

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

“Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa”

Leonardo Santos Ribeiro Pinto

ORIENTADOR: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Márcia da Silva

ARARAQUARA - SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa”

Leonardo Santos Ribeiro Pinto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Márcia da Silva

ARARAQUARA - SP

2010

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Pinto, Leonardo Santos Ribeiro

P659s      Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa.  
/ Leonardo Santos Ribeiro Pinto. – Araraquara, 2010.  
120 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Márcia da Silva

1. Meningite tuberculosa. 2. Pró-fármaco. 3. Farmacocinética. 4. Micobacterium tuberculosis. 5. Etambutol. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Silva, Márcia da, co-orient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Gonçalves Peccinini  
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos  
(Membro titular)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Lanchote  
(Membro titular)

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.” (Augusto Cury)

## **Agradecimentos**

- A Profa. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini, pela orientação deste trabalho; agradeço do fundo do meu coração a credibilidade depositada em mim, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico. Obrigado pelos puxões de orelha, pelos conselhos intra e extra-laboratório, pelas madrugadas quando deixava sua família pra nos acompanhar; além do aprendizado que me deste. Isso jamais alguém poderá retirar de mim;
- A minha co-orientadora Profa. Dra. Márcia da Silva, pela orientação de todo o trabalho de síntese e caracterização do produto, pelos puxões de orelha e compreensão das minhas dificuldades em todo o período de trabalho;
- A toda equipe de pesquisa em farmacocinética orientada pela Profa. Rosangela: Michel (Leandro), Berê, Terezo, Marquinho, Rodrigo, Elias, Juliana e Ana Paula; que realmente colocaram a “mão na massa” para a execução deste imenso trabalho;
- As Profas. Thais Bauab e Clarice Queico e seus orientados, pela disponibilidade no auxílio da realização dos ensaios biológicos e discussão dos resultados;
- Ao Prof. Jean Leandro dos Santos pela colaboração na discussão deste trabalho no exame de qualificação, que muito contribuiu para a resolução dos problemas e dificuldades encontradas;
- Ao Prof. Luis Otávio Regasine pelo auxílio na interpretação dos espectros para a caracterização do produto sintetizado;
- Aos Profs. da disciplina de Farmacologia pela concessão do equipamento de HPLC/eletroquímico utilizado na determinação do etambutol;

- Às funcionárias da farmacologia, em especial Elizabeth Zocal Lepera, pelo auxílio e tempo despendido no desenvolvimento e validação do método analítico para a determinação do etambutol;
- Aos meus pais e irmão pela compreensão às minhas ausências no seio familiar e pelo consolo nos momentos de desespero;
- Aos animais utilizados neste experimento, que no seu silêncio contribuíram de maneira fundamental para a obtenção de todos estes resultados;
- Aos meus amigos queridos, em especial, Robson, Bruna e Matheus, que tanto me ouviram neste período;
- A CAPES pela concessão de bolsa nos seis meses iniciais deste trabalho;
- A FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio que tem dado ao grupo de pesquisa em farmacocinética da FCF/UNESP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema CDS-SNC.....	<b>40</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema da reação de obtenção do <i>N</i> -nicotinoiletambutol.....	<b>44</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema da reação de obtenção do iodeto piridínico de 1-metil-3-carbamoil-etambutol.....	<b>45</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema da reação de obtenção do 1-metil-diidropiridina-3-etambutol.....	<b>46</b>
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de CIM através da técnica do <i>Rezasurin Microtiter Assay</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas branco e, amostra adicionada de 8 ug/mL etambutol .....	<b>86</b>
<b>Figura 7.</b> Curva de calibração de etambutol em plasma.....	<b>87</b>
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas branco, amostra.....	<b>89</b>
<b>Figura 9.</b> Curva de calibração do DEREMB em solução.....	<b>89</b>
<b>Figura 10.</b> Curva de calibração do DEREMB em plasma.....	<b>90</b>
<b>Figura 11.</b> Hidrólise do pró-fármaco de etambutol (6ug/mL) em solução tampão pH 1.2 and 7.4 .....	<b>93</b>
<b>Figura 12.</b> Hidrólise do pró-fármaco de etambutol (10ug/mL) em plasma humano.....	<b>93</b>
<b>Figura 13.</b> Perfil farmacocinético do pró-fármaco de etambutol e do etambutol administrados por via endovenosa (25mg/Kg; n=20).....	<b>94</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Faixas de fusão.....	<b>66</b>
<b>Tabela 2.</b> Atribuições da espectrofotometria de infravermelho do AN, do DEB, do NEB.....	<b>68</b>
<b>Tabela 3.</b> Atribuições dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do DEB e do NEB.....	<b>70</b>
<b>Tabela 4.</b> Atribuições da espectrofotometria no infravermelho do IMEB.....	<b>72</b>
<b>Tabela 5 -</b> Atribuições dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do IMEB.....	<b>73</b>
<b>Tabela 6.</b> Atribuições da espectrofotometria no infravermelho do DEREMB...	<b>75</b>
<b>Tabela 7.</b> Atribuições dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do DEREMB.....	<b>76</b>
<b>Tabela 8.</b> Estrutura e valores de log P calculado pelo programa ChemDraw Ultra 8.0.....	<b>79</b>
<b>Tabela 9.</b> Estruturas e valores de MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ e $\mu\text{M}$ ) da atividade anti-M. tuberculosis do etambutol e seu derivado.....	<b>83</b>
<b>Tabela 10.</b> Precisão e exatidão do método bioanalítico para etambutol em plasma.....	<b>88</b>
<b>Tabela 11.</b> Precisão e exatidão do método bioanalítico para DEREMB em plasma.....	<b>91</b>
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros farmacocinéticos do DEREMB e do etambutol administrados por via endovenosa na dose de 25mg/kg (n=20).....	<b>95</b>

