

VETORIZAÇÃO INTRACELULAR DE FÁRMACOS EM INFECÇÕES BACTERIANAS, ATRAVÉS DE LIPOSSOMAS.

ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA*

MARIA VIRGÍNIA SCARPA**

* Doutor em Ciências (Bioquímica) pelo IQ-USP, São Paulo;
Livre-docente em Farmacotécnica pela FCF-Unesp, Araraquara, São Paulo.

** Mestre em Química Analítica pelo IQ-Unesp, Araraquara, São Paulo;
Doutoranda em Ciências (Bioquímica) pelo IQ-USP, São Paulo;
Prof. Assistente disciplina de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos.
Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Unesp. Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 - 14.801-902 - Fone 232.0200 R.261

Introdução

A pesquisa em tecnologia farmacêutica tem modificado drasticamente seu enfoque, nas últimas décadas, principalmente, em razão da forte integração multidisciplinar, em particular com a área biológica. Até o final dos anos 60, o enfoque restringia-se a simples inclusão de substâncias ativas em veículos ou excipientes, com os quais encontravam-se homogeneamente misturadas.

Com a introdução do conceito de biodisponibilidade, houve uma reorientação significativa nos rumos da pesquisa na área farmacêutica, surgindo uma preocupação direta, de um lado, com os parâmetros físico-químicos relacionados com a solubilidade e estabilidade e, de outro, com o destino do fármaco, após a administração "in vivo".

Assim, surgiram novos sistemas de veiculação

de fármacos, entre os quais os "Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos" (*Controlled Drug Delivery System*), cuja preocupação fundamental inclui o estudo da velocidade de liberação do fármaco no sítio de administração. Com 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 vão muito além daquilo a 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, alta concentração de fármaco diretamente no local onde devem

exercer seu efeito farmacológico.

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.

Particularmente, 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).

Conceitualmente, os lipossomas são considerados agregados supramoleculares de compostos anfifílicos, cuja estrutura é constituída de uma ou mais camadas concêntricas de bicamadas lipídicas, alternadas por fases aquosas e contendo um compartimento aquoso central. Como componente estrutural, geral-

mente contém fosfatidilcolina (PC) de ovo ou de soja ou outro componente capaz de formar bicamadas.

Na maioria das preparações, a PC está associada a certa concentração de colesterol, cuja função principal é tornar o agregado menos dinâmico, o que implica na diminuição da permeabilidade da bicamada, proporcionando maior retenção de substâncias ativas hidrofílicas no compartimento aquoso e maior estabilidade nos fluidos biológicos.

A propriedade anfifílica do componente estrutural permite a incorporação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, por diferentes mecanismos, entre os quais a solubilização no compartimento aquoso, partição na bicamada lipídica, interação eletrostática ou acoplamento químico na superfície da estrutura (*figura 1*). A grande variedade de métodos usados na obtenção desses agregados tem permitido dimensionar lipossomas de diferentes tipos, tamanhos e estabilidade, o que tem permitido diferentes possibilidades de aplicações como sistemas transportadores de fármacos.

