosfatidilcolina e 5 mg de colesterol, completando-se posteriormente o volume para 8,0 mL com a mistura de solventes clorofórmio/ metanol 1 : 1. Foi adicionado também, 0,4 Mol/L de trehalose à dispersão.

2. A dispersão conseguida foi então, dividida em 8 tubos de ensaio, com 1 mL do disperso em cada.

3. Através de movimentos circulares lentos e contínuos, secou-se em nitrogênio as 8 amostras até formação de um filme lipídico bem homogêneo e delicado.

4. Procedeu-se a completa remoção dos resíduos da combinação de solventes metanol/ clorofórmio, através de dessecador ligado a uma bomba de vácuo (Quimis), por 12 horas. A remoção dos solventes foi muito bem feita pois, caso sobre residual de solventes junto ao filme lipídico, isto poderia desestabilizar a formulação numa etapa futura. Daí o cuidado que se teve nesta passagem.

5. A solução de rifampicina anteriormente preparada foi então adicionada ao filme lipídico bem lentamente e com agitação suave, a fim de se hidratar todo o filme de forma homogênea e possibilitar uma melhor incorporação do ativo, através da formação dos lipossomas de forma lenta e gradual.

6. A dispersão obtida foi então filtrada através de uma seringa de 1mL e membrana 0,45 µm do tipo Millex® da Millipore. Constituindo-se uma pré-filtração.

7. Promoveu-se a sonicação do filtrado em sonicador de banho, até clarificação.

8. A amostra obtida foi então, passada 17 vezes por um extrusor (Avestin), à temperatura ambiente, dotado de 2 membranas de policarbonato 0,22 µm, a fim de se obter lipossomas de tamanho definido.

4.2.2. Separação da preparação lipossomal

Para a separação da preparação lipossomal dois métodos distintos foram utilizados: gel-filtração e centrifugação.

4.2.2.1. Separação da preparação lipossomal por gel-filtração

4.2.2.1.1. Preparo das microcolunas

1. Ressuspendeu-se e equilibrou-se o Sephadex G50 (Amersham Bioscience), com tampão fosfato pH 7,0, lavando-o 10 vezes.

2. Colocou-se um "disco" de lã de vidro na base de uma seringa plástica

de 1 mL.

3. Todo o volume da seringa foi preenchido com o gel cromatográfico.

4. Então, inseriu-se a microcoluna preparada, dentro de um tubo de ensaio, até que a mesma fique apoiada no topo do tubo.

5. Centrifugou-se a 200 rpm por 1 min em centrífuga refrigerada RC 5C Plus (Sorvall), para removermos o excesso de tampão do gel.

4.2.2.1.2. Separando os lipossomas

1. Transferimos a seringa, que acabou de ser centrifugada para outro tubo de ensaio.

2. Foi aplicado 200 µl de suspensão lipossomal, previamente passada por um pré-filtro do tipo Millex 0,45 µm (Millipore), preenchendo toda a seringa.

3. Centrifugamos novamente a coluna à 200 rpm por 1 min liberando o material lipossomal, que sai da coluna para o tubo de ensaio.

4. Continua-se o processo por mais oito tubos, lavando-se com o tampão em cada uma dessas passagens adicionais. Depois, retorna-se para o primeiro tubo e repete-se todo o procedimento descrito, até que se consiga o volume de amostra desejado.

5. Os lipossomas com rifampicina assim separados, foram conservados através da técnica de liofilização por 24 horas. Dessa forma procurou-se prevenir contra possíveis reações de desestabilização, como

hidrólise, gerada pela água residual existente no meio, o que acabaria por destruir a bicamada do lipossoma, promovendo o extravasamento do seu conteúdo e conseqüente perda da rifampicina encapsulada.

4.2.2.2. Separação da preparação lipossomal por centrifugação

A preparação lipossomal foi centrifugada a 10.000 x g, por 20 minutos e 8 °C, sendo lavada 2 vezes com tampão fosfato pH 7,0.

Os lipossomas transportando a rifampicina, por serem mais pesados que o fármaco livre, sedimentam no fundo dos tubos de centrífuga, os quais foram posteriormente ressuspensos através do uso do vórtex Zx^3 (Velp), nas 2 lavagens com tampão tendo o sobrenadante, onde está o fármaco livre, sempre separado para não interferir na leitura posterior em espectrofotômetro e para não gerar também, um desequilíbrio osmótico em relação ao interior dos lipossomas. Procedeu-se a liofilização.

No capítulo referente a "Resultados" foi realizado estudo comparando-se as técnicas de separação por gel-filtração e centrifugação. Este estudo foi realizado comparando-se diferentes amostras de lipossomas com rifampicina e separando parte daquela amostra por um e a outra parte pelo outro processo, com posterior comparação dos resultados de rendimento, cuja técnica está descrita no item 4.2.2.

4.2.3. Doseamento e avaliação do rendimento do processo

4.2.3.1. Avaliação da estrutura da bicamada

Antes do processo de liofilização, que foi a técnica empregada para conservação e manutenção do nosso produto final, retirou-se alíquota para

se proceder então, o doseamento do fármaco encapsulado. O processo tem início, através do contato do lipossoma com 1 mL de solução de detergente à 1% (Triton–X100) (Vemuri ET. AL., 1994). Essa reação promove a destruição da bicamada lipídica do lipossoma, fazendo com que seja liberado seu conteúdo ativo, o qual foi dosado por espectrofotometria em 475 nm (vide curva de rifampicina, nos "resultados"). Assim, obtém-se o rendimento do processo de encapsulamento, através da comparação entre a concentração da solução inicial de rifampicina, de acordo com o item 4.2.1.3 e, a concentração obtida após tratamento com Triton-X100.

4.2.4. Estudo de estabilidade dos lipossomas de rifampicina "in vitro"

Com o objetivo de se verificar a estabilidade dos lipossomas de rifampicina, após seu preparo e técnica de conservação por liofilização, foi feito este teste de estabilidade que se encontra descrito abaixo.

