



Faculdade de Ciências e Tecnologias

Aplicação dos lipossomas como
estratégia para superar a resistência
bacteriana aos antibióticos

Paulo Alexandre Reis Nunes

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Aplicação dos lipossomas como
estratégia para superar a resistência
bacteriana aos antibióticos

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Orientando:

Paulo Alexandre Reis Nunes

Orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Ana Margarida Grenha

2015

Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2014 Paulo Nunes. Todos os direitos reservados.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos:

Queria agradecer à Professora Doutora Ana Margarida Grenha por todo o seu empenho, orientação e apoio prestado durante a realização da monografia assim como ao longo do percurso académico.

Um agradecimento aos meus restantes professores pelos conhecimentos facultados.

Um muito obrigado a todos os amigos inesquecíveis com que fiquei depois de passar pela grandiosa Universidade do Algarve. Especial ênfase para os camaradas de “CBC”, para “os maiores” e os colegas de casa.

Também merecem destaque, amigos que me apoiaram durante a execução da monografia são eles Pedro Nascimento e Marco Silva.

Um especial agradecimento para toda a minha família e em particular para o meu irmão e para a minha mãe que me apoiaram em tudo durante estes anos académicos.

Epigrafe:

A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da humanidade é o fim.

Thomas Hobbes

Índice

Lista de siglas e abreviaturas.....	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	ix
Resumo.....	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
2. Metodologia	2
3. Antibiótico e resistência bacteriana associada	2
3.1 Resistência por transformação ou destruição do antibiótico	6
3.2 Resistência por efluxo de antibióticos	6
3.3 Resistência por modificação do alvo	6
3.4 Resistência por impermeabilidade bacteriana.....	7
4. Custo socioeconómico das resistências bacterianas	8
5. Soluções para o problema das resistências	10
5.1 Abordagens políticas para o controlo das resistências	10
5.2 Medidas que visam solucionar o problema das resistências	11
6. Os lipossomas como sistemas de libertação de fármacos	13
6.1 Da conceção à aplicação	13
6.2 Estrutura e propriedades dos lipossomas.....	14
6.3 Preparação de lipossomas.....	16
6.4 Vias de administração	18
6.4.1 Vias invasivas.....	18
6.4.2 Vias não invasivas.....	19
7. Encapsulamento lipossomal de antibióticos e diminuição da resistência aos antibióticos....	20
7.1 Vantagens do encapsulamento lipossomal de antibióticos.....	20
7.1.1 Melhoria da farmacocinética e biodistribuição, e perfil de toxicidade.....	20
7.1.2 Potenciação da atividade contra bactérias intracelulares	21
7.1.3 Melhoria da seletividade no alvo	22
7.1.4 Potenciação da ação contra bactérias extracelulares.....	23
7.2 Desvantagens do encapsulamento de fármacos por lipossomas	24
7.3 Mecanismos de ação dos lipossomas em infeções bacterianas intracelulares	26

Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos

7.4 Mecanismo de ação dos lipossomas em infecções bacterianas extracelulares	28
7.5 Aplicação dos antibióticos lipossomais em infecções bacterianas	29
7.5.1 Testes realizados em bactérias resistentes	29
7.5.2 Testes realizados em bactérias suscetíveis	31
7.6 Ensaios clínicos	33
Conclusão	34
Bibliografia	36
Anexos	41

Lista de siglas e abreviaturas

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensageiro

ARNt: ácido ribonucleico transportador

CE: Comissão europeia

CPCDE: Centro de Prevenção e controlo de Doença Europeu

Da: Dalton

DC-chol: 3β -[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil]Colesterol

DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DMPG: Dimiristoilfosfatidilglicerol

DOPE: Dioleoilfosfatidil etanolamina

DOTAP: 1,2-Dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano (DOTAP)

DP: *Dihexadecil* hidrogenofosfato

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPG: Dipalmitoil fosfatidil glicerol

DSPC: Diestearoilfosfatidilcolina

EECP: Escola de economia e ciência politica

EMA: Agência do medicamento europeu

EU: União Europeia

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drug Administration

FEIFA: Federação Europeia da indústria farmacêutica e associações

FQRP: *Pseudomonas Aeruginosa* resistente à fluoroquinolona

MC: 1,2-dimiristoil-sn-glicerofosfocolina mono-hidratada

MRSA: *Stafilococcus Aureus* resistente à meticilina

PC: Fosfatidilcolina

PIB: Produto interno bruto

PS: Fosfatidilserina

SA: Octadecilamina

Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos

SDIA: Sociedade de doenças infecciosas da América

SQAB: Sociedade de quimioterapia antimicrobiana britânica

VRE: *Enterococcus* resistente à vancomicina

Índice de figuras

Figura 6.1 - Classificação dos lipossomas

Figura 6.2 – Representação da preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e subsequentes operações aplicadas para obtenção de diferentes tipos de lipossomas

Figura 7.1 - Mecanismos de penetração de antibióticos encapsulados por lipossomas em células fagocitárias

Índice de tabelas

Tabela 7.1- Resumo de resultados obtidos de testes realizados com antibióticos lipossomais em bactérias suscetíveis

Resumo

Durante várias décadas, o uso extremamente difundido de antibióticos e o aumento do interesse da indústria farmacêutica por fármacos mais lucrativos em detrimento do investimento em descobertas e desenvolvimento de novos antimicrobianos levou inevitavelmente a um aumento considerável das resistências aos antibióticos. Atualmente, estas estão num nível crítico, comprometendo a eficácia destes fármacos, tornando-se num problema grave de saúde pública.

Neste momento estão a ser investigadas novas classes de antibióticos, mas também estão a ser feitos estudos focados na melhoria da ação/comportamento dos fármacos já existentes, ou seja, novas formulações de antibióticos. Inclui-se nestas novas abordagens, a formulação lipossomal.

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, cujo diâmetro varia normalmente dos 0.02 aos 10 μm , que permitem o encapsulamento de quantidades consideráveis de uma panóplia de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas. Os lipossomas, para além de conferirem maior eficácia aos antibióticos, diminuem a toxicidade e aumentam a seletividade, sendo que vários estudos já demonstraram melhorias farmacodinâmicas e farmacocinéticas relativamente aos antibióticos convencionais contra bactérias suscetíveis e resistentes, evidenciando uma grande potencialidade para a sua utilização.

Por outro lado, existem algumas barreiras que de certa forma impedem a rápida difusão de utilização destes sistemas de libertação, como o preço elevado, a instabilidade e dificuldade de esterilização e complexidade dos equipamentos associados à sua produção.

Porém, já existem antibióticos lipossomais em ensaios clínicos, incluindo formulações de amikacina (Arikace[®] e Mikasome[®]), a ciprofloxacina e tobramicina, o que sugere que pelo menos em alguns casos será viável a aplicação desta tecnologia. O curto tempo da sua aplicação em antibióticos e a escassez de exemplares em utilização, também sugerem a necessidade de mais estudos para explorar as suas potencialidades promissoras.

Palavras-chave: antibióticos; encapsulamento; lipossomas; resistências.

Abstract

For several decades, the extremely widespread use of antibiotics and the increased interest of pharmaceutical industry for more lucrative drugs spoiled the investment in discovery and development of new antimicrobials, which inevitably led to a significant increase in resistances to antibiotics. Nowadays, resistances are at a critical level, compromising the effectiveness of these drugs, becoming a serious public health problem. Currently several new classes of antibiotics are under research, but there are also new studies focused on improving action / behavior of existing drugs, or new antibiotic formulations. Liposome formulation is included in these new approaches.

Liposomes are spherical vesicles composed by one or more bilayers of phospholipids (whose diameter normally ranges from 0,02 to 10 μm), allowing the encapsulation of considerable quantities of a range of hydrophobic and hydrophilic substances. Liposomes, also confer greater efficacy, decrease toxicity and increase selectivity to the antibiotic. Furthermore, several studies have proven pharmacodynamic and pharmacokinetic improvements over conventional antibiotics against susceptible and resistant bacteria, showing a great potential.

On the other hand, there are some barriers that prevent the rapid spread of these delivery systems such as high cost, complexity of the production equipment, instability and difficulty of sterilization.

Some liposomal antibiotic formulations are currently in clinical trials, including those of amikacin (Arikace[®] and Mikasome[®]), ciprofloxacin and tobramycin, which suggests that at least in some cases the application of this technology is feasible.

The fact that liposomal formulations of antibiotics are recent suggests the need for more studies to explore their promising potential.

Keywords: antibiotics; encapsulation; liposomes; resistances.

1. Introdução

Quando se aborda um tema relacionado com antibióticos é quase impossível não lembrar os nomes Fleming e Ehrlich, pelos seus papéis primordiais nas descobertas e desenvolvimento destes fármacos.

Os antibióticos são provavelmente uma das classes de medicamentos mais bem sucedidas na história da medicina. Estes eram vistos, no início da sua utilização, como verdadeiros medicamentos milagrosos, contudo, o seu acesso não esteve prontamente disponível para toda a população. De facto, estes antibióticos, no fim da década de 30 e na década de 40, eram escassos e caros, para além de estarem reservados aos militares, durante a Segunda Guerra Mundial. Os anos de ouro para as descobertas de novas classes de antibióticos ocorreram entre 1950 a 1970. Estas inúmeras descobertas, aliadas à facilidade no processo de produção, tornaram o acesso mais simples, levando ao seu uso extremamente difundido. Os antibióticos tornaram-se verdadeiramente a panaceia da medicina, tendo sido usados para tratar os mais triviais tipos de infeções, apesar de muitas delas não serem de origem bacteriana [1,2]. Fleming foi um dos primeiros a alertar para o potencial de resistências à penicilina, caso fosse usada em concentrações sub-terapêuticas ou durante pouco tempo de tratamento. Ainda nos finais dos anos 30 e durante os anos 40, registaram-se os primeiros casos de resistência microbiana, pouco depois de se terem introduzido as sulfonamidas e a penicilina [1]. Aliado ao aparecimento de resistências e ao uso extremamente difundido está o facto de a partir da década de 90 a indústria farmacêutica ter diminuído a sua dedicação à investigação de novos antibacterianos (consultar anexo 1), focando-se em doenças crónicas, ou seja, mais lucrativas. Consequentemente, durante estes últimos anos observou-se a conversão de resistência aos antibióticos num problema grave de saúde pública [3].

Existe uma panóplia de medidas que podem ajudar neste problema, estando estas incluídas em dois campos principais, mais concretamente, a correção do modo de utilização dos antibióticos e o melhoramento do arsenal terapêutico. Esta monografia focar-se-á na área do melhoramento do arsenal, nomeadamente, no

encapsulamento de antibióticos em lipossomas, demonstrando de que maneira a aplicação destes sistemas pode ajudar a contornar as resistências a estes fármacos.

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez em 1965, como sistemas fosfolipídicos por Alec Bangham. Mais tarde Gregory Gregoriadis estabeleceu o conceito de encapsulamento de fármacos por lipossomas [4]. Atualmente procede-se ao encapsulamento de antitumorais, antifúngicos, antibióticos, ácidos nucleicos, vacinas, anestésicos e anti-inflamatórios. A sua diversificada utilização tem por base as características que os seus componentes conferem, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, aptidão para encapsular fármacos hidrofílicos ou lipofílicos e a vetorização para sítios específicos. Além disso, também está relacionado com a versatilidade dos sistemas, que podem obter-se com múltiplas formas e composição, o que alicia a investigação e o interesse comercial [5,6].