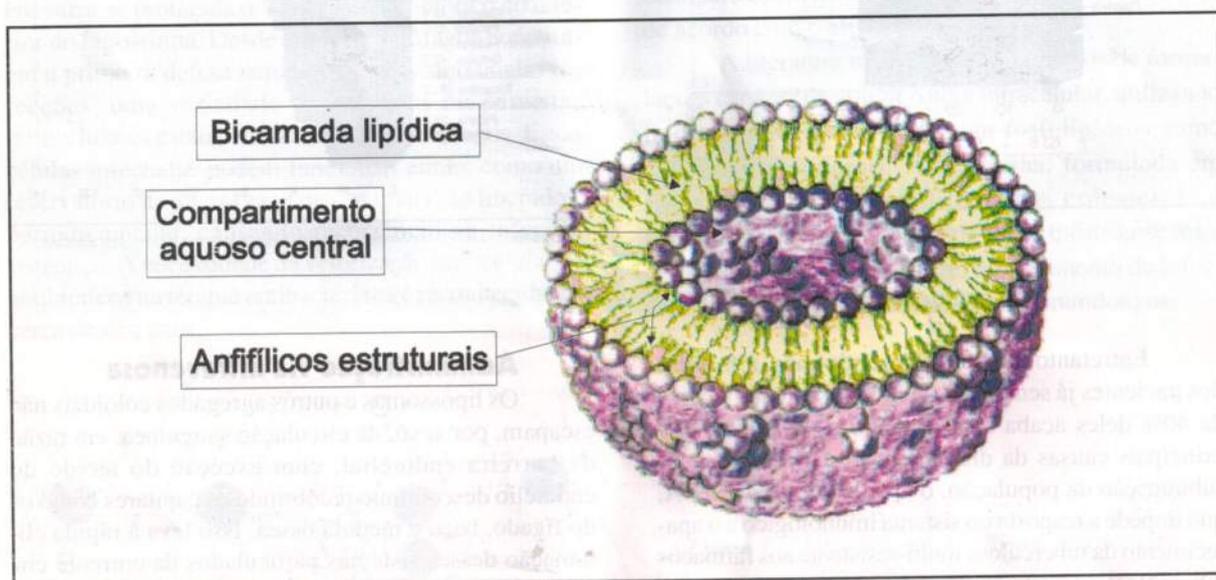


Figura 1 - Estrutura de lipossoma unilamelar

Para um fármaco livre, sua absorção e distribuição pelo organismo é diretamente dependente 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 esses é que entram em contato direto com o sistema biológico.

Dessa forma, é possível desenvolver-se sistemas transportadores com diferentes finalidades, entre as quais a de liberar substâncias farmacologicamente ativas diretamente no interior de células. Isso adquire uma especial importância no tratamento de doenças cujos microrganismos, em alguma fase da doença, desenvolvem-se no interior das células. Doenças infecciosas, tais como as provocadas por certos protozoários, vírus, fungos e bactérias, são intracelulares e envolvem células do MPS.

Tuberculose

O controle de endemias em países de Terceiro Mundo encontra obstáculos decorrentes de sucessivas crises sociais, onde a prevenção e tratamento são seriamente prejudicados. Entretanto, a tuberculose, que praticamente havia sido erradicada nos países desenvolvidos, renasceu associada à existência de doenças imunodepressoras, como a SIDA e, atualmente, representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo.

A Organização Mundial de Saúde tem registrado, anualmente, o aparecimento de cerca de 10 milhões de casos novos com 1/3 de óbitos. O problema torna-se dramático se considerarmos que cada doente é capaz de contaminar outras 3-5 pessoas. No Brasil, a incidência média encontra-se na faixa de 57,2 casos por 100 mil habitantes (*Figuras 2 e 3*). Dados do Ministério da Saúde mostram que o Estado do

Rio de Janeiro registra o maior número de casos (126,8/100 mil), São Paulo encontra-se na média (57,2/100 mil) e que Goiás apresenta a menor incidência do país (25,1/100 mil). O número oficial de casos registrados pelo Ministério da Saúde é de 80 mil, estimando-se em cerca 20 mil os casos ainda não registrados.

Os esquemas de tratamento, de primeira escolha, para tuberculose pulmonar e extra-pulmonar (exceto a meningite tuberculósica), recomendados pela Organização Mundial de Saúde, envolvem cerca de 2 meses de tratamento com isoniazida rifampicina e pirazinamida e na seqüência 4 meses com com rifampicina e isoniazida. Como fármacos de segunda opção são utilizados a estreptomina, etionamida, etambutol, cicloserina e ácido p-aminossalicílico, geralmente menos potentes a mais tóxicos que os de primeira escolha. Esse esquema, para ser eficaz, deve ser seguido pelos seis meses de tratamento.

Distribuição da tuberculose

BRASIL 57.2/100,000

Por região

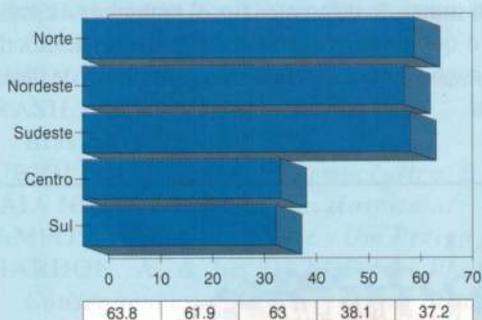


Figura 2- Distribuição de casos de tuberculose no Brasil, por região.

DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE

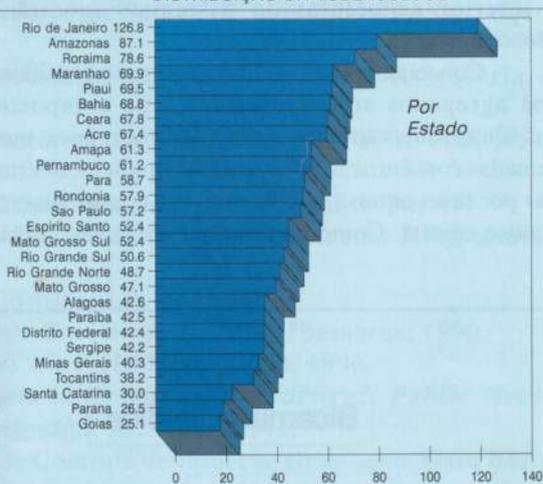


Figura 3- Distribuição de casos de tuberculose no Brasil, por Estado.