Foram preparadas 6 amostras de lipossomas carreando rifampicina, segundo técnica de extrusão, anteriormente descrita. Iniciou-se a purificação das amostras por centrifugação, retirando-se os sobrenadantes. Para as 2 lavagens subseqüentes, os "pellets" foram então, ressuspensos em 2 mL de tampão fosfato pH 7,0 lentamente, de forma que não houvesse perigo de rompimento das vesículas lipossomais. Com esse objetivo foi utilizado uma micropipeta automática e lentamente, foi-se "desgrudando" o filme lipídico das paredes dos tubos de centrífuga, re-homogeneizando o material lipídico.

Ao final da segunda lavagem, os sobrenadantes foram novamente retirados e os "pellets" ressuspensos em 2 mL de tampão, usando-se a mesma técnica da micropipeta. As amostras lipossomais foram agora reunidas em um único frasco de centrífuga. Procedeu-se nova centrifugação nas mesmas condições utilizadas para separação dos lipossomas citada acima ou seja, 10.000 x g durante 20 minutos, 8 °C.

Ao final dessa centrifugação, retirou-se o sobrenadante e procedeu-se o doseamento deste em espectrofotômetro à 475 nm. Assim, foi obtida a quantidade de rifampicina livre, existente após o processo de separação das amostras lipossomais por centrifugação. Este valor foi chamado de T_0.

O restante da amostra foi dividido em 9 frascos-ampola tipo âmbar, com cerca de 2 mL de amostra em cada um deles sendo posteriormente pesados, um a um, em balança analítica. Feito isso, estes 9 frascos foram congelados e em seguida foram liofilizados durante 24 horas.

Terminada a liofilização, os frascos foram vedados com "parafilm" exceto um. Este foi novamente pesado, para que se fosse verificado o teor de água retirada durante o processo de liofilização. Os demais frascos foram conservados em congelador. Quanto à água perdida no frasco em separado esta, foi reposta utilizando-se para isso, água Milli-Q. Procedeu-se a homogeinização do conteúdo do frasco, de forma lenta e harmônica. Chegou-se então, novamente à dispersão lipossômica inicial. Esta foi centrifugada, nas mesmas condições utilizadas anteriormente (10.000 x g, 20 min, 8 °C) a fim de se separar o fármaco (rifampicina) não encapsulado dos lipossomas daquele, encapsulado.

A rifampicina não encapsulada que se encontra então, no sobrenadante, foi retirada e doseada em espectrofotômetro à 475 nm, para verificação da quantidade de rifampicina que saiu do lipossoma devido ao processo de liofilização. Esta leitura foi chamada de T_0'.

A partir daí, foram feitas leituras após 1, 2, 4 e 8 semanas usando-se as demais amostras armazenadas no congelador, sempre se aplicando a mesma técnica acima descrita. Todas as leituras foram feitas em triplicata e os valores colocados no capítulo "resultados" são referentes à média destas leituras.

A partir dos resultados finais que foram obtidos, foi construído gráfico mostrando o comportamento dos lipossomas de rifampicina preparados, no que se refere a sua estabilidade.

4.2.5. Validação da metodologia analítica

Para quantificação da rifampicina nas formulações estudadas e nos testes de liberação foi padronizado método espectrofotométrico, baseado em uma modificação do descrito na USP XXI, para que fosse evitada a presença de clorofórmio. Para todos os ensaios de validação foi adotado o esquema de 5 repetições.

4.2.5.1. Espectro de absorção (curva de varredura) da rifampicina

Foram definidos os melhores comprimentos de onda, tendo em vista respostas de melhor linearidade e maior intensidade, através de espectro de absorção da rifampicina que se encontra no capítulo "resultados". Os valores encontrados na curva de varredura foram comparados com os existentes na literatura.

Para obtenção da curva de varredura da rifampicina foi preparada amostra de rifampicina em tampão fosfato de concentração 5 mg/ mL, assim como descrito no item 4.2.1.3, sendo posteriormente lida em espectrofotômetro. O intervalo de varredura utilizado foi de 350-700 nm e o branco, a solução tampão fosfato pH 7,0.

4.2.5.2. Construção da curva padrão ou reta de calibração de rifampicina

4.2.5.2.1. Preparação das soluções

4.2.5.2.1.1.Solução tampão fosfato pH 7,0

Este foi preparado segundo método descrito na Farmacopéia Americana (USP XXV) e já comentado no item 4.2.1.2, referente à produção dos lipossomas de rifampicina.

4.2.5.2.1.2.Soluções de rifampicina

Foram pesados exatamente, 100,0 mg de rifampicina sendo depois transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida, completou-se o volume com tampão fosfato pH 7,0, o qual foi homogeinizado e aquecido à 37 °C, em agitador magnético, segundo técnica já descrita. Esta preparação foi posteriormente colocada em geladeira "overnight", sendo filtrada após. A solução de rifampicina obtida foi chamada de "solução S".

A solução S foi diluída com solução tampão fosfato pH 7,0 obtendo-se soluções de rifampicina nas concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL, sendo chamadas de "soluções R", de acordo com o descrito no Quadro 12.

Quadro 12 – Preparo das soluções de rifampicima para padronização do método espectrofotométrico em que: Solução S → solução de rifampicina contendo 1,0 mg/ mL em tampão fosfato pH 7,0

Soluções de rifampicina (R)	Volume de solução S (mL)	Volume total após diluição com solução tampão (mL)	Concentração final (µg/mL)
R1	0,10	10,0	10,0
R2	0,20	10,0	20,0
R3	0,30	10,0	30,0
R4	0,40	10,0	40,0
R5	0,50	10,0	50,0
R6	0,60	10,0	60,0

4.2.5.2.2.Condições da análise espectrofotométrica

Foram feitas as leituras espectrofotométricas das soluções R em solução tampão nas concentrações de 10,0 a 60,0 µg/mL, empregando os seguintes parâmetros:

- Comprimento de onda (λ) = 475 nm;
- Solução branco (para acerto do "zero" do aparelho) = solução tampão fosfato pH 7,0.

As soluções R de rifampicina foram preparadas como descrito anteriormente.