Esta monografia terá como objetivos principais a sensibilização da necessidade de resolução do problema das resistências bacterianas aos antibióticos, a abordagem das potencialidades dos antibióticos encapsulados por lipossomas nesse mesmo âmbito, assim como fazer o ponto da situação quanto à sua aplicação.

2. Metodologia

Para a realização desta monografia foi utilizada uma metodologia que consistiu na pesquisa de informação em artigos científicos relacionados com o tema desta, cujas palavras-chaves englobavam essencialmente os léxicos “liposomes”, “resistance”, “antibiotics” e “encapsulated”. A pesquisa foi direcionada maioritariamente para artigos com datas de publicação compreendidas entre 2000 e 2015, no arquivo de literatura científica e biomédica, pubmed.

3. Antibióticos e resistência bacteriana associada

“No sentido mais estrito, os antibióticos são substâncias antibacterianas produzidas por diversas espécies de micro-organismos (bactérias, fungos e actinomicetos), que suprimem o crescimento de outros micro-organismos” [7]. Porém, é frequente alongar o uso do termo antibiótico, para incluir agentes antimicrobianos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas. Para além disso, os antibióticos podem ser agrupados em dois grupos principais: os bactericidas, que eliminam as bactérias e os bacteriostáticos, que apenas inibem o seu crescimento [8]. Ambos podem diferenciar-se acentuadamente pelas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação [7]. Os antimicrobianos são classificados com base na sua estrutura química e no mecanismo de ação proposto [7]. Apesar de haver alguma divergência na classificação, podem-se considerar 5 grandes classes: os inibidores da síntese da parede bacteriana, os ativos sobre a membrana celular, os inibidores da síntese proteica, os inibidores dos ácidos nucleicos e os inibidores da síntese de ácido fólico.

Todos os organismos vivos lutam para se adaptar ao ambiente em seu redor. Portanto, não deve ser surpreendente que as bactérias mostrem uma notável habilidade em tolerar e adaptar-se ao ambiente que as rodeia, incluindo o desenvolvimento de resistências, tanto aos antimicrobianos mais antigos como aos mais recentes. Geralmente, a resistência bacteriana ocorre a nível genético, podendo ser desenvolvida pela via de mutação ou por introdução de material genético. A expressão dessas alterações genéticas resulta em alterações num ou mais mecanismos biológicos da bactéria afetada, o que vai determinar especificamente o tipo de resistência a ser desenvolvida. Para se desenvolver resistência ao antibiótico é necessário que se reúnam duas condições: uma colónia heterogénea que tenha pelo menos uma bactéria que possua uma alteração genética que confira resistência ao antimicrobiano, e a presença de um antibiótico capaz de inibir a maioria das bactérias presentes [2].

A elevada ocorrência de resistência pela via da mutação advém do grande número de bactérias de uma infeção, do curto tempo de geração e da elevada taxa de mutação. Numa população de 10^{10} bactérias com a taxa de mutação de 1 em 10^7 , em média haverá mil mutações. Se uma dessas mutações conferir resistência ao

antibiótico aplicado, onde a maioria das bactérias sensíveis são mortas, a bactéria resistente irá multiplicar-se (transmitindo a resistência verticalmente), aproveitando o espaço e os nutrientes das suas vizinhas eliminadas. É de salientar que é a presença do antibiótico, a principal responsável pelo desenvolvimento da resistência, pois este, como referido acima, confere condições benéficas à população de bactérias resistentes, tanto que na ausência do antibiótico, o crescimento desta população seria provavelmente apenas similar ao das outras [2,9].

A transferência horizontal da resistência ocorre através de bacteriófagos, plasmídeos, transposões e outro material genético. Os genes que conferem resistência estão normalmente localizados em fragmentos especializados de ADN conhecidos por transposões, o que lhes permite movimentar de uns plasmídeos para outros. Alguns destes transposões contêm fragmentos de ADN mais complexos, conhecidos por integrões, que são capazes de integrar diferentes genes que conferem multi-resistência aos antibióticos [2].

Para além das facilidades que as bactérias têm em desenvolver resistências, existem fatores agravantes responsáveis pelo seu incremento. Como é o caso do uso excessivo e irracional de antibióticos em doentes internados ou de ambulatório, quer seja no tratamento ou em profilaxia, assim como o uso excessivo de antibióticos na indústria agrícola (principalmente na produção alimentar), ou do aumento da esperança média de vida, permitindo o uso de antibióticos até uma idade mais avançada. Também os avanços na saúde que resultam na sobrevivência de muitos pacientes com várias doenças e com elevado risco de infeções estão incluídos nesses fatores, tais como, pacientes em estado crítico, imunodeprimidos ou com doenças congénitas. O não cumprimento de medidas preventivas no controlo de infeções, como por exemplo, a lavagem correta das mãos e o isolamento desapropriado de pacientes com infeções resistentes também é responsável por este fenómeno. Paralelamente, o aumento de procedimentos invasivos, como as cirurgias, e o incremento do uso de próteses e corpos estranhos com elevado risco de infeção por bactérias resistentes, contribuem para o agravamento do desenvolvimento de resistências [2].

O primeiro fator apresentado é considerado o mais preponderante, pois o abuso do uso dos antibióticos promove de forma frequente a proliferação das bactérias

resistentes em detrimento das suscetíveis. A maioria dos restantes fatores, paradoxalmente, acaba por ser um ponto negativo do desenvolvimento da saúde pública [2].

Como resultado das causas referidas acima, um grande número de estirpes de bactérias torna-se resistente, e algumas delas multi-resistentes a estes agentes terapêuticos, convertendo-os em fármacos ineficazes. Para cada classe de antibióticos há pelo menos um (muitas vezes mais) mecanismo de resistência desenvolvido ao longo dos anos. De facto, em alguns casos, as bactérias têm desenvolvido resistências a duas ou mais classes de antibióticos em simultâneo, tornando o tratamento de infeções muito difícil e dispendioso. Em muitos casos, as resistências são associadas a alta morbidade e mortalidade [2,10].

Embora o desenvolvimento de resistência possa ocorrer rapidamente, a perda de resistência pode ser lenta, mesmo na ausência do antibiótico. Este fenómeno é inerente ao custo que a posse dos genes e/ou plasmídeos que conferem resistência, acarreta para as bactérias. A presença dos plasmídeos assegura a sua manutenção durante o tempo em que providenciam vantagem para a sobrevivência da bactéria. Alguns estudos detetaram uma diminuição da frequência de resistência após a remoção do antibiótico. Dois anos após uma campanha com o objetivo de reduzir a utilização dos macrólidos, a resistência das bactérias *S. pyogenes* baixou dos 20% para os 10%. Contudo, a resistência geralmente permanece a um determinado nível basal, sendo que a reintrodução do antimicrobiano voltará a selecionar as estirpes resistentes, mesmo passados meses ou anos de ausência do fármaco. Algumas descobertas sugerem que a maneira mais rápida de eliminar as resistências é através da inserção de bactérias suscetíveis, que vão competir com as resistentes [10].

De seguida, serão abordados de modo sucinto, os principais mecanismos de resistência.

3.1 Resistência por transformação ou destruição do antibiótico

A transformação ou a destruição do antibiótico ocorre quando a bactéria produz um ou mais enzimas que o modificam ou degradam quimicamente, tornando-o inativo contra esta. Este mecanismo, que é provavelmente dos mais antigos, afeta diversos antibióticos. Um caso bastante conhecido é o que acontece com os β -lactâmicos. Estes são inativados quando sofrem hidrólise no seu anel β -lactâmico, por enzimas (β -lactamases) sintetizados pela bactéria [2]. A transformação do antibiótico pode ser exemplificada através dos aminoglicosídeos. Estes não têm grupos lábeis para serem hidrolisados, mas são neutralizados por enzimas desativadoras que os modificam quimicamente, resultando na perda de afinidade pelos alvos no ribossoma e, conseqüentemente, deixam de inibir a síntese de proteínas [9,11].

3.2 Resistência por efluxo de antibióticos

O efluxo de antibióticos é relevante quando estes atuam dentro da bactéria, ocorrendo quando esta é capaz de desenvolver um mecanismo de transporte ativo que bombeie a molécula antimicrobiana para fora da célula, o suficiente para que não se atinja a concentração necessária à atividade antibacteriana [2]. As bombas utilizadas para excretar os antibióticos são diferentes das bombas membranares, as quais todas as bactérias usam para excretar moléculas lipofílicas e anfipáticas para o exterior da célula. Contudo, algumas bombas utilizadas para excretar antibióticos produzidos pelas próprias bactérias, são também utilizadas como mecanismo de resistência [9].

3.3 Resistência por modificação do alvo

A terceira estratégia de resistência não está focada na remoção, destruição ou modificação do antibiótico, mas consiste na alteração do seu alvo. Esta modificação pode ocorrer em alvos à superfície da bactéria (lipopolissacarídeos, catiões ou proteínas membranares), reduzindo a interação entre estes e o fármaco, e posteriormente também a sua taxa de entrada na bactéria [12]. Por outro lado, pode ocorrer alteração do alvo terapêutico, resultando numa diminuição de afinidade entre este e o antimicrobiano, e por conseguinte, numa redução do efeito antibacteriano [2]. A alteração do alvo é um mecanismo comum, na qual se podem encontrar em todas as classes de antibióticos, independentemente do seu mecanismo de ação [13].

3.4 Resistência por impermeabilidade bacteriana

Para a maioria dos antibióticos exercerem o seu efeito bactericida ou bacteriostático, é necessário que acedam aos seus alvos intracelulares. Esta resistência é bem mais frequente nas bactérias gram-negativas, justamente devido à presença da membrana exterior [11]. Por outro lado, nas bactérias gram-positivas é pouco frequente a observação de resistências por impermeabilidade. Estas bactérias possuem uma parede celular permeável, que normalmente não limita a penetração de antimicrobianos, desde que não excedam os 57 000 Da. Porém, a resistência devido à restrição de penetração pode ocorrer quando há produção de uma parede celular mais espessa [13]. O biofilme é um exemplo particular de impermeabilidade, promovendo a resistência à maioria dos antimicrobianos, em parte, devido à limitação do acesso aos alvos antimicrobianos [11].

Identificar novos antibióticos foi outrora o objetivo prioritário de estudos realizados pelas companhias farmacêuticas. O potente espectro de ação desses fármacos providenciou uma eficácia clínica extraordinária. No entanto, o sucesso tem sido comprometido, pois uma vasta quantidade de bactérias encontrou mecanismos de tolerar/superar diferentes classes de antibióticos e de perder suscetibilidade à maioria ou a todos os regimes terapêuticos. Ou seja, as previsões que os clínicos e outros profissionais de saúde fizeram a meio do século XX, sobre a erradicação das doenças infecciosas mais comuns da humanidade, serão pelo menos, pouco prováveis

de serem atingidas. Será então importante adquirir um bom entendimento da base molecular do desenvolvimento de resistência, pois permite-nos, por sua vez, desenvolver novas abordagens para lidar com as infeções causadas por estas bactérias, e para criar novas estratégias para o desenvolvimento de novos tratamentos contra as mesmas [14].