Entretanto, como no segundo mês, a maioria dos pacientes já sente uma melhora acentuada e cerca de 40% deles acaba abandonando o tratamento. As principais causas da disseminação da doença são a subnutrição da população, o aparecimento da SIDA, que impede a resposta do sistema imunológico e o aparecimento da tuberculose multi-resistente aos fármacos tuberculostáticos disponíveis.

A tuberculose é um exemplo concreto de doença que, uma vez implantada, tem os bacilos localizados principalmente no interior dos monócitos, células fagocitárias e células gigantes. A localização intracelular é justamente um dos fatores que dificultam acentuadamente o tratamento e favorecem a persistência microbiana. A extraordinária resistência da tuberculose crônica à quimioterapia pode ser atribuída principalmente à terapia inadequada ou imprópria de pacientes inicialmente susceptíveis ao medicamento.

Esse aspecto pode estar relacionado com a inabilidade de certos fármacos em penetrar intensamente no interior das células ou por exibirem baixa atividade antimicrobiana no pH ácido dos lisossomas. Neste caso, a utilização dos lipossomas e outros transportadores coloidais de fármacos são de óbvia relevância, pois as possibilidades de aplicações são amplas e permitem atingir os agentes patogênicos por diversas vias de administração:

Administração 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 recobrimo os capilares como os do fígado, baço e medula óssea. Isso leva à rápida eliminação desses sistemas particulados da corrente circulatória, através de sua captura pelas células do MPS. Esse comportamento também corresponde ao perfil de distribuição da maioria das bactérias responsáveis por infecções intracelulares, tais como o *Mycobacterium tuberculosis*.

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos podem atingir diretamente a bactéria no interior da célula, em razão de sua habilidade em penetrar por endocitose, formando os fagossomas, que se fundem com os lisossomas. Isso demonstra que esses sistemas podem constituir um eficiente meio para a liberação intracelular de antibióticos.

Alguns estudos relativos à interações de lipossomas com o MPS levaram a se estabelecer algumas conclusões:

1- Majoritariamente, o órgão responsável pela remoção dos lipossomas da corrente circulatória é o fígado, através das células de Kupffer, 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

las, que foram os canais sanguíneos. O baço e 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, mas esta captura aumenta dramaticamente, se os lipossomas contiverem marcadores com capacidade de ligarem-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.

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

Vários exemplos descritos na literatura, apresentados na seqüência, mostram a habilidade dos lipossomas na vetorização de fármacos e com vantagens terapêuticas no tratamento de infecções intracelulares.

A dificuldade de erradicação da maioria das infecções intracelulares reside no fato de que a bactéria encontra-se protegida do acesso do antibiótico no interior do fagossoma. Desde que os macrófagos constituem a primeira defesa natural do organismo contra infecções, uma variedade de bactérias ou parasitas intracelulares estão localizadas nos macrófagos. Essas células infectadas podem funcionar, então, como um reservatório de microrganismo, os quais são liberados, periodicamente, causando recorrência na infecção sistêmica. A necessidade da vetorização intracelular de antibióticos na terapia antibacteriana é reconhecida, há cerca de dez anos.

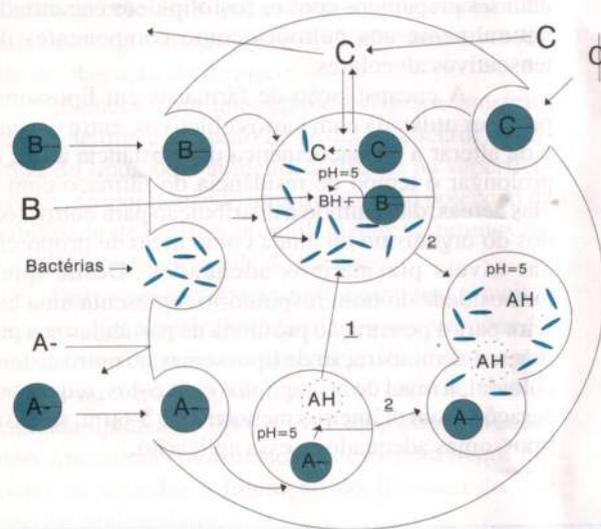


Figura 4- Possíveis caminhos para a penetração intracelular de antibióticos livres ou encapsulados em lipossomas.
 1. Representa a difusão do antibiótico de um lisossoma para outro.
 2. Representa a fusão intracelular de dois vacúolos.
 A = Antibiótico β -lactâmico
 B = Antibiótico aminoglicosídico.
 C = Clindamicina.
 Adaptado de Couvreur et al, 1991.