## LISTA DE ESPECTROS

**Espectro 1.** Espectro de Infravermelho do ácido nicotínico

**Espectro 2:** Espectro de Infravermelho do dicloridrato de etambutol

**Espectro 3.** Espectro de Infravermelho do *N*-nicotinoiletambutol

**Espectro 4.** Espectro de Ressonância Magnética de Hidrogênio do dicloridrato de etambutol

**Espectro 5.** Espectro de Ressonância Magnética de Carbono do dicloridrato de etambutol

**Espectro 6.** Espectro de Ressonância Magnética de Hidrogênio do *N*-nicotinoiletambutol

**Espectro 7.** Espectro de Ressonância Magnética de Carbono do *N*-nicotinoiletambutol

**Espectro 8.** Espectro de Infravermelho do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol

**Espectro 9.** Espectro de Ressonância Magnética de Hidrogênio do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol

**Espectro 10.** Espectro de Ressonância Magnética de Carbono do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol

**Espectro 11.** Espectro de Infravermelho do 1-metil-4-carbamoil-etambutol

**Espectro 12.** Espectro de Ressonância Magnética de Hidrogênio do 1-metil-4-carbamoil-etambutol

**Espectro 13.** Espectro de Ressonância Magnética de Carbono do 1-metil-4-carbamoil-etambutol

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  ou  $K\alpha$ : constante de velocidade de distribuição

AN: ácido nicotínico

AUC: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

$AUC^{0-24}_{ss}$ : área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo no intervalo de dose de 24h

$\beta$  ou  $Kel$ : constante de velocidade de eliminação

BHE: barreira hematoencefálica

$C_{max}$ : concentração plasmática máxima

CDS: Chemical Delivery System

CIM: concentração inibitória mínima

$Cl_T/F$ : *clearance* total aparente

$Cp_{ss}$ : concentração média no estado de equilíbrio

CV: coeficiente de variação

CYP450: citocromo P450

DCC: dicitclohexilcarbodiimida

DCU: dicitclohexiluréia

DEB: dicloridrato de etambutol

DEREMB: 1-metil-diidropiridina-4-etambutol

EMB: etambutol

EPM: erro padrão da média

ES: erro sistemático

Ep-TB: tuberculose extra-pulmonar

H: isoniazida

IMEB: iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol

IV: Infravermelho

$K_a$ : constante de velocidade de absorção

$K_{o/w}$ : coeficiente de partição

Log P: coeficiente de partição

M: etambutol

MABA: Microtiter Assay Blue Alamar

MDR: tuberculose multiresistente  
MT: meningite tuberculosa  
NEB: N-nicotinoiletambutol  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PBS: tampão fosfato-salino  
PAS: ácido p-aminosalicílico  
R: coeficiente de correlação  
R: rifampicina  
REMA: Rezasurin Microtiter Assay  
RMN <sup>1</sup>H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
S: estreptomicina  
SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica  
SNC: sistema nervoso central  
TB: tuberculose  
t  $\frac{1}{2}$  a: meia vida de absorção  
t  $\frac{1}{2}$   $\alpha$ : meia vida de distribuição  
t  $\frac{1}{2}$   $\beta$ : meia vida de eliminação  
tmax: tempo necessário para atingir a Cmax  
UV-VS: ultra-violeta – visível  
Vd/F: volume de distribuição aparente  
XDR: tuberculose extensivamente resistente  
Z: pirazinamida