4.2.5.3. Pesquisa de interferentes (especificidade/ seletividade)

Foram analisadas simultaneamente as soluções R e a solução branco, preparadas como descrito anteriormente. Também, foram verificadas as interferências do detergente Triton-X100 e dos lipossomas vazios na leitura da rifampicina.

As leituras de absorbância das soluções foram realizadas empregando as mesmas condições e parâmetros descritos no item 4.2.5.2.2, acima.

4.2.5.3.1. Análise da interferência do detergente Triton-X100 na leitura da rifampicina

O detergente Triton-X100, utilizado para rompimento das vesículas lipossomais a fim de se liberar seus conteúdos ativos e assim, verificar rendimento do processo de produção através do percentual de encapsulamento, foi testado quanto à possível interferência na leitura. Pegou-se uma amostra de Triton-X100 à 1% em água bidestilada Milli-Q®, mesma concentração de uso para avaliação de encapsulamento por parte dos lipossomas e, realizou-se varredura, zerando o aparelho também com água Milli-Q®. As demais condições para leitura foram adotadas as mesmas do item 4.2.5.2.2.

4.2.5.3.2. Interferência dos lipossomas vazios

Para este teste, foram pesados 500 mg de lipossomas vazios preparados segundo técnica de extrusão, também descrita anteriormente e

completou-se o volume para 10 mL com solução tampão fosfato pH 7,0. Homogeinizou-se a preparação e procedeu-se leitura em espectrofotômetro em 475 nm, zerando o aparelho com o branco.

4.2.5.4. Determinação dos limites de detecção e quantificação

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados utilizando as soluções R e a solução branco preparadas, segundo técnica já descrita.

O Limite de Detecção (LD), representa a menor quantidade que pode ser detectada mas, não necessariamente quantificada, do fármaco em uma amostra, sob condições experimentais. Já o Limite de Quantificação (LQ), representa a menor quantidade de fármaco que pode ser determinada com precisão aceitável, em uma amostra sob as condições do experimento.

As leituras de absorbância das soluções foram realizadas empregando-se as mesmas condições e parâmetros já descritos em 4.2.5.2.2.

Foram feitas três réplicas para cada amostra e foram calculadas, para cada concentração, a média, o desvio-padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Com esses dados, foram obtidos LD e LQ (USP 24ª ed., 1999).

4.2.5.5. Determinação da precisão e exatidão

A "Precisão" está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e é expressa matematicamente pela porcentagem do coeficiente de variacão (%CV), segundo o descrito na USP 24ª ed., 1999.

A "Exatidão" corresponde à variação entre o valor obtido após a análise e o valor real da amostra (USP 24ª ed., 1999).

Para realização dos testes de precisão e exatidão, foram preparadas 6 diluições iguais a partir da solução S (cuja preparação segue o já descrito em 4.2.5.2.1.2). As diluições foram conseguidas adicionando-se 300 µl de solução S a balões volumétricos de 10 mL, completando-se posteriormente os volumes com solução tampão fosfato pH 7,0, cuja técnica de obtenção já foi descrita perfazendo assim, uma concentração final de 30 µg/ mL em cada balão, tendo sido calculados o coeficiente de variação e exatidão, em porcentagem.

As leituras de absorbância das soluções de rifampicina foram realizadas empregando-se as mesmas condições e parâmetros descritos em 4.2.5.2.2.

4.2.6. Obtenção das concentrações de rifampicina nas amostras analisadas

Para obtenção das concentrações de rifampicina foi utilizada a equação da reta obtida através da curva padrão deste princípio ativo, cuja obtenção foi explicada no item 4.2.5.2. As absorbâncias de rifampicina obtidas por espectrofotometria e utilizadas em todos os estudos, inclusive para a obtenção destas concentrações, foram fruto de média e desvio da leitura de 3 diferentes amostras. Para a leitura das amostras de rifampicina lipossomada purificada através da técnica de gel-filtração, devido ao baixo rendimento do processo, foi necessário diluir 1: 10 estas amostras assim obtidas, para possibilitar o mínimo de volume necessário para a técnica espectrofotométrica.

4.2.7.Criofratura

O processo de criofratura utiliza o Freon 22 líquido em banho de nitrogênio líquido, onde uma gota da amostra é congelada de maneira instantânea, não permitindo a formação dos cristais de água, desta forma mantém a integridade do material. A próxima etapa é de fratura desta gota e posterior sublimação da água, formação do filme de carbono e metalização com platina, que dará o contraste eletrônico (Tranum-Jensen, 1988). Estamos utilizando como crioprotetor a trehalose (Sigma). Posteriormente, executa-se a limpeza da réplica com ácido crômico (Madden, 1988). Vide figura 11.

Figura 11 - Fotomicrografia obtida pela técnica da criofratura. Aumento de 22.500X. Neste material observa-se uma grande quantidade de lipossomas dispersos, com um diâmetro médio na faixa de 0,7 µm. A fratura das vesículas não evidenciou a presença de mais de uma lamela em cada lipossoma, levando a entender que são LUV. Fonte: LIMA, 1995.

5. RESULTADOS

5.1. Validação da metodologia analítica

5.1.1. Espectro de absorção (Curva de varredura) de rifampicina

Através da técnica de espectrofotometria de varredura, verificou-se, como descrito na USP XXI, que o pico da rifampicina está em 475 nm. A curva de varredura, pode ser visto na Figura 12.

5.1.2. Curva padrão de rifampicina

Seguindo-se o que foi descrito no item 4.2.5.2.1.2 de "Material e Métodos", foram preparadas várias soluções com diferentes concentrações a partir de uma solução de rifampicina S. Estas diferentes soluções foram lidas em espectrofotômetro a 475 nm. Podemos ver o resultado destas leituras na Tabela 01 assim como, a curva padrão de rifampicina resultante na figura 13.