Foi verificado que a encapsulação aumentou a captação por macrófagos *in vitro* a 37°C. A 4°C não foi detectada 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.

A ampicilina contida em lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina/ colesterol/ fosfatidilserina, na proporção de 5:4:1, teve sua atividade antibiótica aumentada pelo fator de 90 vezes no tratamento da infecção experimental de *Listeria*

O problema da resistência de infecções bacterianas intracelulares à terapia é devido, principalmente, à baixa fração de antibiótico capturado pela célula ou à reduzida atividade terapêutica do mesmo no pH ácido dos lisossomas. Por exemplo, antibióticos que possuem caráter básico, como os aminoglicosídicos, penetram em alta quantidade no interior dos lisossomas, mas não exibem efeito terapêutico desejável em meio ácido, antibióticos negativamente carregados, como os β -lactâmicos, não possuem habilidade de atravessar a membrana dos lisossomas em razão de seu caráter 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 muito precariamente no interior da célula não exibe atividade antibiótica apreciável.

A maioria desses problemas pode ser contornados, veiculando-se essas substâncias associadas a agregados coloidais como os lipossomas ou nanopartículas, de forma a modular o direcionamento de acordo com o alvo a ser atingido.

A literatura mostra vários exemplos de formulações capazes de atingir o alvo intracelular, utilizando lipossomas desenvolvidos com fosfolípidos como anfífilicos estruturais. A cefalotina, formulada em lipossomas de fosfadilcolina, colesterol e fosfatidilserina na proporção de 6:3:1, mostrou-se mais efetiva que o antibiótico livre, no tratamento da infecção experimental Salmonelose em camundongos.

monocytogenes em camundongos normais. Esse efeito foi atribuído ao aumento da liberação do antibiótico para os macrófagos do fígado e do baço e à presença prolongada da ampicilina nesses órgãos, em virtude de estar contida nos lipossomas. *In vitro*, a encapsulação da ampicilina resultou num grande aumento da disponibilidade do antibiótico causando a morte de cerca de 90% das bactérias intracelulares enquanto que para a mesma dose de ampicilina livre misturada com lipossomas vazios não mostrou qualquer efeito sobre a *Listeria monocytogenes* a 37°C.

Isso demonstra, de um lado, que, nessas condições, a contribuição hidrofóbica da molécula da ampicilina não é suficiente para que ocorra ligação significativa da mesma aos lipossomas, por partição na bicamada lipídica. De outro, que a morte bacteriana é resultante da fagocitose do lipossomas, com subsequente destruição de sua estrutura, liberando a ampicilina no interior da célula.

No entanto, é muito pouco provável que o lipossoma contendo ampicilina e a bactéria estejam localizados no mesmo vacúolo intracelular. Assim, é de se esperar que o antibiótico exiba sua atividade antibacteriana, através da fusão do fagolisossoma contendo os lipossomas com outro contendo a bactéria (figura 4). A comparação entre formulações de lipossomas contendo ampicilina, com maior ou menor fluidez provocada pela variação da composição lipídica, mostrou que ambos os tipos são igualmente capturados por macrófagos peritoniais, mas que a velocidade de degradação intracelular do lipossoma depende da composição lipídica.

Observou-se que a degradação intracelular lenta dos lipossomas menos fluidos resultou na ausência ou no atraso da morte intracelular da *L. monocytogenes in vitro*. Isso vem de encontro aos resultados observados *in vivo*, onde a menor degradação intracelular dos lipossomas menos fluidos levou à diminuição da eficiência antibacteriana do fármaco.² Esses fatos mostram a possibilidade de se modular a velocidade de liberação intracelular do fármaco, com o objetivo de implementar a atividade terapêutica.

Antibióticos aminoglicosídicos também possuem a habilidade de eliminar bactérias de órgãos infectados quando encapsulados em lipossomas. Cobaias infectadas com *Brucella canis* foram tratadas com estreptomycin encapsulada em lipossomas, verificando-se morte total da bactéria com a dose de 2mg/kg, enquanto que a mesma dose de estreptomycin livre causou uma redução insignificante nas bactérias.