## RESUMO

O etambutol é preconizado no tratamento da meningite tuberculosa sempre associado a outro fármaco tuberculostático. Mas, embora útil quanto à sua ação, o fármaco não atravessa satisfatoriamente a barreira hematoencefálica. Desta forma, este trabalho propôs a síntese e caracterização estrutural de um pró-fármaco de etambutol (DEREMB) para melhorar a sua penetração no SNC; assim como a realização de estudos de atividade antibacteriana, estabilidade *in vitro* e *ex vivo* e, ainda, investigação da disposição cinética do composto; comparando-a com a do etambutol, em ratos wistar (machos, n=20, peso~200g) tratados com dose única via endovenosa (25 mg/kg) e via gavagem (100 mg/kg). A modificação molecular do etambutol alterou a lipossolubilidade do composto, expressa pelo log *P*, aumentando a possibilidade de penetração no sistema nervoso central, e o aumento da permeabilidade celular, haja vista que o DEREMB apresentou atividade, ainda que menor contra o *M. tuberculosis* quando comparada ao fármaco matriz. Os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise em diferentes pHs (1,2 e 7,4) e na submissão à ação de enzimas plasmáticas permitem observar estabilidade do produto no período de 24 horas. Os parâmetros farmacocinéticos expressos através das médias (IC95%) foram: DEREMB (endovenoso):  $C_{max}$  (ug/mL)= 10,4;  $AUC^{0-1}$ (ug/mL.min)=252,7;  $AUC^{0-\infty}$ (ug/mL.min)= 294,3;  $V_d$  (L/kg)=4,3 ;  $Cl_T$  (mL/min/kg)=86,4 ;  $t_{1/2}$  (min) =43,1;  $\beta$  ( $min^{-1}$ )= 0,021. As baixas concentrações plasmáticas obtidas na administração oral do DEREMB não permitiram o cálculo do parâmetros farmacocinéticos por esta via. Apenas os parâmetros  $C_{max}$  e  $V_d$  do DEREMB não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao etambutol.

## ABSTRACT

Ethambutol is a tuberculostatic drug indicated for tuberculous meningitis treatment. But, although useful as for its action, the drug does not cross the blood-brain barrier satisfactorily; certainly reducing its effectiveness in the treatment of the tuberculous meningitis. In this way, this work proposed the synthesis and structural characterization of a prodrug of ethambutol (DEREMB) to improve its penetration in SNC; as well as the accomplishment of studies of antibacterial activity, *in vitro* and *ex vivo* stability studies and, still, the investigation of the kinetic disposition of the compound comparing it with the pharmacokinetic profile of ethambutol, in rats wistar (males, n=20, weight~200g) treated with single iv dose(25 mg/kg) and by gavage (100 mg/kg). The produced prodrug presents a greater lipophilicity – expressed by  $\log p$  - what could increase its permeation through the blood-brain barrier and its cellular permeability, once the DEREMB presented antimycobacterial activity, although smaller when compared to ethambutol. The *in vitro* and *ex vivo* (plasma) hydrolysis studies demonstrates that ethambutol derivative is stable and is not converted to ethambutol in the different pHs which occur in digestory tract or by plasmatic enzymes.. The pharmacokinetic parameters of DEREMB (iv) were:  $C_{max}$  (ug/mL) = 10,4;  $AUC_{0-t}$ (ug/mL.min)=252,7;  $AUC_{0-\infty}$  (ug/mL.min) = 294,3;  $V_d$  (L/kg)=4,3;  $CIT$  (mL/min/kg)=86,4;  $t_{1/2}$  (min) =43,1;  $(\text{min}^{-1}) = 0,021$ . The low plasmatic concentrations obtained in the oral administration of DEREMB did not allow to calculate its pharmacokinetic parameters. Only  $C_{max}$  and  $V_d$  parameters of DEREMB did not present significant statistical differences when compared to ethambutol.

## SUMÁRIO

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de espectros**

**Lista de abreviaturas**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Farmacologia Clínica do etambutol .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Inovações na terapêutica da tuberculose .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3. A Latenciação e o Sistema de Liberação Central .....</b>	<b>36</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Síntese .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.1. Reagentes e solventes .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2. Métodos sintéticos .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2.1. Síntese do N-nicotinoiletambutol (NEB).....</b>	<b>44</b>

<b>5.1.2.2. Síntese do iodeto piridínico de 1-metil-3-carbamoil-etambutol (IMEB).....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2.3. Síntese do 1-metil-diidropiridina-3-etambutol (DEREMB).....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. Caracterização.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1. Determinação das faixas de fusão.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.2. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV).....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C).....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.4. Cromatografia em camada delgada.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.5. Coeficiente de partição.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3. Ensaio biológico.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3.1. Fármacos de referência e testes .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.2. Cepas bacterianas.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.3. Preparação das suspensões bacilares.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3.4. Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas.....</b>	<b>49</b>
<b>5.4. Determinação do etambutol em plasma por HPLC.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4.1. Soluções- Padrão e Reagentes.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4.2. Sistema cromatográfico.....</b>	<b>54</b>



5.4.3. Preparação das amostras.....	54
5.4.4. Validação do método.....	55
5.5. Determinação de DEREMB em plasma por HPLC.....	56
5.5.1. Soluções- Padrão e Reagentes.....	56
5.5.2. Análise cromatográfica.....	57
5.5.3. Preparação das amostras.....	57
5.5.4. Validação do método.....	58
5.6. Estudo de estabilidade <i>in vitro</i> – Hidrólise em pH 1,2 e 7,4.....	60
5.7. Estudo de estabilidade <i>ex vivo</i> – Hidrólise em plasma.....	60
5.8. Farmacocinética pré-clínica do pró-fármaco de etambutol.....	60
5.8.1. Animais.....	60
5.8.2. Protocolo Experimental.....	61
5.8.3. Análise Farmacocinética.....	62
5.9. Análise Estatística.....	63
<b>6. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
6.1. Síntese e caracterização.....	64
6.1.1. <i>N</i> -nicotinoiletambutol.....	64
6.1.2. Iodeto piridínico de 1-metil-3-carbamoil-etambutol.....	71
6.1.3. 1-metil-3-carbamoil-etambutol.....	74
6.2. Atividade Antibacteriana.....	79
6.3. Determinação de etambutol e plasma por HPLC.....	84
6.4. Determinação do pró-fármaco de etambutol em plasma por HPLC.....	88
6.5. Estabilidade <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> do pró-fármaco de etambutol.....	91
6.6. Farmacocinética pré-clínica do pró-fármaco de etambutol.....	94