4. Custo socioeconómico das resistências bacterianas

Vários estudos têm reportado os elevados custos que as infeções resistentes aos antibióticos acarretam para os cuidados de saúde, quando comparadas com as infeções suscetíveis, embora com variações nos seus resultados.

A despesa global económica derivada da resistência aos antibióticos foi estimada em, pelo menos, 1,5 biliões de euros, em 2007, na Europa e 55 biliões de dólares, em 2000, nos Estados Unidos da América (EUA), incluindo os custos do hospital e do doente. Nas estimativas europeias, a perda de produtividade representa 40% de 1,5 biliões de euros, enquanto que nos EUA representa 64% dos 55 biliões de dólares. Ambas as estimativas não tiveram em conta os custos após o internamento (exceto para doentes seguidos em casa posteriormente) [14]. Alguns estudos mostram que as infeções resistentes são responsáveis por duplicarem a taxa de mortalidade, a probabilidade e o tempo de internamento, quando comparadas com infeções suscetíveis por bactérias da mesma espécie [16]. Outras investigações nos EUA calcularam que mais de 15% das infeções nosocomiais são causadas por bactérias multi-resistentes. Na Europa, investigadores estimaram que em 2007, cerca de 25000 doentes morreram devido a infeções multi-resistentes, o que se traduz em encargos hospitalares de cerca de 900 milhões de euros, com 2,5 milhões de dias extra de internamento [17].

É de realçar que a resistência antimicrobiana selecionada num determinado ano irá persistir, sugerindo que irá causar problemas também nos anos posteriores. Estima-se que os efeitos das resistências nosocomiais irão custar alguns biliões de

dólares só nos EUA, e se as infecções comunitárias forem consideradas, os custos serão ainda maiores [10].

Os estudos existentes não têm em consideração as consequências económicas da inviabilidade dos antibióticos mais utilizados, quer no tratamento, quer na prevenção nos diversos campos da medicina, como a cirurgia, cuidados de recém-nascidos prematuros, oncologia e transplantes, o que poderá aumentar os custos. Estudos recentes indicam um aumento da incidência de infecções resistentes em doentes oncológicos, doentes com órgãos transplantados, crianças e recém-nascidos doentes. Esta tendência associada ao aumento do risco de morte dos doentes com infecções resistentes, faz com que a ameaça de morte prematura destes grupos de doentes imunodeprimidos esteja a aumentar. Ora, o aumento da mortalidade implicará um custo financeiro significativo nos sistemas de saúde e social. Similarmente, a profilaxia através dos antibióticos tem um papel importante na prevenção de infecções em cirurgia. Um estudo calcula que se não houvesse antibióticos à disposição, para prevenir infecções resultantes de cirurgias em doentes submetidos à substituição total da anca, a taxa de infeção seria aproximadamente de 40 a 50% (dos quais 30% morreriam) quando comparadas com a taxa atual de infeção com profilaxia efetiva que ronda os 0,5 a 2%. Consequentemente, o número de doentes submetidos à cirurgia diminuiria, o que levaria a um aumento de morbilidade, traduzindo-se numa perda de produtividade [15].

Existem estudos com conclusões ainda mais alarmantes e extremistas, que defendem que muitos outros estudos têm apenas uma abordagem microeconómica ao incluírem apenas estes custos no setor da saúde, quando deveriam ter uma abordagem macroeconómica, onde incluíssem maiores indicadores económicos, tais como: rendimento nacional, oferta de trabalho, produto interno bruto (PIB) e crescimento económico. Pelo menos um estudo admitiu a hipótese que o aumento da resistência tem potencial para diminuir a qualidade e quantidade da oferta de trabalho, e que a diminuição de produtividade pode resultar num aumento do custo da mesma, resultando num aumento do preço dos bens e serviços, podendo diminuir o PIB. Com a redução do consumo de bens e serviços, os produtores empregarão menos pessoas, aumentando o desemprego e reduzindo o rendimento do agregado familiar e do crescimento económico [15].

Apesar de ser um grande desafio, será importante quantificar a despesa efetiva das resistências aos antibióticos para ajudar e incentivar os profissionais de saúde e decisores políticos a definirem prioridades para a resolução deste problema de saúde pública.

5. Soluções para o problema das resistências

5.1 Abordagens políticas para o controlo das resistências

Como já foi referido, o problema da resistência aos antibióticos tornou-se numa ameaça à saúde pública. Como tal, é fundamental que haja governos com vontade política para agir numa escala global, e que em harmonia com todas as partes interessadas sejam capazes de dar uma resposta eficaz e adequada ao problema [17].

As grandes organizações de saúde internacionais tais como Centro de Prevenção e controlo de Doença Europeu (CPCDE), Agência do medicamento europeu (EMA), Escola de economia e ciência política (EECP), Sociedade de quimioterapia antimicrobiana britânica (SQAB) e sociedade de doenças infecciosas da América (SDIA) têm-se reunido com as partes interessadas, reconhecendo a crescente gravidade do problema. Os relatórios oriundos destas reuniões sugerem várias estratégias para promover o investimento e a inovação na investigação antibacteriana. Além disso, na Suécia, uma iniciativa conhecida por “ação na resistência ao antibiótico” contribuiu com sugestões vitais para os decisores políticos. Em 2009, a União Europeia (UE) e os EUA estabeleceram uma “força armada no combate contra a resistência antimicrobiana”, que propôs uma variedade de ações concretas para promover, nas comunidades médica e veterinária, o uso apropriado dos fármacos antimicrobianos, e para reduzir a propagação da infeção nos cuidados de saúde e em ambientes comunitários. Desenharam ainda três estratégias fulcrais para estimular a investigação de novos antibióticos, mais concretamente, incentivos para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas (e.g. financiamento), apoio coordenado entre UE e EUA para projetos de pesquisa básica com a indústria, e o aceleração do processo de

aprovação dos novos antimicrobianos [1]. A “iniciativa na inovação de medicamentos”, co-fundada pela Comissão Europeia e pela FEIFA, reúne cientistas de instituições acadêmicas e de indústria farmacêutica, juntamente com pequenas e médias companhias, e agências reguladoras, para enfrentarem os desafios científicos da investigação e desenvolvimento de antibacterianos. A CE comprometeu-se também a introduzir um processo acelerado de aprovação de antibióticos e a estabelecer um adequado mercado e condições no preço, para encorajar um investimento ajustado em novos antibióticos [1]. E o conselho da União Europeia lançou recentemente um programa, cujo objetivo é identificar novas moléculas e, posteriormente, apoiar o desenvolvimento dessas moléculas até à fase 1 dos ensaios clínicos. A previsão é identificar 40 a 50 novas moléculas, o que poderá ter um impacto significativo [17].

Em suma, apesar de a inovação ter vindo a ser insuficiente, há um reconhecimento internacional que tem o objetivo de contrariar a tendência, propondo uma ampla variedade de políticas e incentivos destinados a iniciar o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos [17].

5.2 Medidas que visam solucionar o problema das resistências

Provavelmente, não haverá uma solução 100% eficaz, pelo menos enquanto o uso de antibióticos for inevitável, dado que o desenvolvimento de resistências é frequentemente inerente ao seu uso. Contudo, há uma panóplia de medidas que podem ajudar neste problema, que estão incluídas em dois campos principais. São elas a correção do modo de utilização dos antibióticos e o melhoramento do arsenal terapêutico. Não é objetivo desta monografia abordar todas as soluções para este problema, contudo, é importante conhecer um pouco das estratégias que não incluem o encapsulamento dos antibióticos por lipossomas, para ajudar a perceber a importância e viabilidade desta última abordagem.

A correção ou o aperfeiçoamento da utilização dos antibióticos é talvez a vertente mais importante, sendo que o seu uso indiscriminado é a razão principal do aumento das resistências. Neste campo estão abrangidas medidas que promovem a

diminuição da automedicação, da disponibilidade do medicamento sem receita médica, do uso abusivo e irracional de antibióticos em ambulatório e em doentes hospitalizados (para tratamento ou profilaxia), e da resistência cruzada dos antibióticos para uso veterinário e rações de animais (indústria alimentar) [2,10]. Também fazem parte deste campo, desenvolvimento de diagnósticos rápidos e de testes com biomarcadores e sistemas de vigilância da suscetibilidade ao fármaco que permitam o direcionamento de investigações e o uso de antibióticos apropriados para cada situação [10,18,19]. O melhoramento do arsenal terapêutico alberga uma grande diversidade de áreas. O desenvolvimento de tratamentos com baixo potencial de indução de resistência parece ser uma boa aposta. Seguem-se alguns exemplos [18,19]:

- Imunoterapia, pela infusão de anticorpos monoclonais ou por leucócitos que eliminam bactérias;
- Terapia biológica, na qual as bactérias não morrem, mas são-lhes alteradas habilidades para diminuir a inflamação ou a causa da doença;
- Tratamento com probióticos, que competem com as bactérias durante o crescimento microbiano;
- Sequestro de nutrientes do hospedeiro para prevenir o seu acesso pelas bactérias;
- Moderação da inflamação do hospedeiro na resposta à infecção;
- Uso de bacteriófagos, uma vez que estes conferem especificidade.

O desenvolvimento do tratamento através da combinação de compostos num único medicamento tem vindo a contornar a resistência. É o caso do Augmentin[®], que contém o antibiótico amoxicilina adicionado de ácido clavulânico, que é um inibidor da β -lactamase [19].

A descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos são as estratégias centrais no combate à resistência, com especial interesse para aqueles que possuem estruturas químicas que atuam em novos alvos, pois têm uma menor probabilidade de serem sujeitos a mecanismos de resistências existentes (apesar de alguns mecanismos

serem transversais para muitos antibióticos, como o efluxo ou a impermeabilidade aumentada) [20].

Enquanto vários investigadores fazem esforços para descobrir ou desenvolver novos antibióticos, outros estão focados em potenciar a eficácia de antibióticos atualmente em utilização [21]. De facto, o grosso da investigação antimicrobiana continua a ser o desenvolvimento de novos antibióticos, que frequentemente são uma extensão de classes já existentes. No entanto, o progresso na terapia antibacteriana também engloba melhorias dos fármacos já existentes, muitas vezes através de estratégias de encapsulação, usando transportadores como as nanopartículas ou os lipossomas, por exemplo [22].

A distribuição de fármacos mediada por nanopartículas permite melhorar o índice terapêutico, de modo a que seja possível diminuir a dose e a frequência de administração; aumentar a entrada do fármaco no meio intracelular (atenuando o desenvolvimento de resistência); uma melhor acumulação no órgão alvo, limitando efeitos secundários [22]. No entanto, entre vários sistemas de libertação de fármacos, os lipossomas têm atraído mais atenção, devido a várias características que incluem, estabilidade química e biológica, bom poder de solubilização, reduzida captação pelos macrófagos e encapsulamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, para além de permitirem reduzir a toxicidade, aumentar o índice terapêutico e melhorar a vetorização do fármaco ao alvo. É esta a estratégia que vai ser abordada com mais detalhe nesta monografia [22,23].