A estreptomycin 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 estreptomycin encapsulada em lipossomas neutros de fosfatidilcolina por fator de 10 vezes. Esse resultado apresenta um significado interessante, na medida em que também demonstra a necessidade de fagocitose com subsequente degradação dos lipossomas, antes do aparecimento do efeito antibacteriano. Essa superioridade na atividade

antibacteriana também foi detectada no efeito de lipossomas contendo estreptomycin no tratamento de infecções experimentais com *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella enteritidis*.

Outro aminoglicosídico com resultados favoráveis ocasionados pela encapsulação em lipossomas é a gentamicina. A influência do tipo de lipossoma na eficácia antibacteriana foi verificada no tratamento da infecção de camundongos por *Brucella militensis* com gentamicina encapsulada em lipossomas. O efeito antibacteriano observado foi diretamente dependente da carga elétrica superficial do lipossoma. Foi demonstrado que lipossomas positivamente carregados, contendo gentamicina, apresentaram grande eficiência na eliminação da *Brucella militensis* infectante do fígado e baço, enquanto que lipossomas negativamente carregados foram completamente ineficientes.

Esses resultados mostram que, dependendo de sua carga superficial, o lipossoma pode interagir diferentemente com os macrófagos. Isso pode ser explicado em termos de atração eletrostática entre a superfície positivamente carregada do lipossoma com a carga negativa da superfície da membrana da bactéria, facilitando fusão de ambas as membranas. Dessa forma, também é possível modular a intensidade do efeito desejado pela variação da carga elétrica.

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, desde que os anfifílicos usualmente utilizados em sua estruturação, como a fosfatidilcolina, 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, à nível de bronquíolos e alvéolos, requer preparações com diâmetros menores que 5-6µm, sendo os lipossomas adequados a essa aplicação.

Lipossomas	MLV* (µm)	REV** (µm)	SUD*** (µm)
Diâmetro antes da nebulização	5,4	3,4	1,2
Diâmetro depois da nebulização	2,7	2,5	1,1
Perda de fármaco hidrofílico	50,8	31,9	16,6

* Lipossomas multilamelares * Lipossomas obtidos por fase reversa

*** Lipossomas unilamelares pequenos

Tabela 1 - Propriedades de lipossomas de cromoglicato de sódio para nebulização.

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 dos mesmos 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 lipídeos 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 depositadas na superfície dos alvéolos pulmonares proporcionam liberação mais lenta 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 superfície 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 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 antimicrobianos com o objetivo de intensificar o efeito localizado dos mesmos nos pulmões. Está amplamente descrito na literatura que lipossomas grandes acumulam-se nos pulmões, sendo que esta propriedade foi usada para administrar, por meio de aerosol, broncodilatadores encapsulados em lipossomas.

Aminas simpatomiméticas, como a isoprenalina, podem aliviar a obstrução das vias aéreas através do estímulo dos receptores β_2 -adrenérgicos, mas também

podem causar taquicardia pela atividade dos receptores β_1 -adrenérgicos. Formulações de lipossomas diminuem significativamente os efeitos colaterais cardiovasculares, por minimizar a distribuição sistêmica do fármaco.

Lipossomas contendo ampicilina e oxitocina administrados por via intratraqueal em ratos não afetam a velocidade de absorção, mas o perfil de absorção plasmática é cerca de 3 vezes menor para a ampicilina e oito vezes menor para a oxitocina, em relação ao fármaco livre, demonstrando que lipossomas podem representar uma alternativa segura para a retenção de fármacos nos pulmões e minimizar a distribuição para outros órgãos, onde o efeito tóxico poderia predominar.

Outro exemplo é que o cromoglicato de sódio, um fármaco anti-asmático, é inefetivo quando administrado, via oral, em razão de sua precária absorção. Lipossomas de cromoglicato de sódio produziram concentrações plasmáticas detectáveis do fármaco por tempo superior a 25 horas, após a inalação, enquanto que dose equivalente do fármaco, apesar de produzirem concentrações plasmáticas 7 vezes maiores que as dos lipossomas, só puderam ser detectados em tempo muito menor.

Quando administrada por via intratraqueal, em carneiro, a amicacina em solução mostrou meia vida de cerca de 2 horas, com concentração plasmática máxima de 8,3 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que em lipossomas de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol/colesterol (4:3:3) a meia vida prolongou-se por mais de 10 horas, com concentração plasmática de 3,3 $\mu\text{g/ml}$. Isso demonstra que a concentração plasmática reduzida de amicacina pode diminuir os efeitos colaterais sistêmicos e aumentar a atividade farmacológica local.

Fagocitária - Desde que os lipossomas são rapidamente captadas 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 macrófagos 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 100 vezes a atividade do fármaco em relação à dose equivalente da amicacina em solução.