**7. CONCLUSÕES..... 106**

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 107**

**ANEXOS**

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade em muitos países e têm sido alvo de inúmeras pesquisas por atingirem grandes contingentes populacionais.

A tuberculose (TB) é uma doença globalmente distribuída no mundo, que atinge cerca de 9 milhões de pessoas anualmente, das quais cerca de 70 mil tornam-se multirresistentes. A cada ano ocorrem aproximadamente 1,5 milhões de mortes por esta doença - apesar da existência de recursos terapêuticos – sendo que cerca de 98% destes óbitos ocorrem em países em desenvolvimento (JONES & VARNAM, 2002) .

Entre os novos casos registrados mundialmente, cerca de 80% concentram-se em 22 países, cujas regiões mais afetadas são o sudeste asiático e a África subsaariana. A Europa apresenta 50 novos casos e 7 óbitos por hora devido a esta doença (<http://www.medicosdomundo.pt/content/news/tuberculose%20pdf.pdf>).

Neste contexto, o Brasil ocupa o 13º lugar no ranking destes 22 países, ocorrendo cerca de 115 mil novos casos com 6 mil mortes ao ano, sendo o Rio de Janeiro o estado com o maior número de casos ([http://www.lncx.com.br/lncx/orientacao/doencas/aspectos\\_tuberculose.html](http://www.lncx.com.br/lncx/orientacao/doencas/aspectos_tuberculose.html)).

Caso a gravidade deste quadro não se reverta, estima-se que até 2020 um bilhão de pessoas sejam infectadas, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam morrer vítimas dessa doença (HIJJAR *et al.*, 2001). Esta emergência é decorrente, em parte, da co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

(BHIGJEE, 2007; KATTI, 2004). Segundo a OMS, a tuberculose e a AIDS juntas constituem, hoje, uma calamidade sem precedentes na história. Em 1999, cerca de 1/3 dos infectados pelo HIV o eram também pelo bacilo de Koch (HIJJAR *et al.*, 2001).

Em 2007 o número de casos mundial foi de 9,27 milhões, sendo que 15% destes estavam relacionados a pacientes HIV positivos. Os países que apresentaram maior número de casos foram Índia (2 milhões), China (1,3 milhões), Indonésia (0,53 milhão), Nigéria (0,46 milhão) e África do Sul (0,46 milhão) (WHO, 2007).

No ano de 2008, a tuberculose causou 1,8 milhões de mortes e entre estes casos 500 mil estavam associados com o vírus HIV. Em média 4.500 pessoas morrem por causa da doença a cada dia (FIORAVANTI & HOCKSTEIN, 2010).

Em 2009 a estimativa mundial foi de mais de 8 milhões de novos casos registrados, com 500 mil referentes a TB multirresistente e 40 mil de TB extensivamente resistente (GOLDMAN & LAUGHON, 2009).

A tuberculose, infecção contagiosa crônica, resulta, comumente, da invasão do organismo pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Sua transmissão é fenômeno que se concretiza no momento em que os bacilos penetram pelas vias aéreas superiores, implantam-se em novo hospedeiro e nele começam a se multiplicar (BOUTOTTE, 1993).

A multiplicação dos bacilos pode-se limitar ao sítio original de infecção, os pulmões, ou disseminar-se a outras localizações através dos canais linfáticos, que os transportam para linfonodos regionais. Pode, também, ser disseminada através do sistema circulatório que os leva a tecidos e órgãos

distantes, resultando no caráter diverso das manifestações clínicas. Surgem daí os termos tuberculose pulmonar, extra pulmonar e meningítica (BLOOM & MURRAY, 1992).

A ocorrência da tuberculose extra pulmonar (Ep-TB) é diretamente proporcional a prevalência da infecção TB, e o comprometimento neurológico da infecção TB constitui aproximadamente 5-10% dos casos de Ep-TB, com alta predominância em crianças (HOPEWELL, 1994). No Brasil, a distribuição das formas clínicas configura-se por 60,7% de pulmonares com baciloscopia positiva, 24,9% de pulmonares sem confirmação bacteriológica e 14,4% de extra pulmonares, sendo a meningite tuberculosa (MT) a mais séria complicação (KATTI, 2004). As taxas de mortalidade por esta forma de tuberculose variam entre 7% a 45% (GARCIA-MONCO, 1999).