Tabela 01 – Valores de absorbância observados em 475 nm para solução contendo 1 mg/ mL em solução tampão fosfato, conforme descrito no item 4.2.5.2.1.2, "Material e Métodos" e após 5 repetições

Concentração de rifampicina (µg/mL)	Absorbância (em 475nm)
10,0	0,3790
20,0	0,5000
30,0	0,6232
40,0	0,7569
50,0	0,8680
60,0	1,0412

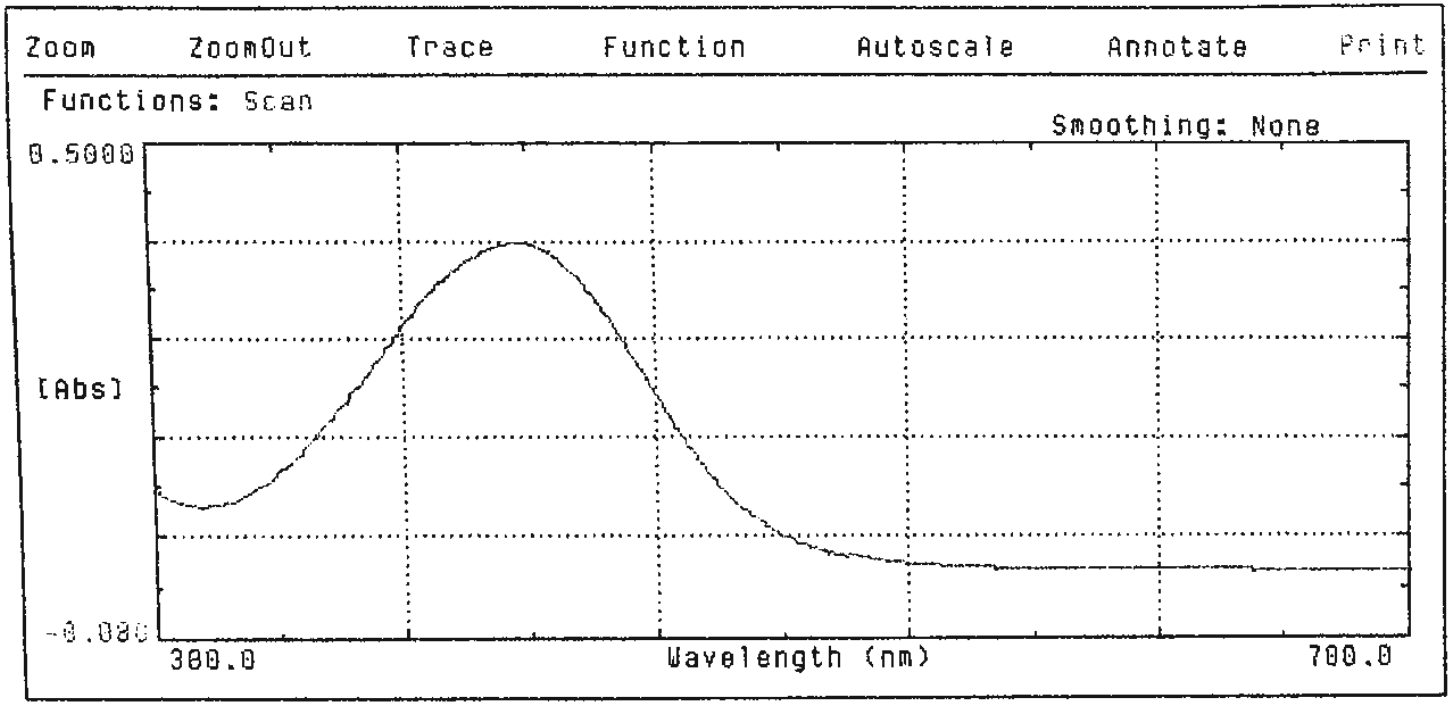

Figura 12 – Espectro de absorção da rifampicina em tampão fosfato pH 7,0 de concentração 5 mg/ mL.

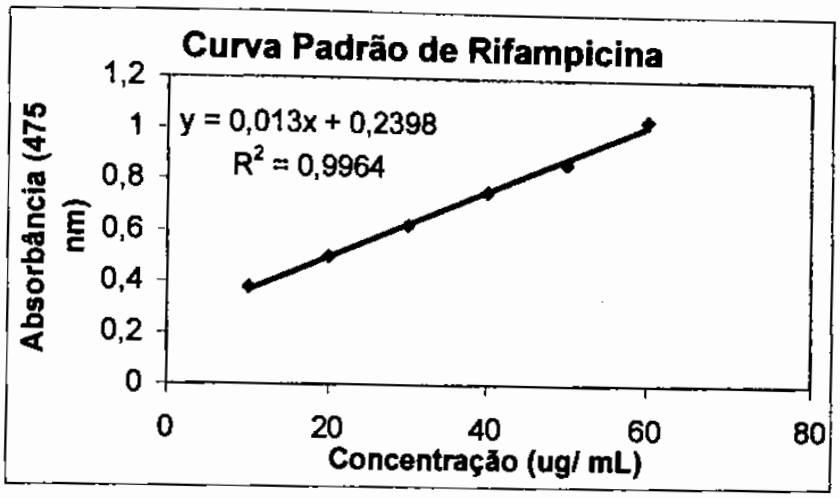

Figura 13 – Curva padrão de rifampicina

5.1.3. Pesquisa de interferentes (especificidade/ seletividade)

5.1.3.1. Influência dos lipossomas vazios na leitura

Os lipossomas vazios não apresentaram leitura, quando submetidos ao espectrofotômetro sob comprimento de onda de 475 nm, que é o comprimento de onda de leitura da rifampicina, como descrito na Figura 12, acima. Isto indica que eles não interferiram nas leituras da rifampicina.

5.1.3.2. Influência do detergente Triton® - X100 na leitura

Foi verificado o grau de influência que o detergente Triton® - X100 teria nas leituras das amostras. A espectrofotometria de varredura mostrou ausência de picos no gráfico, estando a curva do detergente em 475 nm, sobre a linha base do gráfico revelando a baixa interferência que o

detergente utilizado, para rompimento das vesículas lipossomais, exerce sobre os resultados dos doseamentos de rifampicina.