Administração via oral

Em muitos tipos de doenças, a seletividade da liberação da substância com atividade farmacológica representa uma vantagem considerável para o êxito do esquema terapêutico. A maioria dos sistemas físicos, propostos como alternativas viáveis ao direcionamento de fármacos, é constituída por macromoléculas ou sistemas coloidais, como os lipossomas.

Na hipótese de admitir-se que os lipossomas são estruturas aptas em atravessar a barreira gastrointestinal e penetrar no sistema circulatório, aí, eles sofreriam uma forte interação com vários constituintes do sangue, tais como imunoglobulinas, α - e β -globulinas, albuminas, etc. Esse fenômeno, conhecido como opsonização, é um importante passo no processo de reconhecimento de corpos estranhos ao organismo.

Considerando que a maioria dos lipossomas possui como principal componente estrutural os fosfolípidos, pode haver uma troca rápida desse componente com as lipoproteínas de baixa e de alta densidade, com posterior desintegração da bicamada.

A literatura mostra que a liberação de fármacos encapsulados em sistemas coloidais, via oral, é mais promissora em processos de imunização. O direcionamento da estrutura coloidal ocorre mais seletivamente para células M, na região de Peyer's Patch do intestino delgado.

Lipossomas foram explorados em vários estudos como sistemas veiculadores e como imunoadjuvantes para administração oral de antígenos, sendo que os seguintes aspectos são concordantes: - Lipossomas permitem a inclusão de adjuvantes imunológicos; são imunogênicos por si próprios; possuem habilidade de encapsular antígenos e podem protegê-los da ação do meio externo.

A propriedade imunoadjuvante dos lipossomas pode ser explicada pela possibilidade de proporcionar antígenos particulados solúveis, em nível intestinal, e facilitar a absorção pelas células M da região de Peyer's Patches. A absorção de fármacos encapsulados em lipossomas por via oral, embora seja pequena, uma significativa quantidade de lipossomas podem ser capturados intactos pela mucosa intestinal, possivelmente por endocitose.

CONCLUSÕES

Independentemente da via de administração, na maioria dos casos, a encapsulação de fármacos em lipossomas oferece vantagens, no sentido de se atingir mais eficientemente os microorganismos intracelulares. Nos últimos anos, os estudos de lipossomas e de outros sistemas coloidais tem evoluído significativamente na direção de tornar os fármacos já existentes mais efetivos farmacologicamente.

A vetorização intracelular de antibióticos pode melhorar a terapia para grande número de infecções bacterianas normalmente não atingíveis, de modo adequado, com formulações convencionais. A estratégia de controlar e direcionar a liberação de fármacos tem

contribuído para contornar problemas de penetração e/ou retenção de antibióticos no interior de células.

Esses estudos devem, a curto prazo, incluir novos antibióticos, como os macrolíticos, Rimfapim por exemplo, ou as fluoroquinolonas, tais como a ciprofloxacina e sparfloxacina, com atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*, um dos alvos prioritários, mundialmente. A necessidade de melhorar a terapia de doenças relacionadas com microorganismos intracelulares é urgente, desde que, ao lado dos problemas do aparecimento do fenômeno de resistência bacteriana ao tratamento com fármacos e formulação convencionais, infecções intracelulares sejam proces-

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ATTWOOD, D. & FLORENCE, A. T. *Surfactants systems. Their chemistry, pharmacy and biology*. London: Chapman & Hall, 1983, p.739-748.
- BAKER-WOUDENBERG, I. A. J. M., LOKERSE, A. F., ROERDINK, F. H. Antibacterial activity of liposome-entrapped ampicillin *in vitro* and *in vivo* with relation to the lipidic composition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.251, p.321-327, 1989.
- BAKER-WOUDENBERG, I. A. J. M., LOKERSE, A. F., Van Den BERG, J. C. V., ROERDINK, F. H. Liposome-encapsulated ampicillin against *Listeria monocytogenes in vivo* and *in vitro*. *Infection*. v.16, suppl., p.S165-S170, 1988.
- COUVREUR, P., FATTAL, E., ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharm. Res.* v.8, p.1079-1086, 1991.
- DAVIS, S. S., ILLUM, L. Colloidal delivery system: Opportunities and challenges. In: TOMLINSON, E., DAVIS, D. D. Site specific delivery. Chichester: Wiley, 1986.
- DELATRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPPOT, J. R., SCHUBER, F. Les liposomes. Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Paris: Tec & Doc-Lavoisier, 1993.
- DESIDERIO, J. V., CAMPBELL, S. G. Intraphagocytic killing of *Salmonella Typhimurium* by liposome-encapsulated cephalotin. *J. Infec. Dis.* v.148, p.563-570, 1983.
- DESIDERIO, J. V., CAMPBELL, S. G. Liposome-encapsulated cephalotin in treatment of experimental murine salmonellosis. *J. Reticuloendothel. Soc.* v.34, p.279-287, 1983.
- FOUNTAIN, M. W., WEISS, S. G., FOUNTAIN, A. G., SHEN, A., LENK, R. P. Treatment of *Brucella canis* and *brucella abortus in vivo* and *in vitro* by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* v.152, p.529-535, 1985.