6. Os lipossomas como sistemas de libertação de fármacos

6.1 Da conceção à aplicação

Em 1965, Alec Bangham e os seus colegas publicaram a primeira descrição dos lipossomas enquanto sistemas fosfolipídicos, o que estabeleceu a base para sistemas membranares. Passados poucos anos, foram descritas diversas estruturas singulares de bicamadas fosfolipídicas fechadas. Gregory Gregoriadis foi o primeiro no

estabelecimento do conceito dos lipossomas, estabelecendo que estes sistemas lipídicos poderiam encapsular fármacos e serem usados como sistemas de distribuição dos mesmos. Outros investigadores foram mostrando que os lipossomas poderiam alterar a distribuição dos fármacos encapsulados *in vivo*, enquanto novos métodos estavam a ser desenvolvidos para permitir a preparação de grandes lipossomas unilamelares, com melhorias na capacidade de encapsulamento e homogeneidade [4]. Durante os anos 70 e 80, vários progressos foram feitos no campo da composição e consequente estabilidade dos lipossomas, permitindo o aumento do seu tempo de circulação sanguínea [6].

Os lipossomas são muito utilizados como veículos de várias moléculas na cosmética e na indústria farmacêutica, quer em soluções coloidais, aerossóis ou em formas semissólidas, tais como géis e cremes [5]. Na cosmética foram introduzidos pela primeira vez, em 1986 pela Dior. Na indústria farmacêutica em 1995, doxorubicina (Doxil®) foi o primeiro composto veiculado por lipossomas aprovado pela FDA [24].

Os estudos e os avanços desta tecnologia permitem que, atualmente, ocorra uma miríade de ensaios clínicos em diversas áreas, como na veiculação de fármacos antitumorais, antifúngicos, antibióticos, ácidos nucleicos, vacinas, anestésicos e anti-inflamatórios [5,6].

6.2 Estrutura e propriedades dos lipossomas

Designam-se lipossomas os sistemas vesiculares formados quando fosfolípidos são dispersos em água, e espontaneamente formam estruturas enclausuradas constituídas por camadas de membranas fosfolipídicas, com um ambiente interno aquoso. Os lipossomas são vesículas esféricas, que podem ser produzidas com fosfolípidos, cadeiras longas de ácidos gordos, colesterol, surfatantes não tóxicos, esfingolípidos, glicolípidos e proteínas de membrana. Estes são também, como já foi enunciado, veículos de uma grande variedade de moléculas, incluindo pequenos fármacos, proteínas, nucleótidos e até plasmídeos [6,24].

Estruturalmente, os lipossomas podem ser classificados em vesículas multilamelares (MLVs) quando possuem múltiplas bicamadas, ou em vesículas unilamelares (ULVs) quando têm apenas uma bicamada. Os ULVs podem ainda ser classificados em pequenas vesículas unilamelares (SUVs), quando o seu tamanho está compreendido entre os 20 e os 100 nm, ou em grandes vesículas unilamelares (LUVs), quando o mesmo é superior a 100 nm [24].

Como já foi referido, os lipossomas conseguem veicular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os primeiros são encapsulados no interior da vesícula, dissolvidos no espaço aquoso. Os últimos ficam localizados na bicamada lipídica, e os compostos com carga elétrica ficam adsorvidos à superfície lipídica, como representa a figura 8.1 [25].

As propriedades dos lipossomas podem divergir, podendo-se dividi-los em 4 grandes grupos: lipossomas convencionais, lipossomas “stealth”, lipossomas ativos e lipossomas eletricamente carregados [26].

Os lipossomas convencionais são o tipo de vesículas mais utilizado, apesar das estruturas relativamente instáveis, da reduzida capacidade de transporte e encapsulação, para além dos problemas relacionados com a biodistribuição e vetorização. O colesterol é frequentemente adicionado para conferir estabilidade [26.27].

Lipossomas “stealth” ou lipossomas estabilizados estericamente têm polímeros hidrofílicos de cadeia longa incorporados, maioritariamente ancorados, tais como polietilenoglicóis (PEG), conferindo estabilidade e proteção ao fármaco, o que permite maior tempo de semivida de circulação [26.27].

Lipossomas ativos contêm substâncias que providenciam uma libertação seletiva e controlada, que pode ser ativada de dois modos. A ativação por afinidade está associada a compostos que interagem por afinidade, como por exemplo antígenos, anticorpos, enzimas, proteínas, vitaminas ou recetores, em que depois da interação com o alvo, a substância encapsulada é libertada. O outro mecanismo de libertação envolve a incorporação de um composto que promove alterações estruturais no lipossoma e, conseqüentemente, a libertação do fármaco, como resposta a determinados estímulos externos. Alterações do pH, concentrações de iões, temperatura ou irradiação de luz são alguns exemplos [26].

Lipossomas eletricamente carregados possuem fosfolípidos possuidores de carga, que influenciam o mecanismo e a extensão da interação entre o lipossoma e a célula. Mais concretamente, uma superfície com carga elevada promove essa interação, para além permitir a interação com macromoléculas com carga oposta, isto é, ADN, ARN e proteínas, e de facilitar a internalização de substâncias com elevado peso molecular [26,28].

No entanto, existem outras alternativas para classificar os lipossomas, como está representado na figura 6.1.

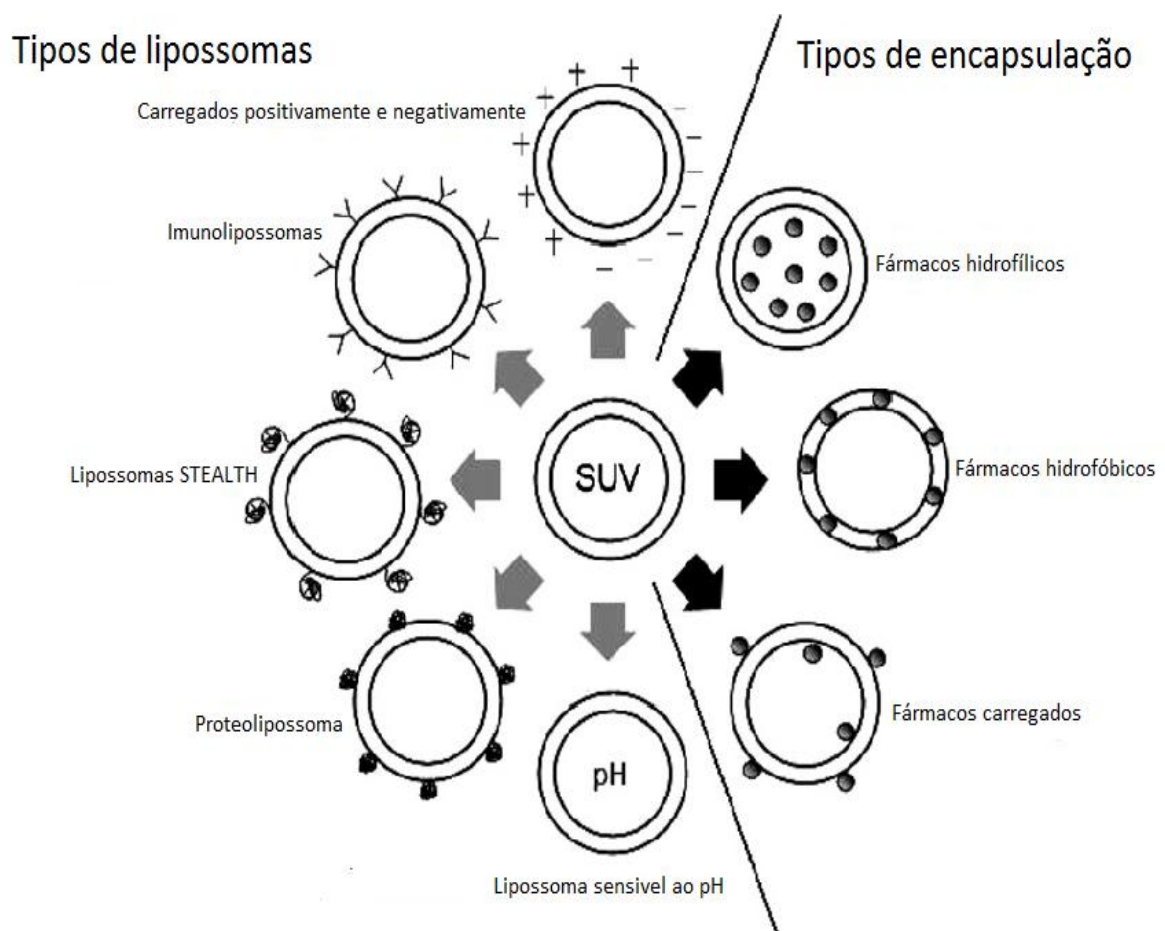


Figura 6.1 - Classificação dos lipossomas [adaptado de (25)]

6.3 Preparação de lipossomas

Existe uma variedade de métodos de preparação de lipossomas que resulta em diferentes tipos de vesículas, divergindo no tamanho e características. A evaporação da fase reversa, reidratação e desidratação, injeção de etanol, injeção de éter e hidratação do filme lipídico fazem parte do leque de processos existente [29].

Como já foi referido, Alec Bangham e os seus colegas publicaram a primeira descrição dos sistemas fosfolipídicos. Nesta preparação dos lipossomas foi utilizado o método de hidratação de filme lipídico (atualmente o método mais reportado), que consiste na dissolução de lípidos num ou mais solventes orgânicos, seguido da evaporação do(s) solvente(s), formando um filme lipídico. De seguida, este é hidratado com água ou solução tampão, sob agitação vigorosa, favorecendo a formação de MLVs com diferentes tamanhos e número de camadas [29,30]. Se o fármaco for hidrofílico é incorporado na solução tampão, por outro lado, se for lipofílico é dissolvido na mistura lipídica [30]. Este método tem uma reduzida eficácia no encapsulamento, especialmente para fármacos hidrofílicos [6,30]. Depois da formação dos MLVs, é possível obter-se SUVs ou LUVs, através de métodos mecânicos, químicos ou eletrostáticos, sendo os mecânicos os mais utilizados. Destacam-se a sonicação (aplicação de ultrassons) e a extrusão (homogeneizadores de alta pressão), na qual os homogeneizadores exercem pressão sobre as vesículas, com gases inertes que obrigam os lipossomas a passarem por filtros com poros de tamanho definido. Todo este processo está representado na figura 6.2 [31].