5.1.4. Determinação da precisão e exatidão

Tabela 02 – Valores de absorbância observados em 475 nm para solução contendo 30 µg/ mL de rifampicina em solução tampão fosfato, conforme descrito no item 4.2.5.2.2 de "Materiais e Métodos"

Tubo	Absorbância (em 475nm)
1	0,6625
2	0,6950
3	0,6721
4	0,6846
5	0,7027
6	0,6887
	média = 0,6842
	desvio padrão = 0,0148

Tabela 03 – Resultados da validação do método espectrofotométrico de acordo com metodologia descrita no item 4.2.5

Parâmetros	Resultados
Equação da reta de calibração	y = 0,013x + 0,2398
Coeficiente de correlação	0,9964
Limite de detecção	0,7364223µg/mL
Limite de quantificação	2,231583µg/mL
Precisão	2,16424%
Exatidão	86,9143%

5.2. Detecção da presença do lipossoma

Durante o processo de separação pelo método de gel-filtração dos lipossomas veiculando a rifampicina, é fundamental se descobrir em que etapa deste processo os lipossomas estão saindo. Em outras palavras, como o processo de separação envolve sucessivas centrifugações e lavagens com tampão assim, como descrito no item 4.2.2 de "Material e Métodos", podemos perceber que o lipossoma migra dentro da microcoluna cromatográfica, à medida que vou centrifugando e fazendo as lavagens, até que em um determinado ponto, ele atravessa toda a seringa e é recolhido no tubo de centrifugação. Saber este exato momento ou seja, aonde a amostra está é portanto fundamental. Para se detectar este "ponto de saída", se toma necessário o doseamento de todos os tubos usados na purificação, de forma que se procure dosear o fármaco que está encapsulado no interior dos lipossomas para isso, promove-se o rompimento das vesículas lipossomais através do tratamento com detergente como já foi descrito no capítulo 4, "Material e Métodos", a fim de se liberar o fármaco. Em nosso caso, foram usados 10 tubos por amostra.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tabela 04 – Detecção da presença dos lipossomas durante o processo de separação por gel-filtração (sem adição de detergente Triton – X100). As amostras foram diluídas 1 : 10, para possibilitar a leitura

Tubo	Absorbância (475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mL)
1	0,323	64,0000
2	0,379	107,0760
3	0,380	107,8460
4	0,373	102,4610
5	0,373	102,4610
6	0,372	101,6920
7	0,375	104,0000
8	0,372	101,6920
9	0,360	92,4610
10	0,371	100,9230

Tabela 05 – Detecção da presença dos lipossomas durante o processo de separação por gel-filtração (após adição de detergente Triton – X100)

Tubo	Absorbância (475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mLde amostra sem Triton-X100)
1	0,100	-1,0753
2	0,134	-0,8138
3	**0,722**	**370,9230**
4	0,134	-0,8138
5	0,120	-0,8921
6	0,200	-0,3061
7	0,122	-0,9061
8	0,130	-0,8446
9	0,116	-0,9523
10	0,115	-0,9600

5.3. Avaliação dos processos de separação

Foi feito um estudo comparativo relacionando as amostras de lipossomas separadas pela técnica de gel-filtração e centrifugação (tabelas de 06 a 09).

5.3.1. Absorbância antes da quebra por detergente Triton – X100

Tabela 06 – Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica do gel-filtração. As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura

Amostra	Absorbância (475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mL)
1	0,450	161,6920
2	0,389	114,7692

Tabela 07 – Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da centrifugação. As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura

Amostra	Absorbância (475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mL)
1	0,7777	413,769
2	0,4173	136,5384

5.3.2. Absorbância após quebra por detergente Triton – X100

Tabela 08 – Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da gel-filtração. As amostras foram diluídas 1: 10, para se possibilitar a leitura. Após a adição de mais 1 mL de solução de Triton, a diluição final ficou 1 : 15

Amostra	Absorbância (em 475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mL)
1	0,8250	675,2307 (E = 13,5%)
2	0,6000	415,6153 (E = 8,3%)

E → percentual de encapsulamento de rifampicina nos lipossomas

Tabela 09 – Absorbância de duas amostras de rifampicina lipossomada, quando realizada separação dos lipossomas obtidos pela técnica da centrifugação. As amostras foram diluídas 1 : 10, para se possibilitar a leitura. Após a adição de mais 1 mL de solução de Triton, a diluição final ficou 1 : 15.

Amostra	Absorbância (em 475nm)	Concentração de rifampicina (µg/mL)
1	0,8359	687,8076 (E = 13,74%)
2	0,8187	667,9615 (E = 13,34%)

E → percentual de encapsulamento de rifampicina nos lipossomas

5.4. Estudo de estabilidade dos lipossomas de rifampicina "in vitro"

O processo de liofilização gerou em média, uma perda de 10% em peso em relação ao período anterior ao processo, nas amostras lipossomais. Isto se deveu à perda de água durante a liofilização.

Os resultados das leituras espectrofotométricas referentes ao teste de estabilidade se encontram abaixo:

Tabela 10 – Leituras das amostras referentes ao teste de estabilidade

Amostra*	Absorbância (λ = 475 nm)	Concentração (µg/mL)
1 (T_0)	0,6795	33,8230
2 (T_0')	0,7887	42,2230
3	0,93095	53,1653
4	0,9657	55,8384
5	0,9769	56,6931
6	0,9769	56,7020

*amostra 1: dispersão I (lipossoma com rifampicina antes da liofilização) (T_0).

amostra 2: dispersão I liofilizada (T_0').

amostras 3 em diante: amostragens após 1, 2, 4 e 8 semanas como descrito no item 4.2.4 do capítulo "Material e Métodos".

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Montagem e estruturação do laboratório

Para que o projeto tivesse seu início, foi necessário em primeiro lugar, a montagem e instalação do laboratório no que se refere a materiais e equipamentos, de forma que se tornasse possível o trabalho com lipossomas. Foi tremendamente importante ter tido a oportunidade de vivenciar ativamente esta fase inicial, tendo participado do planejamento, das compras e da estruturação final, embora tenha sido trabalhoso e tenha nos custado um bom tempo. Mas tudo isso, resultou em um aprendizado precioso e gratificante.