A MT, decorrente da disseminação hematogênica do bacilo, é geralmente de início insidioso - embora alguns casos possam ter um começo abrupto marcado pelo surgimento de convulsões – e consiste em uma complicação precoce da tuberculose primária, que ocorre mais frequentemente nos primeiros seis meses de infecção, embora possa manifestar-se após alguns anos. A doença guarda íntima relação com os índices sócio-econômicos, principalmente em países onde a população está sujeita à desnutrição e a condições precárias de habitação (KATTI, 2004).

O quadro clínico é caracterizado por alterações do humor e comportamento, sinais meníngeos, paralisia de nervos cranianos (principalmente do oculomotor), hemiparesias, convulsões, alterações de consciência e coma (WHO, 2004).

Rich & McCordock (1993) reportaram que a MT desenvolve-se após a liberação dos bacilos de antigas lesões focais que se comunicam com as meninges, chamadas focos de Rich, que são tipicamente subpiais e subependimais, porém o mecanismo envolvido no desenvolvimento da MT e liberação desses bacilos permanece desconhecido (THWAITES & HIEN, 2005). A MT é caracterizada tanto como uma meningoencefalite, quanto como uma afecção não só da meninge como também do parênquima cerebral e sua vascularização (KATTI, 2004).

O tratamento da tuberculose ativa envolve a quimioterapia com associação de fármacos como: etambutol (M), isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) e estreptomicina (S). Esses fármacos são associados entre si com vistas ao sinergismo de ação e prevenção do surgimento de resistência (SILVA, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001).

A estreptomicina foi introduzida no mercado em 1943, porém em curto período de tempo surgiram as cepas de micobactérias resistentes a esta monoterapia. Em 1952 propôs-se a associação do ácido *p*-aminosalicílico (PAS) e isoniazida, por um período de 24 meses. Em 1960, o PAS foi substituído pelo etambutol, e o período de tratamento para 18 meses. No final desta década, o maior avanço no tratamento da tuberculose foi alcançado associando-se a rifampicina; que proporcionou estimativa de cura da doença em 95%, num período de 9 a 12 meses de tratamento (MA & LIENHARDT, 2009).

Somente na década de 80 foi realizada nova alteração da terapêutica compreendida por um período de 6 a 8 meses de tratamento, associando-se o

fármaco pirazinamida nos meses iniciais seguidos pela combinação de isoniazida/rifampicina ou isoniazida/etambutol.

Nos casos de tuberculose multirresistente, fármacos de segunda linha, como os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, etionamida, ciclosserina, entre outros, são utilizados. Porém apresentam o inconveniente do alto custo e maior incidência e gravidade de efeitos adversos (MA & LINHARDT, 2009).

No Brasil, quatro esquemas terapêuticos são preconizados, sendo indicado esquema I para tratamento de TB pulmonar e extrapulmonar exceto meningite; esquema I reforçado para recidiva da doença, reinício de tratamento e/ou abandono do esquema I; esquema II para meningite tuberculosa e esquema III no caso de falência dos esquemas anteriores (BARRY, 1997; BRASIL, 1995; KOROKOLVAS, 2001). Estes esquemas terapêuticos estão descritos no II Consenso Brasileiro de Tuberculose – Diretrizes Brasileiras para Tuberculose (2004).

O longo período de tratamento, a ocorrência de efeitos adversos e o alto custo dos medicamentos têm levado a grande incidência de abandono à terapêutica e contribuído significativamente para o aparecimento da tuberculose multirresistente (MDR) – tuberculose causada por cepas que apresentam resistência a isoniazida e rifampicina - e da tuberculose extensivamente resistente (XDR) - que não responde a nenhuma fluoroquinolona e a pelo menos um dos três injetáveis de segunda linha (amicacina, capreomicina ou canamicina). Assim, o tratamento de cepas resistentes requer, ainda, maior prolongamento do tempo de tratamento e o emprego de fármacos de maior toxicidade, acentuando a incidência de abandono da terapêutica por parte dos pacientes (PIERONI *et. al*, 2009) e

impulsionando a busca de novos fármacos com maior efetividade no tratamento desta doença.

Atualmente 20 novas moléculas aparentemente capazes de ter ação em colônias de *Mycobacterium tuberculosis* encontram-se em desenvolvimento. A maioria destas substâncias está em estudos de fase pré-clínica, apenas três moléculas estão em fase inicial de testes de segurança em humanos e outras duas em fase final (FIORAVANTI & HOCKSTEIN, 2010).

O esquema terapêutico preconizado para MT envolve o uso de etambutol, rifampicina e isoniazida, em combinações segundo a fase do tratamento ( KOROLKOVAS, 2001; BRASIL, 1995).

O etambutol, etileno-diamino-dibutanol, é um produto isômero dextrógeno derivado da etilenodiamina, sendo usado na terapêutica na forma de cloridrato em doses diárias de 15 a 25 mg/kg e sempre associado a outro fármaco tuberculostático. Mas, embora útil quanto à sua ação, o fármaco não atravessa satisfatoriamente a barreira hematoencefálica (BHE) (BOBROWITZ, 1972), cabendo novas estratégias para obtenção de alternativas para maior efetividade no tratamento da MT.