- GILLIGAN,C.A., WAN PO,A. Oral vaccines: Design and delivery. *Int.J.Pharm.* v.75, p.1-24, 1991.
- GONZALES-ROTH,R.J., CACACE,J., STRAUB,I., SCHREIER,H. Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: functional and morphological interactions. *Exp.Lung.Res.* v.17, p.687-705, 1991.
- GREGORIADIS,G. Liposome technology. Target drug delivery and biological interation. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- GREGORIADIS,G. Liposomes as drug carriers. Chichester: Wiley, 1988.
- GREGORIADIS,G., POSTE,G. *Targeting of drugs. Anatomical and physiological considerations.* New York: Plenum, 1988, 222p.
- GREGORY,R.L., MITHALEC,S.M., RICHARDSON,G., HARMON,C., HILTON,T., McGHREE,J.R. Characterization of immune reponse to oral administration of *Streptococcus sobrinus* ribosomal preparations in liposomes. *Infect.Immun.* v.54, p.780-786, 1986.
- HERNANDES-CASALLES,T., VERA,A., CRESPO,F., VILALAIN,J., GOMES-FERNANDES,J.C. Treatment of *Brucella militensis* with liposome-encapsulated gentamicin. *Am.J.Vet.Res.* v.50, p.1486-1488, 1989.
- JACKSON,S., MESTECKY,J., CHILDRES,J., MICHALEK,S.M. Liposomes containing anti-idiotypic antibodies: an oral vaccine to induce protective secretory immune reponses specific for phatogens of mucosal surfaces. *Infect.Immun.* v.58, p.1932-1936, 1990.
- JOHNSON,J.D., HAND,W.L., FRANCIS,J.B., KING-THOMPSON,N. CORVIN,R.W. Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J.Lab.Clin.Med.* v.95, p.429-439, 1980.
- JULIANO,R.L. *Interations of proteins and drugs with liposomes.* In: OSTRO,M. *Liposomes.* New York: Marcell Dekker, 1983.
- JULIANO,R.L. Liposomes as a drug delivery system. *Trends Pharmacol.Sci.* v.2, p.39-41, 1981.
- KAMAREL,A., WONG,A., McCALDEN,T. Methodology for efficacy study of liposome bronchodilators in long duration experiments. *Proc.West Pharmacol.Soc.* v.32, p.32-35, 1989.
- KAO,Y.J., JULIANO,R.L. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system: effects of blockage on the clearance of large inilamellar vesicles. *Biochim.Biophys.Acta.* v.677, p.453.
- KIM,C.K., JEONG,E.J. Development of dried liposome as effective immuno-adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int.J.Pharm.* v.115, p.193-199, 1995.
- KIMURA,T. *Transmucosal passage to liposomal drugs.* In: GREGORIADIS,G. *Liposomes as drug carriers.* Chichester: Wiley, 1988, p.635-647.
- KIRBY,C., CLARKE,J., GREGORIADIS,G. Effect of cholesterol contend of small unilamellar liposomes on their stability in vitro and in vivo. *Biochem.J.* v.186, p.591, 1980.
- KNIGHT,C.G. *Liposomes from physical structure to therapeutic application.* Amsterdam: Elsevier-North Holland, 1981.
- LASIC,D.D. Liposomes. *American Scientist.* v.80, p.2031, 1992
- LASIC,D.D. Sterically stabilized vesicles. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* v.33, p.1685-1698, 1994.
- MICHALEK,S.M., CHILDERS,N.K., KATS,J., DENYS,F.R., BERRY,A.K., ELDRIDGE,J.H., McGHEE,J.R., CURTIS,R. Liposomes as a oral adjuvants. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* v.146, p.51-58, 1989.
- MIHALKO,P.J., SCHREIER,,H., ABRA,R.M. *Liposomes: a pulmonary perspective.* In: GREGORIADIS,G. *Liposomes as a drug carriers.* New York: Wiley, 1988, p.679-694.
- MORRIS,S., BAI,G.H., SUFFYS,P., PORTILHO-GOMES, L., FAIRCHOK,M., ROUSE,D. Molecular mechanism of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium Tuberculosis.* *J.Inf. Dis.* v.171, p.954-960, 1995.
- OYARZUN,M.J., CLEMENTS,J.A., BARITUSSIO,A., MORIMOTO,Y., ADACHI,Y. Ventilation enhances pulmonary alveolar clearance of radioactive diphalmityolphosphatidylcholine in liposomes. *Am.Rev.Resp.Res.* v.121, p.709-721, 1980.
- POSTE,G. Liposome targeting in vivo. Problems and opportunities. *Biol.Cell.* v.47, p.47-68, 1983.
- PUISIEUX,F., BARRAT,G., ROBLLOT-TREUPEL,L., DELATRE,J., COUVREUR,P., DEVISSAGUET,J.R. *Therapeutic aspects of liposomes in phospholipids.* New York: Plenum, 1990.
- SCHERPLOF,G., DAMEN,J., HOEKSTRA,P. *Interactions of liposomes with plasma proteins and components of immune system.* In: KNIGHT,C.G. *Liposomes from physical structure to therapeutic application.* Amsterdam: Elsevier-North Holland, 1981.
- SCHREIER,H., McNICOL,K.J., AUSBORN, M., SOUCY,D.M., DERENDORF,H., STECENKO,A.A., GONZALES-ROTH,R.J. Pulmonary delivery of amikacin liposomes and acute liposome toxicity in the sheep. *Int.J.Pharm.* v.87, p.183-193, 1992.
- SHAFFER,R.W., SMALL,P.M., LARKIN,C., SCHOOLNIK,G., CHIRGWIN,K.D. Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York City: A molecular epidemiologic assessment. *J.Inf.Dis.* v.171, p.170-176, 1995.
- STEVENSON,M., BAILLIE,A.J., RICHARDS,M.E. Enhanced activity of streptomycin and chloranphenicol against intracellular *Escherichia coli* in the J774 macrophage cell line mediated by liposome delivery. *Antimicrob.Agents Chemother.* v.24, 742-749, 1983.
- TADAKUDA,T., IKEWAKI,N., NASUDA,T., TSUTSUMI,M. SAITO,S., SAITO,K. Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped into liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.28, p.28-32, 1985.
- TAYLOR,M.G., FARR,S.J. Liposomes for drug delivery to respiratory tract. *Drug Develop.Ind.Pharm.* v.19, p.123-142, 1993.
- TAYLOR,K.M.G., TAYLOR,G., KELLAWAY,I.W., STEVENS,J. The influence of liposomal encapsulation on sodium cromoglicate pharmacokinetics in man. *Pharm.Res.* v.6, p.633-636, 1989.