6.2. Adaptação de metodologia

Uma vez que era a primeira experiência do laboratório em lipossomas, nós não tínhamos um anterior, uma base a seguir. Logo, toda a metodologia foi adaptada e otimizada durante a realização do projeto, baseando-se no conhecimento conseguido através de literatura especializada e em estágio de aperfeiçoamento no Laboratório de Lipossomas e Microesferas do Instituto Butantan, onde obtivemos as bases da obtenção de lipossomas pela técnica da extrusão porém, veiculando amostras de natureza bem diferente da qual foi utilizada neste projeto.

6.3. Mecanismo de encapsulamento do fármaco no interior dos lipossomas

Este processo é baseado no experimento de Van Milden, o qual incorporou carboxifluoresceína (CF) em lipossomas, num meio aquoso.

"A medição do fluxo de CF dentro das membranas começa com a adição de CF. Se a incubação com CF começa 1 hora após a reconstituição com água, um aumento significante no fluxo de CF pode ser observado durante um período de 28 horas. Se a incubação com CF começa 24 horas após a reconstituição com água, somente um pequeno fluxo de CF acontece. Após esse tempo, a restauração da integridade da camada dupla termina, resultando num máximo de impermeabilidade" (Figura 14).

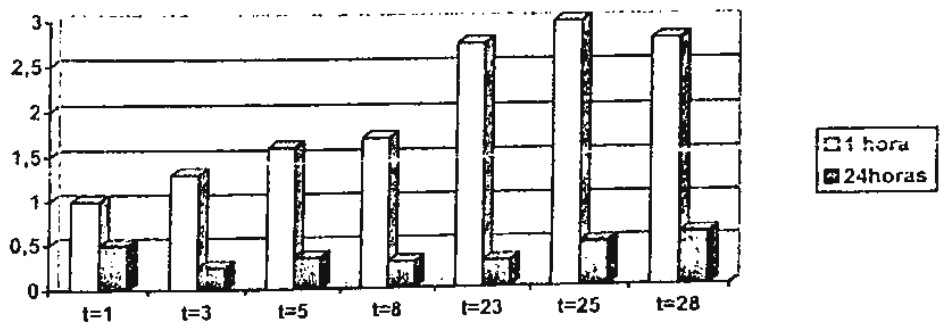

Figura 14 – Reconstituição de lipossomas com CF. Fonte: SP Farma Ltda.

Podemos concluir então, que uma taxa máxima de encapsulação pode ser conseguida pela incubação imediata do lipossoma com uma solução do ativo. Os resultados indicam claramente que é quase impossível carregar dispersões de lipossomas vazios, já formados, uma vez que sua bicamada já se encontra impermeável e íntegra.

6.4. Sistema de separação dos lipossomas por gel-filtração

No capítulo 5, "Resultados", foi comentado a respeito do sistema de separação por gel-filtração quando comparado com a centrifugação. Além do que foi exposto anteriormente, a gel-filtração apresenta outros "inconvenientes", tornando-a no geral, uma técnica de difícil realização.

O primeiro problema, já ocorre na escolha da coluna cromatográfica. Devemos definir qual o tamanho de partículas que iremos gel-filtrar, para que o material de interesse consiga ser separado dos demais. Passando esta etapa, outra dificuldade que surge é a montagem da coluna. No caso deste projeto, trabalhamos com microcolunas em seringas de 1 mL mesmo assim, tivemos grandes problemas para evitar a formação de bolhas de ar no interior da coluna, o que interfere de forma significativa, durante o processo de separação da amostra. Além disso, esta preparação das colunas é lenta, uma vez que a orientação dada pelo fornecedor era que o gel Sephadex (Amersham Bioscience) deveria ser hidratado e lavado com tampão várias (10) vezes, antes da montagem das colunas.

Já na separação propriamente, a grande dificuldade que encontramos foi a lentidão do processo, uma vez que a amostra demora para atravessar a coluna de separação (daí a necessidade da centrifugação), gerando grandes dificuldades para a aplicação da amostra no topo da coluna. Isto, quando não ocorre entupimento, promovendo a perda da coluna.

O processo de passagem forçado conseguido com a centrifugação mostrou bons resultados, mas percebemos grave possibilidade de contaminação cruzada das amostras, uma vez que este sistema de gel-filtração em microcolunas é aberto. Poderíamos pensar em um sistema de fechamento do tipo papel filme ou laminado, porém isto aumentaria ainda mais o tempo do processo que já é grande.

Esta possibilidade de contaminação inviabiliza no nosso entendimento, o trabalho com mais de uma amostra ao mesmo tempo, inviabilizado também, pela grande quantidade de tubos de centrífuga

necessários, devido às várias lavagens com tampão, para promover o deslocamento do material que está sendo separado na coluna.

Apesar de toda a dificuldade na preparação das microcolunas esta, deve ser montada toda vez que for se processar o processo de gel-filtração. Pois, embora existam técnicas de limpeza da coluna para reutilização posterior, esta é muito complicada, pois deve-se manter a coluna em geladeira e mantê-la sempre hidratada pois, caso contrário ocorre rachaduras no gel. Outro problema é a contaminação microbiana dessas colunas.

Até aonde nossa experiência nos proporcionou, não restam dúvidas das vantagens da centrifugação em relação à técnica de gel-filtração, sendo a primeira, muito mais rápida, fácil e prática.

Com relação ao rendimento desta técnica, foram feitas várias tentativas no intuito de melhorá-la. O problema está ligado principalmente a inviabilidade de se processar toda a amostra, devido ao tempo total do processo e à quantidade de amostra que pode ser introduzida, por passagem, na coluna cromatográfica. Apenas 200 µl.

Portanto, embora tivéssemos uma amostra de 2 mL, ficava totalmente inviável a separação de toda ela, em virtude da lentidão do processo, também justificado pelo número de lavagens necessárias com tampão. Aliado a isto, como agente complicador, tem que a amostra era sensível ao calor, portanto não podia ficar muito tempo exposta ou deveria ser mantida em gelo. Também, era impossível proceder a separação em vários dias em virtude do curto período de validade do lipossoma após, reconstituição aquosa (aproximadamente, 7 dias).