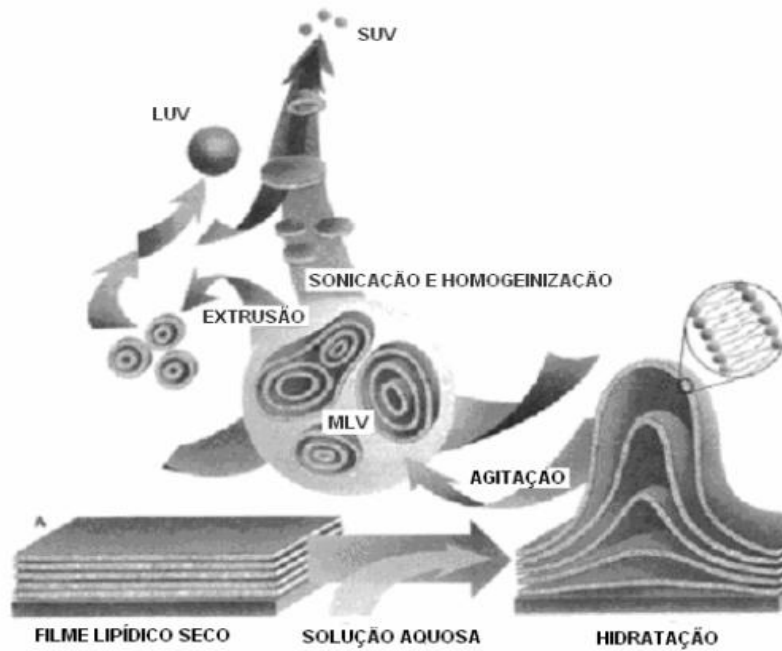


Figura 6.2 – Representação da preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e subsequentes operações aplicadas para obtenção de diferentes tipos de lipossomas [adaptado de (31)].

6.4 Vias de administração

São várias as vias de administração utilizadas em experiências com antibióticos lipossomais. Estas podem-se dividir em invasivas (intraperitoneal, intramuscular, intravítrea, intravenosa) e não invasivas (percutânea, oral, inalatória) [32].

6.4.1 Vias invasivas

As injeções intraperitoneais são preferíveis para a administração em animais devido à facilidade de acesso e possibilidade para administrar doses elevadas, contudo, não é muito comum a utilização em humanos [32].

Injeções intramusculares são utilizadas para administração de antibióticos livres, mas nem tanto com fármacos lipossomais [32].

A via de administração intravítrea de antibióticos livres necessita de frequentes injeções, o que provoca a hemorragia retinal e, conseqüentemente, a não adesão à terapêutica, o que faz dos lipossomas uma alternativa interessante devido às suas propriedades que permitem a libertação prolongada [32].

A administração intravenosa é a mais popular para fármacos lipossomais. Porém, existe a desvantagem de uma rápida depuração plasmática pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS). Para além disso, é necessário que as vesículas tenham um tamanho compreendido entre 100 e 200 nm [31,32].

6.4.2 Vias não invasivas

A administração percutânea é atrativa, uma vez que é indolor, tem uma boa relação custo-benefício, não necessita de dispositivos e leva geralmente a uma boa adesão à terapêutica. Existem tratamentos com antibióticos livres para aplicação percutânea, como fosfato de clindamicina e eritromicina, contudo, já foram dadas provas de uma melhoria através do encapsulamento de antibióticos para este tipo de aplicação. O caso da clindamicina lipossomal é exemplificativo, pois já demonstrou aumentar a eficácia, no tratamento da acne vulgaris, devido ao incremento da penetração na pele. [32,33].

A via de administração por inalação é a mais comum nos antibióticos lipossomais, utilizando-se pósecos (através de inaladores) ou formulações líquidas (através de nebulizadores ou inaladores pressurizados). Por esta via, os fármacos encapsulados podem ser libertados diretamente no pulmão, o que é muito útil para doenças respiratórias, tornando os fármacos mais eficazes com doses mais baixas, para além de diminuir o tempo de circulação (reduzindo em ambos os casos a toxicidade sistémica) [21,32].

7. Encapsulamento lipossomal de antibióticos e diminuição da resistência aos antibióticos

7.1 Vantagens do encapsulamento lipossomal de antibióticos

De seguida, serão descritas várias vantagens do encapsulamento de antibióticos (onde estão realçados os seus contributos na superação das resistências), que têm sido o foco de inúmeros trabalhos, como a melhoria da farmacocinética e biodistribuição, a diminuição da toxicidade, a potenciação da atividade contra bactérias intracelulares, a melhoria da seletividade no alvo e a potenciação da atividade contra bactérias extracelulares [21,25].

7.1.1 Melhoria da farmacocinética e biodistribuição, e perfil de toxicidade

A administração sistémica é frequentemente ineficiente, podendo não providenciar uma concentração terapêutica no tecido infetado, antes de provocar efeitos secundários graves. Estas concentrações sub-terapêuticas podem exacerbar complicações infecciosas e promover resistências aos antibióticos [22].

Por outro lado, a administração de doses elevadas e frequentes (efeitos de curta duração) podem elevar a toxicidade, o custo e diminuir a adesão à terapêutica, e por conseguinte, o desenvolvimento de resistências [34].

Uma das vantagens dos lipossomas consiste na libertação gradual e constante de antibióticos, o que permite manter o fármaco na concentração pretendida, mais concretamente, acima da concentração mínima inibitória (MIC), durante mais tempo. O encapsulamento lipossomal melhora a farmacocinética e protege antibióticos contra a atividade hidrolítica dos enzimas e contra a desativação imunológica e química [25].

Os lipossomas convencionais administrados intravenosamente são reconhecidos como antígenos estranhos ao sistema imunológico, sendo por isso

opsonizados (processo no qual ocorre a fixação de moléculas que ajudam no reconhecimento e captura pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS)) [25]. A opsonização pode desestabilizar o lipossoma, provocando a liberação do fármaco, contudo, esta pode ser desejada para o tratamento de infecções por bactérias intracelulares (como será posteriormente demonstrado em detalhe). A taxa de opsonização depende das propriedades do lipossoma, como o tamanho, a carga e a rigidez. A depuração plasmática das vesículas pequenas (aproximadamente 100 nm) pode ter a duração de várias horas, enquanto a depuração das MLVs pode durar apenas vários minutos. As vesículas rígidas ou sem carga têm um tempo de circulação maior do que as fluidas ou carregadas, no entanto, as duas últimas são as que têm apresentado maior atividade antimicrobiana. Os lipossomas “stealth” estão protegidos do MPS, o que reduz a sua captura, resultando num tempo de semivida longo [25,35].

Este sistema de liberação de fármacos permite concentrações elevadas de fármaco no local de infeção, uma vez que a permeabilidade capilar aumenta neste local, permitindo a passagem do lipossoma. Por acrescento, a presença de antigénios bacterianos induz uma resposta inflamatória, o que incrementa ainda mais o extravasamento do lipossoma. Este mecanismo promove significativamente a atividade antibacteriana [25].

A capacidade dos lipossomas reduzirem a toxicidade dos antibióticos pode tornar mais generalizada a utilização dos antibióticos cuja toxicidade e eficácia são elevadas, já que até ao momento a sua utilização se limita a casos extremos, como é o caso da polimixina B. O encapsulamento da deste por lipossomas reduz efeitos adversos, que incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular e, para além disso, ainda se verifica uma melhoria da sua atividade antimicrobiana [24]. Por outras palavras, a redução da toxicidade permite que seja utilizada uma maior diversidade de antibióticos, aliviando a pressão de desenvolvimento de resistências de outros antimicrobianos.

7.1.2 Potenciação da atividade contra bactérias intracelulares

O tratamento de infecções provocadas por bactérias alojadas dentro de células de monócitos ou neutrófilos é um verdadeiro desafio, devido à reduzida atividade do antimicrobiano no meio ácido dos lisossomas e à sua baixa captura pelas células fagocitárias [36]. Além disso, o aumento das multirresistências faz com que o tratamento se torne num desafio ainda maior. A terapia, geralmente, envolve a combinação de fármacos durante longos períodos de tempo. Apesar disso, idealmente os antibióticos que têm como alvos bactérias intracelulares, deveriam superar a barreira membranar, libertar-se e ficar retidos no meio intracelular a uma concentração terapêutica, durante o tempo desejado [34]. Torna-se assim importante o uso de sistemas de libertação de fármacos (como os lipossomas), com capacidade de direcionamento para células fagocitárias, com o objetivo de melhorar a terapia contra as infecções intracelulares [37].

Os lipossomas têm sido testados em vários tipos de infecção, tendo obtido bastante sucesso no combate às bactérias intracelulares. Uma das primeiras experiências consistiu na erradicação da *Listeria monocytogenes*, na qual foi utilizada ampicilina encapsulada, que foi rapidamente fagocitada por macrófagos. Numa outra experiência, utilizou-se gentamicina encapsulada em lipossomas convencionais para tratar a brucelose. Neste processo, os lipossomas foram captados pelo MPS no fígado e baço, o que levou a uma diminuição do número de bactérias nos tecidos desses órgãos. Vancomicina encapsulada por lipossomas provou melhorar o resultado do tratamento clínico de infecções intracelulares por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Também já foi demonstrado que a aplicação de lipossomas com isoniazida, rifampicina e claritromicina na tuberculose, potencia a eficácia antibacteriana em comparação com o uso destes antibióticos na forma livre [25].

7.1.3 Melhoria da seletividade no alvo

Vários trabalhos têm demonstrado a possibilidade de vetorizar os lipossomas para determinados órgãos, tecidos ou microorganismos. A interação não específica ou específica com o alvo é inerente à composição da superfície da vesícula. Quando a interação não é específica, a composição fosfolipídica e a carga da membrana são os

factores mais preponderantes na vetorização. São utilizadas vesículas sensíveis ao pH ou à temperatura e com carga, sendo que os lipossomas com carga positiva são aqueles que têm interações mais fortes com as células, pois estas possuem cargas negativas. Por outro lado, lipossomas com ação específica estão equipados com proteínas, oligossacarídeos, anticorpos ou fragmentos de imunoglobulina na sua superfície, possuindo uma afinidade específica com os recetores do alvo definido, quer sejam células infetadas ou agentes patogénicos. Ou seja, os lipossomas podem ser vetorizados, através de ligandos ancorados para determinadas bactérias ou estruturas bacterianas, como por exemplo, biofilme (conjunto de bactéria aderentes entre si e a uma superfície) [25].

A capacidade de vetorização dos fármacos também pode ser bastante útil para o tratamento e prevenção de formação de biofilmes. As bactérias produtoras de biofilmes (frequentemente encontradas em dispositivos médicos, como os cateteres) são extremamente difíceis de erradicar, pois estão cobertas por uma matriz extracelular, constituída por substâncias poliméricas que lhes conferem resistência, impedindo a interação dos fármacos com as bactérias. Através dos lipossomas promove-se a concentração dos antibióticos na matriz do biofilme, permitindo a libertação dos mesmos, na vizinhança dos micro-organismos [25].

De modo transversal, os sistemas de libertação de fármacos proporcionam a vantagem da vetorização dos antibióticos, provocando um menor nível de resistência do que a administração sistémica do fármaco. Para além disso, existe uma boa correlação entre a proteção da microbiota e a prevenção da colonização de bactérias resistentes. É por isso importante que, um dos critérios das tecnologias emergentes aplicadas aos antimicrobianos, seja proteger a microbiota, o que é possível através de sistemas de libertação de fármacos, como os lipossomas [22].