Uma estratégia útil para o desenvolvimento de fármacos é a latenciação, com o desenvolvimento de pró-fármacos, que permite, sobretudo, a otimização da liberação do fármaco, com conseqüente melhoria da eficácia e redução da toxicidade, envolvendo o controle da absorção, dos níveis sanguíneos, do metabolismo, da distribuição e da captura celular (CHUNG & FERREIRA, 1999; BUNGAARD, 1985). Um pró-fármaco é derivado inativo farmacologicamente do fármaco matriz, que requer transformação química e/ou enzimática dentro do organismo, a fim de liberar a subunidade ativa. Tais derivados podem ser



obtidos através de ligação lábil entre o fármaco e um transportador, que poderá conferir ao novo composto diferentes propriedades físico-químicas que incrementem sua biodisponibilidade, seletividade, tempo de ação, além da possibilidade de diminuição da toxicidade e resolução de problemas de formulação (CHUNG *et. al*, 2005; SILVA, 2001; CHUNG & FERREIRA, 1999; BUNGAARD, 1992).

Diante do exposto, pode-se afirmar que a terapêutica atual é composta por fármacos introduzidos a tempo considerável no mercado, apresentando poucas inovações. Sua eficácia tem sido progressivamente afetada em face do aparecimento da tuberculose multirresistente e da tuberculose extensivamente resistente. Existem poucos fármacos seguros e efetivos para o tratamento e, ainda, com a co-infecção por HIV, o problema torna-se maior, considerando-se a necessidade de associação de outros fármacos. Desta forma, o desenvolvimento de novas entidades químicas e novas estratégias de tratamento é imperativo, acompanhados de seus estudos de estabilidade, atividade farmacológica, toxicidade e perfil farmacocinético, que produzem as informações fundamentais e necessárias aos estudos de fase clínica e então o surgimento de alternativas terapêuticas (MA & LINHARDT, 2009).

Com base nessas considerações, na expectativa de contribuir, em especial, na terapêutica da meningite tuberculosa, este trabalho propõe a obtenção de um pró-fármaco que atue por meio do sistema de liberação química (CDS) para liberar de maneira mais eficiente o etambutol no SNC.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Farmacologia Clínica do etambutol

O etambutol é encontrado na forma farmacêutica comprimido, nas doses de 100 e 400 mg e também em solução de 25 mg/mL, para administração por via oral, em dose diárias de 15 mg/kg a 25 mg/kg, ou 30 mg/kg fracionadas em 3 dias por semana.

O etambutol é ativo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 1 a 5 µg/mL, porém, esta atividade requer o crescimento das células suscetíveis para inibir de forma específica a biossíntese da parede micobacteriana (COLL, 2003; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

No final da década de 90 alguns pesquisadores sugeriram que o principal alvo do fármaco fosse a enzima arabinosil transferase, cuja função está relacionada à incorporação de ácidos micólicos na parede bacteriana (RAMASWAMY *et. al*, 2000; TELENTI *et. al*, 1997).

Ainda que não completamente elucidado, o mecanismo de ação do etambutol relaciona-se com a inibição da arabinosil transferase envolvida na biossíntese da parede celular da *M. tuberculosis*, com conseqüente inibição da polimerização da arabinose para produzir arabinogalactanos e lipoarabinomanoses (GUILLET *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003; DENG *et al.*, 1995; MIKUSOV *et. al.*, 1995; TAKAYAMA & KILBURN, 1989), os quais servem de ligação para os ácidos micólicos presentes na parede celular de *M. tuberculosis* e de outras micobactérias (KOO *et al.*, 1996).

Ainda, alguns autores apontam que o aparecimento de micobactérias resistentes ocorre pela indução da expressão do gene da arabinosil tranferase (*embCBA*) (RAMASWAMY *et al.*, 2000; BELANGER *et al.*, 1996).

Na década de 60, a partir da introdução do etambutol na terapêutica, tem sido observados efeitos adversos sobre o tecido ocular, descritos como neuropatia óptica. Os sintomas clássicos desta neuropatia são: visão borrada, diminuição da percepção das cores, diminuição da acuidade visual bilateral e escotoma. Outros efeitos mais raros são as reações cutâneas, trombocitopenia e hepatite. Esses efeitos são dose e tempo dependentes, mas sua reversibilidade é controversa. Cerca de 2% dos pacientes tratados com etambutol desenvolvem esta neuropatia (GUILLET *et al.*, 2009; CHAN & KWOK, 2006).

Os efeitos tóxicos sobre as células retiniais ganglionares têm sido confirmados *in vitro* e *in vivo* em roedores sugerindo-se que este efeito pode ser mediado pela indução do glutamato (HENG, 1999).

Yoon *et al.* (2000) demonstraram que o etambutol induz à formação de vacúolos por um processo envolvendo o zinco intracelular e Guillet *et al.* (2009) verificaram que o etambutol reduz a atividade da citocromo C oxidase mitocondrial através da quelação do cobre, essencial para a transferência eletrônica deste complexo enzimático; que induz à formação de vacúolos que aumentam proporcionalmente com a concentração e tempo de exposição ao produto; alterando o potencial de membrana e a estrutura mitocondrial além de provocar a desorganização do retículo endoplasmático.