Uma das tentativas de se melhorar isso, foi dividir a amostra, de forma que pudéssemos centrifugar várias frações da mesma amostra ao mesmo tempo. Assim, teoricamente, conseguiríamos processar mais amostra num intervalo mais curto de tempo. Porém, na prática isto ficou totalmente inviável pois, o tempo gasto entre as etapas e o número de tubos de centrífuga necessários aumentaram ainda mais.

6.5. Avaliação de concentração de rifampicina pela técnica da espectrofotometria

A metodologia espectrofotométrica foi validada para nosso fármaco de estudo, a rifampicina, baseando-se no descrito na USP XXI, com algumas modificações. A validação nos forneceu ferramentas que possibilitaram os doseamentos das amostras assim como, o estudo de estabilidade da formulação lipossomal.

6.6. Detecção do ponto de saída do lipossoma durante o processo de gel-filtração

No capítulo 5, "Resultados", colocamos a técnica empregada para se encontrar o ponto de saída da amostra lipossomal. Pela tabela 05, podemos perceber que entre o doseamento da amostra anterior e após o tratamento com detergente (Extram®), ocorre um aumento da concentração de rifampicina na 3ª leitura.

Isto, nos leva à dedução de que ocorreu a saída do lipossoma da coluna de Sephadex® (Amersham Bioscience) no 3º tubo de centrífuga, demonstrado pelo aumento do teor de fármaco revelando assim, que neste tubo, deve ter ocorrido a destruição da bicamada lipídica pelo detergente, com consequente liberação do fármaco (rifampicina), que estava no seu interior.

6.7. Presença, estrutura e integridade da bicamada lipossomal

Analisando as tabelas de 6 a 9, tendo especial atenção para as diferenças entre as leituras antes e após o tratamento da amostra com detergente, podemos concluir, como exposto no item anterior que antes da aplicação da solução de detergente havia uma quantidade de rifampicina no meio da amostra e após este tratamento, ocorreu elevação no teor de rifampicina livre na amostra, revelando que antes do detergente esta rifampicina estava "escondida" em algum lugar. Com a adição do detergente, este "esconderijo" é desfeito e assim, a rifampicina antes escondida, reaparece.

Diante desta observação experimental, podemos inferir que o esconderijo da qual citamos acima se trata na verdade dos lipossomas, que retém o fármaco em seu interior por isso, ele não aparece no doseamento, porém quando suas paredes são rompidas, a rifampicina aparece, aumentando o teor do fármaco no meio que está sendo dosado. Isto nos dá a certeza da real formação e presença de lipossomas no meio de amostra. Além disso, esta informação nos permite também, ter uma noção da integridade das bicamadas lipossomais, devido á diferença de concentração de rifampicina antes e após a ação do detergente.

6.8. Estudo de estabilidade da rifampicina em lipossomas

Aparentemente, como mostrado na tabela 10, do capítulo de "Resultados", o teste indicou para a boa estabilidade do produto conseguido, havendo pouca perda após o processo de liofilização, ressaltando a importância do crioprotetor, trehalose, para o processo.

6.9. Criofratura

Como descrito no item 4.2.7 de "Material e Métodos", estamos iniciando testes submetendo os lipossomas de rifampicina obtidos, à técnica de microscopia por criofratura. Estes testes são bastante úteis embora laboriosos pois, permitem a visualização em detalhes das estruturas lipossomais.

7. Conclusão

De acordo com o que foi exposto, podemos concluir que foi possível a obtenção de lipossomas através da metodologia empregada. Além disso, também podemos verificar que estes lipossomas foram capazes de englobar o tuberculostático rifampicina, nosso fármaco de estudo, que se encontrava em meio de tampão fosfato pH 7,0, mantendo sua parede fosfolipídica íntegra no final do processo.

Quanto ao rendimento do processo como um todo, envolvendo as etapas de produção e separação, verificamos que este é melhor, quando usamos a técnica de centrifugação, pelo menos para o fármaco testado e com lipossomas de constituição semelhante ao usado em nossos experimentos. Talvez amostras e lipossomas de outra natureza possam ter bons resultados quando separados por gel-filtração, como inclusive encontramos descrito na literatura especializada.

Os testes de estabilidade físico-química realizados apontaram para a estabilidade a longo prazo dos lipossomas obtidos.

A expectativa é grande para o prosseguimento dos estudos iniciados com este trabalho, durante o doutorado. Nessa continuidade poderemos aperfeiçoar ainda mais a metodologia e técnica de produção e separação de lipossomas, assim como concluir os testes de criofratura, testando a real eficácia da rifampicina lipossomada em doses diminuídas, na atividade tuberculostática, através de testes de MIC (Concentração Inibitória Mínima) assim como, com testes efetuados "in vivo", reafirmando todos os benefícios que um medicamento como este pode vir a trazer, cuja ação está sendo possivelmente potencializada e melhor direcionada graças ao sistema de liberação modificada conseguida pela vetorização em lipossomas, se caracterizando numa forma farmacêutica extremamente moderna, atual e essencial para o controle do desenvolvimento e tratamento da tuberculose nos dias de hoje minimizando assim, o sofrimento de tantos, doentes e familiares e porque não, de nós enquanto seres humanos e profissionais de saúde, que acabamos também por sofrer com o sofrimento de nossos doentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr, L.V. Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos: Trad. De Terezinha Oppido e outros. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p. (Farmácia).

2. ASSIS, M.A. Resolução de (+/-)-2-amino-1-butanol: precursor para obtenção de etambutol. São Paulo, 2001. 91p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

3. BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science, Washington, v. 257, p.1055-64, 1992.

4. BLUME, G.; CEVEC, G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v.1029, p.91-97, 1990.

5. BURI, P.; PUISIEUX, F. Formes pharmaceutiques nouvells: aspects technologique, biopharmaceutique e medical. S.l.: Lavoisier, 1985. 687p.

6. CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v.172-179, 1983.

7. CENTRO de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Tuberculose. São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde, 1998.