7.1.4 Potenciação da ação contra bactérias extracelulares

Vários trabalhos têm utilizado lipossomas para vetorização de antibióticos para agentes patogénicos extracelulares, revelando, em muitos casos, o aumento da atividade antimicrobiana. Por exemplo, Fluidosomes® (formulações de lipossomas que

adotam uma conformação fluida) fundem-se com a membrana da *Pseudomonas aeruginosa*, libertando o antibiótico diretamente no espaço periplasmático, o que permite baixar a concentração mínima inibitória (MIC) relativamente ao do antibiótico livre. A interação entre os lipossomas e a membrana da bactéria tem-se tornado bastante promissora no tratamento de infeções por estirpes resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, cujos mecanismos de resistência são na sua maioria relacionados com baixa permeabilidade e sistemas de efluxo. Também por esta razão, a aplicação de antibióticos encapsulados por lipossomas pode superar os mecanismos de resistência [25]. Outros estudos demonstram que aminoglicosídeos como gentamicina, ampicacina e tobramicina, quando administrados na forma lipossomal possuem um MIC inferior ao registado para os fármacos não encapsulados. O aumento de eficácia é atribuído à potenciação da penetração do fármaco na membrana bacteriana pouco permeável, como se verifica nas estirpes resistentes de *Burkholderia cenocepacia* [38].

7.2 Desvantagens do encapsulamento de fármacos por lipossomas

A utilização de lipossomas providencia uma série de vantagens como foi descrito anteriormente, porém, possui algumas barreiras gerais independentes da natureza do fármaco encapsulado, que os impedem de serem usados como seria desejado. De seguida serão enunciadas, de modo sucinto, desvantagens da aplicação dos lipossomas [23,25].

- Baixa estabilidade
 - Química
 - Oxidação de fosfolípidos
 - Hidrólise de fosfolípidos
 - Peroxidação
 - Física
 - Libertação precoce dos fármacos

- Agregação ou fusão de lipossomas
 - Dificuldade de esterilização
 - Toxicidade
 - Preço elevado
 - Complexidade de equipamento
 - Possíveis reações alérgicas

Uma das desvantagens dos antibióticos lipossomais é o curto tempo de validade das vesículas lipídicas, devido à sua instabilidade. Esta pode ser dividida em química ou física [25].

A instabilidade química pode ser derivada da hidrólise de ligações ésteres ou oxidação e/ou peroxidação de cadeias insaturadas de lípidos dos lipossomas, sendo que estas reações ocorrem em fosfolípidos naturais ou sintéticos. Além do mais, os fosfolípidos naturais exibem uma diversidade estrutural, promovendo a formação de fosfolípidos únicos quanto à composição, o que causa diferenças na estabilidade. Desta maneira, a estabilidade dos fármacos encapsulados depende principalmente da composição lipídica, sendo a temperatura de armazenamento um fator importante. A adição de componentes antioxidantes ou o recurso a um processo de liofilização podem ajudar a prevenir a oxidação [25].

Por outro lado, a instabilidade física provoca libertação precoce dos fármacos ou a agregação e/ou fusão dos lipossomas, formando partículas de maiores dimensões, o que influencia a sua farmacocinética e, posteriormente, poderá afetar o índice terapêutico [3]. De facto, os problemas de estabilidade ocorrem *in vivo*, pois nas condições fisiológicas a sua estabilidade diminui devido às interações das membranas lipossomais com os componentes dos fluidos do organismo [25].

A esterilização dos lipossomas é uma barreira para a sua utilização, já que os seus processos convencionais têm problemas associados. No caso da esterilização com recurso a altas temperaturas, esta apenas pode ser utilizada para fármacos lipofílicos e termoestáveis. Por outro lado, a esterilização por filtração apenas pode ser utilizada para vesículas com tamanho inferior às bactérias. Concomitantemente, não garante a remoção de partículas virais. O método da liofilização tem a desvantagem da

dificuldade da remoção dos agentes químicos, como o óxido de etileno. Também o método de irradiação não é compatível com os lipossomas [39].

Como já foi abordado, os lipossomas apresentam biocompatibilidade. No entanto, é associada toxicidade a lipossomas carregados e vazios, resultado da carga elétrica lipossomal e da presença de solventes orgânicos voláteis. Um estudo indicou que lipossomas eletricamente carregados provocaram efeitos citotóxicos ao contrário dos lipossomas neutros, contudo, esta informação não está completamente elucidada. Os resíduos dos solventes nem sempre são completamente removidos, o que pode conduzir a efeitos citotóxicos [21].

Para além do preço elevado, os métodos de preparação de lipossomas com baixa taxa de encapsulamento tornam a aplicação destes bastante mais cara do que o tratamento com antibióticos convencionais. Por acrescento, os métodos de preparação utilizados em laboratório são muito complexos e caros, impossibilitando em alguns casos de produzir em grande escala [23,25].

7.3 Mecanismos de ação dos lipossomas em infeções bacterianas intracelulares

Como já foi referido anteriormente, os lipossomas, como sistemas de libertação, permitem a vetorização seletiva para células fagocitárias e o aumento da penetração celular. A vetorização pode ser passiva ou ativa. A passiva é conseguida através da capacidade inerente das células fagocitárias em ingerir os lipossomas, que são reconhecidos como corpos estranhos ao organismo. A vetorização ativa é concretizada pela modificação da superfície do lipossoma (através de adição de ligandos), de modo a desenvolver afinidade, através do reconhecimento e interação específica com os recetores das células alvo. Para além de os ligandos incorporados poderem favorecer a interação com os macrófagos, também podem inibi-la, se o objetivo for aumentar o tempo de semi-vida em detrimento de uma rápida entrada nas células [37].

O principal mecanismo pelo qual os lipossomas são capturados pelas células fagocitárias consiste nas seguintes fases: adsorção à membrana celular; internalização da vesícula, dependente de consumo de energia; fusão das vesículas endocíticas (endossomas) com os lisossomas (principal local de alojamento das bactérias intracelulares), formando fagolisossomas; por fim, os enzimas lisossomais convertem os lípidos em ácidos gordos, promovendo a libertação dos fármacos [37,21]. Apesar disso, quando as bactérias estão alojadas no citoplasma, podem ser usados lipossomas sensíveis ao pH que permitam a sua fusão com a membrana endossomal, libertando o fármaco para o citoplasma. A adsorção do lipossoma à superfície celular parece ser o passo limitante deste processo, uma vez que se assume que as vesículas estavelmente adsorvidas são mais suscetíveis de serem capturadas do que os lipossomas fracamente adsorvidos [37,40].

Existem outros mecanismos de interação, tais como: degradação enzimática da bicamada lipídica (com conseqüente libertação do fármaco na vizinhança da célula), difusão não facilitada (fármacos hidrofóbicos), destacando-se a troca lipídica com a célula, a fusão e a endocitose mediada por recetores [37].

A troca lipídica (representada na figura 9.1) é uma interação de longo alcance, que consiste na troca de lípidos lipossomais (incluindo o fármaco) com variados lípidos da membrana celular [41].

A figura 9.1 também inclui o processo de fusão, o qual requer a fusão de membranas biológicas, e é também importante para a libertação de fármacos lipídicos. Mais detalhadamente, o contacto próximo dos lipossomas promove a mistura e difusão dos lípidos lipossomais com os lípidos da membrana plasmática alvo, permitindo assim a libertação dos fármacos encapsulados no compartimento aquoso, diretamente para o citoplasma. Por outro lado, os compostos incorporados na bicamada lipídica do lipossoma são libertados na membrana da célula [21].

A endocitose inclui dois processos semelhantes: fagocitose e endocitose mediada por recetores (representados na figura 7.1).

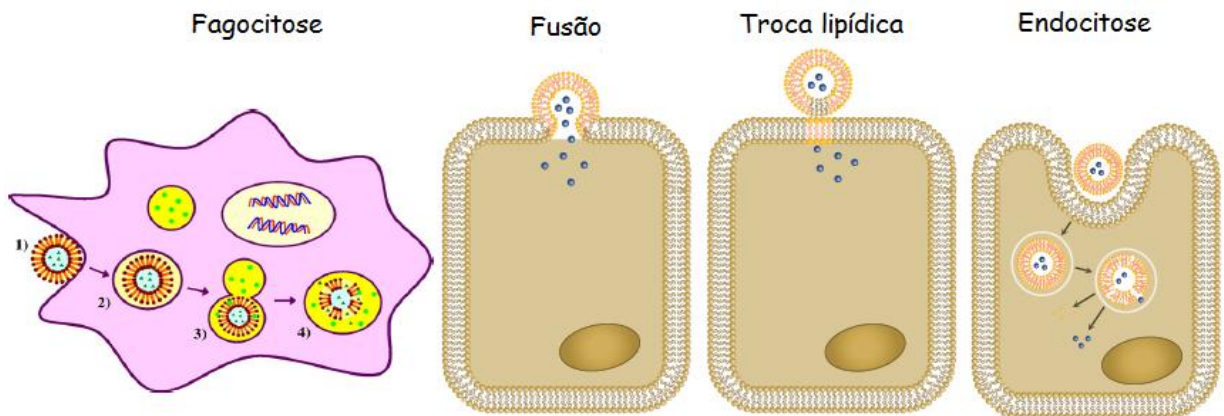


Figura 7.1 - Mecanismos de penetração de antibióticos encapsulados por lipossomas em células fagocitárias. À esquerda estão representadas as várias fases do mecanismo de penetração de antibiótico encapsulado por lipossoma, por fagocitose, em células fagocíticas: 1) adsorção à membrana da célula; 2) internalização da membrana 3) fusão da vesícula com o lisossoma; 4) degradação do lipossoma e liberação do fármaco.

7.4 Mecanismo de ação dos lipossomas em infecções bacterianas extracelulares

A composição dos lipossomas tem um papel importante na eficácia antibacteriana dos mesmos. Esta permite a interação com vários constituintes das membranas externas bacterianas, como por exemplo, glicoesfingolípidos e lipopolisacarídeos. Após a interação pode ocorrer a fusão do lipossoma com a membrana externa bacteriana, que conseqüentemente promove a liberação do fármaco para o interior das células bacterianas. No caso das bactérias gram-positivas, o peptidoglicano serve de barreira, dificultando o contacto direto com os lipossomas, o que faz com que a fluidez da bicamada lipossomal seja particularmente importante [42]. Lipossomas com membrana fluida são capazes de libertar os seus compostos depois da interação com a barreira peptidoglicana externa, enquanto lipossomas que possuam uma estrutura rígida libertam os seus fármacos lentamente e, por conseguinte, são menos eficazes contra bactérias gram-positivas [42,43].

7.5 Aplicação dos antibióticos lipossomais em infecções bacterianas

Neste capítulo serão referidos vários estudos efetuados com antibióticos lipossomais contra bactérias resistentes e suscetíveis, elucidando o progresso que está a ser feito nesta área.

7.5.1 Testes realizados em bactérias resistentes

De seguida serão enunciados estudos realizados com antibióticos lipossomais contra bactérias resistentes, demonstrando que efetivamente os lipossomas permitem superar resistências de bactérias aos antibióticos.