Assim, os estudos conduzidos por estes autores levam à conclusão de que a toxicidade ocular do etambutol está relacionada às alterações

mitocondriais, sejam aquelas relacionadas ao metabolismo energético ou aquelas relacionadas à desorganização de organelas estruturais da mitocôndria.

A neurite óptica tem sido considerada o principal efeito adverso do etambutol, que acomete cerca de 15% dos pacientes que recebem doses diárias de 50 mg/kg, 5% dos pacientes em doses de 25mg/kg/dia e cerca de 1 % dos pacientes em doses de 15 mg/kg/dia (CHAN & KWOK, 2006).

Outros efeitos adversos tais como cefaléia, hiperuricemia, transtornos gastrintestinais, erupção cutânea e reações de hipersensibilidade (HARDMAN & LIMBIRD, 2003) têm sido atribuídos à administração do etambutol.

A DL50 oral do etambutol em camundongos é de 2,8 g/kg e a DL50 intraperitonal de 2,21 g/kg (ETHAMBUTOL, 2008).

Rapidamente absorvido após administração oral, o etambutol apresenta biodisponibilidade absoluta em humanos de 75 a 80% por essa via. As concentrações plasmáticas consideradas eficazes na terapêutica estão na faixa de 2,5 a 6,5 ug/mL e seus efeitos tóxicos usualmente associados às concentrações superiores à 6 ug/mL. A absorção não é significativamente alterada na presença de alimentos e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas cerca de duas horas após a administração (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

A distribuição sanguínea do etambutol atinge os eritrócitos em concentrações duas vezes superiores àquelas observadas no plasma. A ligação às proteínas plasmáticas é dose dependente – de 10 a 40 % - e sua meia vida de eliminação estimada em cerca de 2 a 4 horas em humanos. A principal via de biotransformação do etambutol parece ser a oxidação, que

origina os derivados aldeídico (intermediário) e ácido carboxílico, porém cerca de 50 a 70% do fármaco é eliminado inalterado na urina em um período de 24 horas e cerca de 20% é eliminado pelas fezes. O *clearance* estimado é de 9 mL/min/Kg em humanos (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

## 2.2. Inovações na terapêutica da tuberculose

A co-infecção com *M. tuberculosis* e HIV e a incidência de cepas de micobactérias multi (MDR) e extensivamente (XDR) resistente a fármacos tem agravado os problemas relacionados à tuberculose no panorama mundial. O tratamento crônico desta doença constitui-se pela associação de fármacos clássicos introduzidos na terapêutica a mais de 50 anos por um período prolongado – mínimo de seis meses – e apresenta obstáculos operacionais como o fornecimento ininterrupto e disponibilidade dos produtos, além da não adesão à terapia. Todos esses aspectos ressaltam a importância e a necessidade imediata da busca de novas alternativas terapêuticas que possuam eficácia nas formas resistentes da micobactéria, assim como para a diminuição do período de tratamento, minimização dos efeitos adversos e associação segura com fármacos antiretrovirais (GUO *et. al.*, 2010).

Apesar dos esforços investidos na investigação de novos fármacos para o tratamento da tuberculose nenhum novo fármaco foi introduzido no mercado há décadas. Na verdade, entre os fármacos antituberculose de primeira linha – isoniazida(H), pirazinamida(Z), etambutol (M) e rifampicina (R) – o mais recente é a rifampicina, introduzida na terapêutica em 1966 (PIERONI *et. al.*, 2009).

A terapia convencional para a tuberculose consiste na administração dos agentes antimicrobianos por via oral ou parenteral. Contudo, a quantidade de

fármaco que atinge o local de infecção pode ser pequena devido à pobre distribuição pulmonar da maior parte do fármaco administrada. Assim, diversos sistemas de liberação têm sido propostos para incorporar os compostos antituberculose como os lipossomais, micropartículas, nanopartículas e nanopartículas sólido-lipídicas; com o objetivo de incrementar as concentrações destes produtos nos órgãos alvo.

Os sistemas lipossomais oferecem algumas vantagens como modular a quantidade de fármaco, controlar as características físico-químicas e outros parâmetros que definem a cinética de liberação. Os lipossomos atuam como reservatórios de liberação lenta e sustentada dos tuberculostáticos para dentro dos macrófagos alveolares (MUTTIL, 2009).

Sistemas de liberação de fármacos por inalação resultam em concentrações do fármaco na região pulmonar extremamente superiores às encontradas na administração parenteral ou oral. Na última década, aproximadamente 75% dos pacientes com fibrose cística tem sido tratado com alguma forma de terapia com aerossóis (MUTTIL, 2009). A liberação dos fármacos para o tratamento da tuberculose diretamente para os pulmões ainda é recente, mas tem sido útil na diminuição do crescimento bacteriano neste tecido quando comparada a terapia convencionais em modelos animais. É provável que a exposição da micobactéria presente nos pulmões a altas concentrações de fármacos pelo aerossol maximize as chances de eliminar a disseminação da infecção para outros órgãos assim como a contaminação para outros indivíduos; com a vantagem da utilização de menores doses e menor período de exposição (MUTTIL, 2009).