8. CHONN, A.; CULLIS, P.R. Recent advances in liposomal drug- delivery systems. Curr. Opin. in Biotechnol., v.6, p.698-708, 1995.

9. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA - FNS – MS. Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília, 1995.

10. CROMMELIN, D.J.A. Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes. J. Pharm. Sci., Washington, v.73, p.1559-1563, 1984.

11. FATTAL, E.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Méthodes de preparation des liposomes. In: DELATTRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., HILIPPOT, J.R., SHUBER, F. Les Liposomes: aspects tecnologiques, biologiques et pharmacologiques. Paris: Inserm, 1993.

12. FIOCRUZ. Fundação Osvaldo Cruz. Tuberculose. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/tuberculose.htm. Acesso em: 2 novembro 2003.

13. FORNÉS, J.A.; PROCÓPIO, J. Influence of cholesterol on the surface charge density and surface potential of lipid bilayer membranes. J. Colloid Interf. Sci., Orlando, v.117, n.2, p.570-573, 1987.

14. FRY, D.W.; WHITE, J.C.; GOLDMAN, I.D. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. Anal. Biochem., v.90, p.809-815, 1978.

15. FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. Disponível em: http://www.funasa.gov.br. Acesso em: 2 novembro 2003.

16. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – MS. Plano nacional de controle da tuberculose. Brasília, 1999, 184p.

17. GOBLE, M. Drug resistance. In: FRIEDMAN, L.N. Tuberculosis current concepts and treatment. Washington: CRC Press, 1994.

18. GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. Trends in Biotechnology, v.13, p.527-537, dec., 1995.

19. ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. N. Engl. J. Med., Boston, v.329, p.784-91, 1993.

20. JOUSMA, H.; TALSMA, H.; SPIES, F.; JOOSTEN, J.G.H.; JUNGINGER, H.E.; CROMMELIN, D.J.A. Characterization of Liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. Int. J. Pharm., Amsterdam, n.35, p.263-274, 1987.

21. JULIANO, R.L. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated drugs. In: KNIGHT, C.G. Liposomes: from physical structure to therapeutic applications. Amsterdam: Elsevier, 1981.

22. LIMA, E.M. Lipossomas: estrutura, propriedades, aplicações. São Paulo, 1995. 209p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

23. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of biochemistry. 3. ed. New York: Worth, 1993. 1013p.

24. MAIERHOFER, G. Liposomas. Introducción a una nueva tecnologia y descripción de técnicas preparativas. Farm.Clín., Barcelona, v.5, n.9, p.658-680, 1998.

25. MEMOLI, A.; PALERMITI, L.G.; TRAVAGLI, V.; ALHAIQUE, F. Egg and soya phospholipids – sonication and dialysis: a study on liposome characterization. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.117, p.159-163, 1995.

26. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Manual de Normas para o Controle da Tuberculose, 1995.

27. NARAIN, J.P.; RAVIGLIONE, M.C.; KOCHI, A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. Tuberc. Lung Dis., London, v.73, p. 311-21, 1992.

28. NEW, R.R.C. Liposomes: a pratical approach. Oxford: IRL Press, 1990. 301p. (The Practical Approach).

29. OLIVEIRA, A.G..; SCARPA, M.V.; LEITE, C.Q.F. Lipossomas: estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento intracelular de fármacos com efeito antimicobacteriano. Rev.Ciên. Farm., São Paulo, v.18, n.1, p.109-121, 1997.

30. PIERRI, E.G.; GREMIÃO, M.P.D. Métodos de preparação de lipossomas. Infarma, Brasília, v.11, n.9/10, p.60-66, 1999.

31. PRISTA, L.N.; ALVES, A.O.; MORGADO, R. Novos Sistemas Terapêuticos. In: PRISTA, L.N.; ALVES, A.O.; MORGADO, R. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3.ed. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbenkian, 1981. v.3., p.2055-2083.

32. PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Vetorização de Fármacos. Cad. Port., v. 4, n. ½, p. 29-50, 1988.

33. RAVIGLIONE, M.C. Assessment of worldwide tuberculosis control. The Lancet, London, v. 350, p. 624-29, 1997.

34.REICHMAN, L.B.; HERSHFIELD, E.S. Tuberculosis: a comprehensive international approach. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993.

35.ROUSER, G.; FLEISCHER, S.L.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination by phosphorus analysis of spots. Lipids, v.5, p. 494- , 1970.

36.SNIDER, D.E.Jr.; RAVIGLIONE, M.; KOCHI, A. Global burden of tuberculosis. In: BLOOM, B.R. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM Press, 1994. p.3-11.

37.UNITED STATES OF PHARMACOPOEIA. 25.ed. United States Pharmacopeial Convention, 2002. 2675p.

38.UNITED STATES OF PHARMACOPOEIA. 24.ed. United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.2231-2232.

39.UNITED STATES OF PHARMACOPOEIA. 21.ed. United States Pharmacopeial Convention, p.944.

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

41.VEMURI, S.; RHODES, C.T. Separation of liposomes by a gel filtration chromatographic techinique: a preliminary evaluation. Pharmaceutica Acta Helvetiae, v.69, p.107-113, 1994.

42.WALASH, M.I.; BELAL, F.; METWALLY, M.E.; HEFNAWY, M.Mt. Spectrophotometric determination of rifampin in the presence of its degradation products in pharmaceutical preparations. Analytical Letters, Mansoura, v.26, n.9, p.1905-1917, 1993.

43.WEINER, N.; MARTIN, F.; RIAZ, M. Liposomes as a drug delivery system. Drug. Dev. Ind. Pharm., New York, v.15, n.10, p.1523-1554, 1989.

44.WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment of tuberculosis. Guidelines for national programmes. Geneve, 1998, 78 p.

45.WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. Fact sheet, Geneve, n. 104, 1998, 4p.

46.WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antituberculosis drug resistance in the world, Geneve, 1998, 290p.

47.WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is DOTS? A guide to understanding the WHO recomended TB control strategy known as DOTS. Geneve, 1999, 41p.

48.WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. WHO report 2000, Geneve, 2000, 187p.