- TAYLOR, K.M.G., TAYLOR, G., KELLAWAY, I.W., STEVENS, J. The stability of liposomes to nebulization. *Int.J.Pharm.* v.59, p.57-61, 1990.
- TROUET, A., TULKENS, P. *Intracellular penetration and distribution of antibiotics: The basis for an improved chemotherapy of intracellular infections.* In: NINET, L., BOST, P.E., BOUANCHAUD, D.H., FLORENT, J. *The future of antibiotherapy and antibiotic research.* London: Academic Press, 1981, p.337-349.
- TULKENS, P. *The design of antibiotics capable of an intracellular action.* In: BURI, P., GUMMA, R. *Aims, potentialities and problems in drug targeting.* Amsterdam: Elsevier, 1985, p.179-194.
- TULKENS, P., TROUET, A. The uptake and intracellular accumulation of aminoglycosides antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. *Biochem.Pharmacol.* v.27, p.415-424, 1978.
- WACHSMANN, D., KLEIN, J.P., SCHOLLER, M., FRANK, R.M. Local and systemic immune response to orally administered liposome associated soluble *S. mutans* cell wall antigens. *Immunology* v.54, 189-197, 1985.
- WICHERT, B.V., GONZALES-ROTHI, R.J., STRAUBL, E., WICHERT, B.M., SCHREIER, H. Amikacin liposomes: characterization, aerosolization and *in vitro* activity against *Micobacterium avium-intracellulare* in alveolar macrophages. *Int.J.Pharm.* v.78, p.227-235, 1992.
- WOODLE, M.C., LASIC, D.D. Sterically-stabilized liposomes. *Biochem.Biophys.Acta* v.1113, p.327-340, 1992.
- ZEMB, X.M., MARTIN, G.P., MARRIOT, G. The controlled delivery of drugs to the lung. *Int.J.Pharm.* v.124, p.149-164, 1995.