Um estudo demonstrou que antibióticos aminoglicosídeos, nomeadamente amicacina, gentamicina e tobramicina, poderiam ter sucesso no tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas Aeruginosa* (*P.Aeruginosa*) resistentes, devido ao seu mecanismo de potenciação da entrada de fármacos na célula. Nesta experiência, onde as culturas bacterianas foram provenientes de doentes com fibrose cística, os antibióticos encapsulados possuíram uma atividade significativamente superior aos fármacos na forma livre, sendo que os MICs dos primeiros foram 4 vezes menores que os dos últimos. A melhoria do tratamento das infecções causadas por estas bactérias (das quais 90% são multirresistentes, destacando-se a reduzida permeabilidade) é particularmente importante, uma vez que são a maior causa de morbilidade e mortalidade destes doentes [44].

Numa experiência realizada para testar tobramicina liposomal em estirpes resistentes de *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia*, verificou-se a redução dos MICs em comparação com o fármaco convencional, em ambas as espécies. Os autores sugerem que o sistema de libertação de fármacos utilizado poderá ser útil contra organismos

resistentes, que afetam frequentemente doentes com infecções crônicas pulmonares [45].

Têm sido estudadas formulações lipossomais com o objetivo de reduzir a resistência celular, melhorando a interação com a bactéria e incrementando a reduzida permeabilidade celular. Como tal, foi elaborada uma investigação para testar o comportamento de polimixina B encapsulada por lipossomas em *P. aeruginosa* resistente. No estudo, observou-se uma redução dos MICs e um aumento dos níveis do antibiótico dentro da bactéria para a polimixina B lipossomal, em relação à polimixina B livre. Através dos resultados, os autores sugerem que a polimixina B lipossomal foi capaz de superar os mecanismos das resistências destas bactérias [46].

Foi realizado um outro estudo, no qual é testada a eficácia da vancomicina lipossomal contra MRSA. Estas bactérias são a maior causa de pneumonia nosocomial, podendo persistir em macrófagos alveolares e contribuir para o insucesso do tratamento com a vancomicina. Foi demonstrado que a vancomicina livre é incapaz de eliminar as bactérias, devido à reduzida penetração nas células fagocitárias. Por outro lado, o tratamento com vancomicina encapsulada por lipossomas convencionais (ausência de PEG) obteve uma concentração de antibiótico, no meio intracelular dos macrófagos, suficiente para ter o efeito bactericida contra MRSA. Contudo, lipossomas possuidores de PEG não surtiram efeito em MRSA, provavelmente devido à fagocitose demorada, derivada do efeito protetor de PEG [47].

Também já num estudo mais antigo, a vancomicina e teicoplanina encapsuladas por estes sistemas provaram ter uma maior eficácia contra MRSA, comparativamente às suas formas livres, derivado do aumento da captação de fármacos pelos macrófagos [48].

Outra experiência foi realizada para averiguar a eficácia de ácidos oleicos encapsulados, em infecções cutâneas por MRSA. Sabia-se que os ácidos gordos livres e os seus ésteres possuíam atividade bacteriana, especialmente em bactérias gram-positivas. Contudo, não se conhecia ao certo os mecanismos de ação, suspeitando-se da rutura e do aumento da permeabilidade da membrana celular. Estes mecanismos pouco específicos são relevantes na redução da resistência. Na experiência realizada, os ácidos oleicos foram integrados nas membranas lipossomais, promovendo a solubilidade, a penetração na pele e o melhoramento da eficiência destes. Sugerem

portanto, um elevado potencial para o tratamento de infecções cutâneas por MRSA [49].

Noutra investigação, onde se utilizou uma nanoformulação lipossomal de ácido linolénico, verificou-se que a sua eficácia era superior à terapia convencional para o tratamento de *Helicobacter pylori*. Os lipossomas utilizados erradicaram todas as estirpes testadas desta espécie, incluindo as resistentes. Para além disso, durante as experiências, aquando da utilização de concentrações sub-bactericidas, as bactérias não desenvolveram resistências [50,51].

7.5.2 Testes realizados em bactérias suscetíveis

O sucesso dos testes realizados com antibióticos encapsulados por lipossomas, no tratamento de infecções por bactérias suscetíveis, também é importante, especialmente quando estes têm uma maior eficácia que os antibióticos na forma livre, dado que o aumento da concentração intracelular de antimicrobianos e a diminuição da MIC geram uma menor pressão para o desenvolvimento de resistências [44,49]. De seguida, vão ser enunciados esses testes de modo sucinto na tabela 9.1.

Tabela 7.1- Resumo de resultados obtidos de testes realizados com antibióticos lipossomais em bactérias suscetíveis.

Antibiótico encapsulado	Bactéria alvo	Composição do lipossoma	Referência
Amikacina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(DPPC) e colesterol	52
Ampicilina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Colesterol, fosfatidilcolina e fosfatidilserina	53
Benzilpenicilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (Biofilme)	DPPC, colesterol, e DC-chol	24

Ceftazidima e Cefepima	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	phosphatidylcholine (PC), colesterol e α -tocopherol	54
Ciprofloxacina	<i>Francisella tularensis</i>	fosfatidilcolina (do ovo) e colesterol	55
Clofazimina	<i>Mycobacterium avium</i>	DMPC e DMPG)	56
Esparfloxacina	<i>Mycobacterium avium</i>	DPPG, DPPC e COL	57
Estreptomicina	<i>Mycobacterium avium</i>	fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina e colesterol	24
Gentamicina	<i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	DOPE	58
Meropenem	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PC/DOPE/SA ou PC/DOTAP/Chol	59
Netilmicina	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i>	Fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidilinositol	60
Ofloxacina	<i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	MC/COL/PS e MC/COL/DP	61
Polimixina B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DPPC e colesterol	62
Rifabutina	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DPPC: DPPG	63
Tobramicina	<i>Pseudomonas</i>	DPPC e DMPG	59

	<i>aeruginosa</i>		
--	-------------------	--	--

7.6 Ensaios clínicos

A amicacina encapsulada por lipossomas, como se tem vindo a verificar em diversos trabalhos, possui um elevado potencial. De tal forma que, ArikaceTM (amicacina lipossomal), atingiu a 3ª fase de ensaios clínicos [64]. Esta foi desenvolvida para aplicação inalatória, como alternativa de tratamento às infeções pulmonares por *P. aeruginosa*, em doentes com fibrose cística. Para tal, Arikacetm consiste em lipossomas de tamanho reduzido (0.3µm) e sem carga, o que permite a penetração no biofilme formado pelas bactérias [25].

Continuando com o exemplo da amicacina, Mikasome[®] consiste em amikacina lipossomal unilamelar com cerca de 50nm, que está direcionado para a erradicação micobacteriana, tendo já passado a 2ª fase de ensaios clínicos. É de destacar que, numa das experiências efetuadas, verificou-se que durante 11 semanas de tratamento, o MIC não se alterou, ao contrário da amicacina convencional, o que sugere que durante esse tratamento não se desenvolveram resistências ao fármaco [64,65].

Outro antibiótico encapsulado pelos lipossomas presente em ensaios clínicos é a ciprofloxacina, desenvolvida também para o tratamento de doentes com fibrose cística (ARD-3100) ou com bronquiectasias não causadas pela fibrose (ARD-3150). Em 2008, procedeu-se à 2ª fase dos ensaios clínicos com esses doentes infectados por *P. aeruginosa*. A ciprofloxacina lipossomal foi administrada por via inalatória através de um nebulizador, obtendo-se uma boa tolerância e eficácia, e uma concentração sérica inferior à do antibiótico convencional [64].

Tobramicina lipossomal (ARB-CF0223) também se encontra em ensaios clínicos para o tratamento de infeções respiratórias em pacientes com fibrose cística, tendo demonstrado bons resultados a nível da segurança, eficácia e frequência de administração [66].

Conclusão

Como foi demonstrado nesta monografia, o rápido desenvolvimento e a perda demorada de resistência, o número reduzido de novos antibióticos e os elevados custos monetários e não monetários, fazem com que haja uma forte e urgente necessidade de contornar estas resistências.

O encapsulamento de antibióticos por lipossomas demonstra ter potencial para surgir como alternativa para ajudar no problema das resistências aos antibióticos, derivado das várias vantagens que oferece. Tanto na farmacocinética e biodistribuição, estabilizando a concentração sérica do fármaco, como na melhoria da seletividade, e até mesmo na potenciação do efeito terapêutico dos antibióticos contra bactérias suscetíveis, reduzindo a indução de desenvolvimento das resistências, parece haver espaço para esta nova abordagem. De referir ainda a potenciação da atividade terapêutica de antimicrobianos contra bactérias resistentes, sendo esta justificada principalmente pela superação direta das resistências que envolvem a impermeabilização das bactérias e sistemas de efluxo. O mecanismo genérico está associado à possibilidade da estrutura dos lipossomas permitir uma melhor interação e entrada do fármaco nas bactérias ou nas células infetadas, aumentando a quantidade de fármaco no meio intrabacteriano, saturando as bombas de efluxo.

Contudo, estes sistemas de libertação de fármacos têm desvantagens que impedem a sua rápida difusão de utilização, nomeadamente a instabilidade, dificuldade de esterilização, preço elevado e complexidade de equipamento associado à sua produção.

Muitos casos de antibióticos lipossomais já demonstraram melhorias farmacodinâmicas e farmacocinéticas, relativamente aos antibióticos convencionais contra bactérias suscetíveis e resistentes, evidenciando elevado potencial.

Neste momento, existem já antibióticos encapsulados em lipossomas em ensaios clínicos, como a amicacina (Arikace® e Mikasome®), a ciprofloxacina e a tobramicina. Isto sugere que, pelo menos em alguns casos, será viável a aplicação desta tecnologia.

Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos

Apesar dos lipossomas não serem muito recentes, a sua aplicação em antibióticos está a dar os primeiros passos, sendo que ainda serão necessários mais estudos para testar a viabilidade de mais exemplares antibacterianos.

Bibliografia

1. Rustam I. Aminov. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. 2010, 1, 134, 1-7.
2. Alfonso J. Alanis. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*. 2005, 36, 697–705.
3. Chopra, L. Hesse and A.J. O'Neill. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2002, 92, 4S–15S.
4. Theresa M. Allen, Pieter R. Cullis. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, 65, 36–48.
5. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*. 2013, 8, 1.
6. Abdus Samad, Y. Sultana, M. Aqil. Liposomal drug delivery system: an update review. *Current Drug Delivery*. 2007, 4, 297-305.
7. Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker (2010). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Ed. 11, Porto Alegre.
8. Michael A. Kohanski, Daniel J. Dwyer, Boris Hayete, Carolyn A. Lawrence, James J. Collins. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 2007, 130, 797–810.
9. Christopher Walsh. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *NATURE*. 2000, 406, 775-781.
10. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Natural Medicine*. 2004, 10, S122–S129.
11. K. Poole. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2002, 92, 55S–64S.
12. Peter A. Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, 57, 1471–1485.
13. P.A. Lambert. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2002, 92, 46S–54S.
14. Michael N. Alekshun, Stuart B. Levy. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007, 128, 1037-1050.

15. S. Gandra, D. M Barter, R. Laxminarayan. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clinical Microbiology and Infection*. 2014.
16. French G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, 57, 1514– 1527.
17. Ursula Theuretzbacher. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012, 39, 295– 299.
18. Brad Spellberg, M.D., John G. Bartlett, M.D., and David N. Gilbert, M.D. The Future of Antibiotics and Resistance. *The New England Journal of Medicine*. 2013. 368, 299-302.
19. Michael A. Lawson. The Antibiotic Resistance Problem Revisited. *The American Biology Teacher*. 2008, 70, 7, 405-410.
20. Donald T Moir, Timothy J Opperman, Michelle M Butler and Terry L Bowlin. New classes of antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology* 2012, 12, 535–544.
21. Alhariri M, Azghani A, Omri A. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opinion Drug Delivery*. 2013, 10, 11, 1515-1532.
22. Benjamin D. Brooks, Amanda E. Brooks. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 78, 14–27.
23. Tarun Garg, Amit K. Goyal. Liposomes: Targeted and Controlled Delivery System. *Drug delivery Letter*. 2014, 4, 1, 62-71.
24. L. Zhang, D. Pornpattananankul, C.M.J. Hu, C.M. Huang. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*. 2010, 17, 585-594.
25. Zuzanna Drulis-Kawa, Agata Dorotkiewicz-Jach. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 387, 187–198.
26. A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends in Analytical Chemistry*. 2006, 25, 2, 167-178.
27. Immordino ML, Dosio F, Cattell L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal Nanomedicine*. 2006, 1, 3, 297-315.
28. Amarnath Sharma, Uma S. Sharma. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 154, 123-140.
29. Delgado, Jorge Miguel Ferreira. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. Bragança: Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

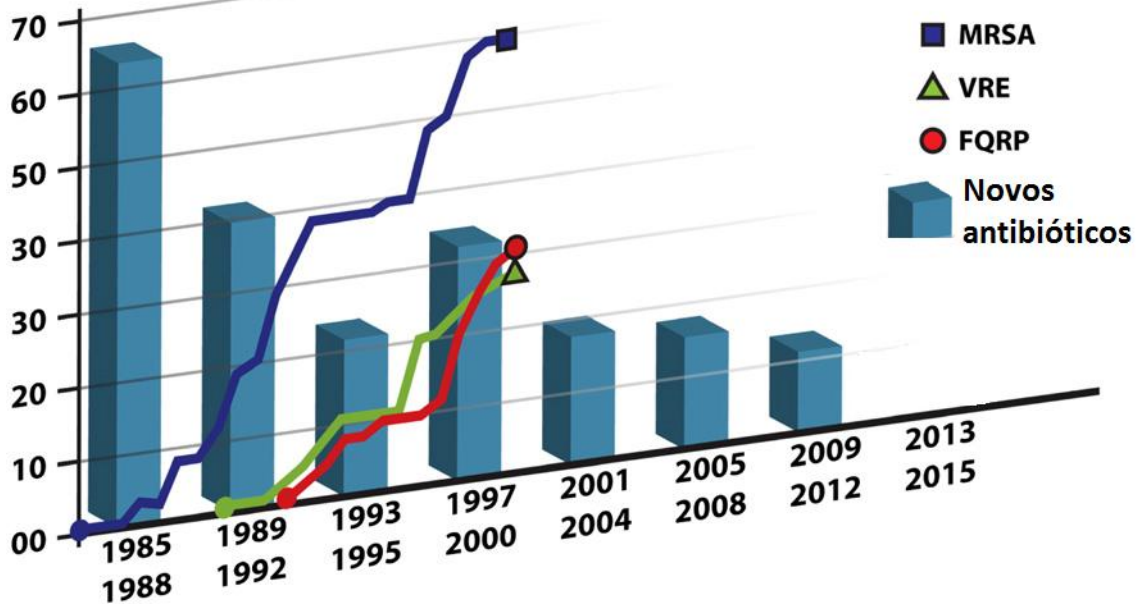
30. Cinthia Meireles Batista, Cícero Moraes Barros de Carvalho, Nereide Stela Santos Magalhães. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007, 43, 2, 167-179.
31. Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais. *Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais*. Campinas: Universidade de Campinas, 2006.
32. Misagh Alipour, Abdelwahab Omri, and Zacharias E. Suntres. Liposome-Entrapped Antibiotics: Recent Progress and Clinical Application. *Nanomedical Device and Systems Design*. 2013, 255-490.
33. Lidija Honzak, Marjeta Sentjurc. Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. *European Journal of Physiology*. 2000, 440, R44-R45.
34. Andrea L. Armstead, Bingyun Li. Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 3281–3293.
35. Huguette Pinto-Alphandary, Antoine Andremont, Patrick Couvreur. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 13, 155–168.
36. Patrick Couvreur, Elias Fattal, Antoine Andremont. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharmaceutical Research*. 1991, vol. 8, 9.
37. Briones E1, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *Journal Control Release*. 2008, 125, 3, 210-227.
38. Majed Halwani, Clement Mugabe¹, Ali O. Azghani, Robert M. Lafrenie, Aseem Kumar¹, Abdelwahab Omri. Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, 60, 760–769.
39. Zuidam NJ, Lee SS, Crommelin DJ. Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharmaceutical Research*. 1993, 10, 11, 1591-1596.
40. Fakhrol Ahsana, Isabel P. Rivas, Mansoor A. Khan, Ana I. Torres Suárez. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release*. 2002, 79, 29–40.
41. Dan D. Lasic. Novel applications of liposomes. *Trends in Technology*. 1998, 16, 307-321.
42. Pio M. Furneri, Massimo Fresta, Giovanni Puglisi, Gianna Tempera. Ofloxacin-Loaded Liposomes: In Vitro Activity and Drug Accumulation in Bacteria. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2000, 44, 9, 2458-2464.
43. Yufan Ma, Zhao Wang, Wen Zhao, Tingli Lu, Rutao Wang, Qibing Mei, Tao Chen. Enhanced bactericidal potency of nanoliposomes by modification of the fusion activity between liposomes and bacterium. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8, 2351–2360.

44. Clement Mugabe, Majed Halwani, Ali O. Azghani, Robert M. Lafrenie, Abdelwahab Omri. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50, 2016–2022.
45. Majed Halwani, Shanna Blomme, Zacharias E. Suntres, Misagh Alipour, Ali O. Azghani, Aseem Kumar, Abdelwahab Omri. Liposomal bismuth-ethanedithiol formulation enhances antimicrobial activity of tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, 358, 278–284.
46. Misagh Alipour, Majed Halwani, Abdelwahab Omri, Zacharias E. Suntres. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, 355, 293–298.
47. Andrew Pumerantza, Krishna Muppidi, Sunil Agnihotri, Carlos Guerra, Vishwanath Venketaraman, Jeffrey Wang, Guru Betageri. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011, 37, 140–144.
48. C. O. Onyeji, C. H. Nightingale, M. N. Marangos. Enhanced Killing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Human Macrophages by Liposome-Entrapped Vancomycin and Teicoplanin. *Infection*. 1994, 22, 5, 34-38.
49. Chun-Ming Huang, Chao-Hsuan Chen, Dissaya Pornpattananangkul, Li Zhang, Michael Chan, Ming-Fa Hsieh, Liangfang Zhang. Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. *Biomaterials*. 2011, 32, 214-221.
50. Marygorret Obonyo, Li Zhang, Soracha Thamphiwatana, Dissaya Pornpattananangkul, Victoria Fu, Liangfang Zhang. Antibacterial Activities of Liposomal Linolenic Acids against Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Molecular Pharmaceutics*. 2012, 9, 2677–2685.
51. Jung SW, Thamphiwatana S, Zhang L, Obonyo M. Mechanism of antibacterial activity of liposomal linolenic acid against *Helicobacter pylori*. *PLOS ONE*. 2015, 10, 3, 1-13.
52. P. Meers, M. Neville, V. Malinin, A. W. Scotto, G. Sardaryan, R. Kurumunda, C. Mackinson, G. James, S. Fisher, W. R. Perkins. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, 61, 859–868.
53. I. A. J. M. Bakker-Woudenberg, A. F. Lokerse, J. C. Vink-van den Berg, F. H. Roerdink. Liposome-encapsulated ampicillin against *Listeria monocytogenes* in vivo and in vitro. *Infection*. 1988, 16, 165-170.
54. Ieda Maria Sapateiro Torres, Etiene Barbosa Bento, Larissa da Cunha Almeida, Luisa Zaiden Carvalho Martins de Sá, Eliana Martins Lima. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *pseudomonas aeruginosa* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, 984-992.

55. Jonathan P. Wong, Huiming Yang, Karen L. Blasetti, Glen Schnell, John Conley, Lawrence N. Schofield. Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection. *Journal of Controlled Release*. 2003, 92, 265– 273.
56. Zuzanna Drulis-Kawa, Jerzy Gubernator, Agata Dorotkiewicz-Jach, Włodzimierz Doroszkiewicz, Arkadiusz Kozubek. In vitro antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, 315, 59–66.
57. Nejat Duzgunes, Diana Flasher, M. Venkata Reddy, Julieta Luna-Herrera, Pattisapu R. J. Gangadharam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, 40, 11, 2618–2621.
58. Raymond Schiffelers, Gert Storm, Irma Bakker-Woudenberg. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, 48, 333-344.
59. J. F. Marier, J. L. Brazier, J. Lavigne, M. P. Ducharme. Liposomal tobramycin against pulmonary infections of *Pseudomonas aeruginosa*: a pharmacokinetic and efficacy study following single and multiple intratracheal administrations in rats. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, 52, 247–252.
60. Isabel M. Mimoso, Ana Paula G. Francisco, M. Eugénia M. Cruz. Liposomal formulation of netilmicin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 147, 1, 109–117.
61. Pio M. Furneri, Massimo Fresta, Giovanni Puglisi, Gianna Tempera. Ofloxacin-Loaded Liposomes: In Vitro Activity and Drug Accumulation in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44, 9, 2458–2464.
62. Jie He, Kamilia Abdelraouf, Kimberly R. Ledesma, Diana S. L. Chow, Vincent H. Tam. Pharmacokinetics and efficacy of liposomal polymyxin B in a murine pneumonia model. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013, 42, 6, 559–564.
63. M.M. Gaspar, A. Cruz, A.F. Penha, J. Reymão, A.C. Sousa, C.V. Eleutério, S.A. Domingues, A.G. Fraga, A. Longatto Filho, M.E.M. Cruz, J. Pedrosa. Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial*. 2008, 31, 37–45.
64. Hsin-I Chang, Ming-Kung Yeh. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal Nanomedicine*. 2012, 7, 49–60.
65. Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *Journal Antimicrob Chemotherapy*. 2001, 48, 3, 333-344.
66. Bionity, disponível em: <http://www.bionity.com/en/news/76032/cystic-fibrosis-license-agreement-boosts-development-of-therapy-against-lung-infections.html> acesso em 26/03/2015, (12:15H).

Anexos

Anexo 1 – Descobertas e desenvolvimento de novos antibióticos versus resistências [adaptado de (1)]



Datas de descoberta e de resistência