Outro aspecto importante é que através da nanonização se pode aumentar a solubilidade de fármacos para que ocorra maior absorção e penetração celular (SOSNIK *et. al.*, 2009). Os tuberculostáticos de primeira linha apresentam limitada solubilidade em água, baixa estabilidade e biodisponibilidade extremamente variável, o que dificulta a sua penetração até o local de ação. A rifampicina é classificada, pelo sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), como classe II – baixa solubilidade e alta permeabilidade, já a isoniazida, a pirazinamida e o etambutol são classificados como III - alta solubilidade e baixa permeabilidade.

Pandey e Khuller (2006) utilizaram nanopartículas carregadas com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por gavagem em camundongos infectados com *M. tuberculosis* e os níveis terapêuticos dos produtos foram mantidos por 5 a 8 dias; após cinco doses houve eliminação completa das micobactérias das meninges dos animais demonstrando a eficiência do sistema para a introdução dos agentes farmacológicos no sistema nervoso central.

A síntese de novas moléculas também tem sido foco do desenvolvimento de produtos para o tratamento da tuberculose.

Lilienkampf *et. al.* (2009) sintetizaram compostos derivados da quinolona com propriedades antimicobacterianas constatadas através do ensaio de microplacas Alamar Blue (MABA). Estes compostos não apresentaram atividade inibitória sobre a isoforma CYP3A4, o que representa grande vantagem para a sua co-administração com medicamentos antiretrovirais, sem o risco de interações farmacocinéticas.

Pieroni *et. al.* (2009) apresentam ésteres derivados do ácido 5-[(E)-2-ariletênil]-3-isoxazolcarboxílico com atividade significativa contra micobactérias replicantes e com baixa toxicidade – características avaliadas por testes *in vitro*. Estes autores afirmam que os grupamentos ésteres conferem maior lipossolubilidade aos compostos com conseqüente aumento na capacidade de penetração celular em decorrência da sua lipofilicidade.

Um derivado do etambutol - SQ109 – sintetizado por Ma & Lienhardt (2009) - encontra-se em estudo clínico de fase 1, como nova alternativa para o tratamento da tuberculose. Presume-se que o mecanismo de ação deste produto seja diferente do seu fármaco matriz e que o mesmo atue sinergicamente na associação com a isoniazida e rifampicina. Sua biodisponibilidade oral, em modelos animais varia de 2,4 a 12% (Ma & Lienhardt, 2009). Ainda, a partir do etambutol, Bogatcheva e colaboradores (2010) sintetizaram etilenodiaminas assimétricas e demonstraram que alterações na ligação etileno, como por exemplo o alongamento da cadeia etilênica ou incorporação de uma variedade de héteroátomos, levam à perda de atividade antimicobacteriana. A estes produtos foram incorporados resinas e aminoalcoóis, e os mais promissores apresentaram CIM semelhante ao do etambutol, porém espera-se que estas novas estruturas não possuam a capacidade quelante do etambutol à qual se atribui sua toxicidade ocular.

Huang e colaboradores (2009) sintetizaram compostos derivados do 2-metilbenzotiazol que apresentaram atividade antimicobacteriana avaliadas por MABA, sendo que para alguns deles encontrou-se CIM de 1.4 a 4.4  $\mu\text{M}$ .

Imramovsky e colaboradores (2009) sintetizaram uma série de ésteres derivados da salicilanilida, que testados contra cepas de micobactérias



atípicas, apresentaram atividade superior à salicilanilida contra o *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*, com CIM de 1-32 uM. As salicilanilidas apresentam ampla atividade biológica, especialmente antimicobacteriana e antifúngica. Estes autores relatam que a esterificação de moléculas ativas é uma das mais freqüentes modificações que aumentam a biodisponibilidade e que o aumento da lipofilicidade proporciona maior permeabilidade através da membrana para atingir os tecidos alvos.

Simões e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antimicobacteriana de derivados ésteres e amidas da pirazinamida em cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e constataram que os derivados amidas, embora possuam maior estabilidade em plasma, apresentam menor atividade antimicobacteriana. Estes autores afirmam que o resultado obtido pode ser explicado pelo fato de que os derivados ésteres são facilmente ativados pelas esterases presentes nas micobactérias e que os derivados amidas são mais resistentes a esta ativação. A pirazinamida é um pró-fármaco que requer a ação da pirazinamidase para formar o ácido pirazinóico (POA), que então possui atividade antimicobacteriana. O ácido pirazinóico não é administrado na forma ativa devido à sua baixa biodisponibilidade oral e baixo volume de distribuição. Os ésteres de ácido pirazinóico apresentam alta atividade antimicobacteriana, no entanto, são extremamente instáveis no plasma, o que determina baixa disponibilidade para ação no sistema biológico.

A estabilidade é uma importante característica de um pró-fármaco para viabilizar o seu transporte ao seu local de ação e um produto promissor deve somente ser ativado na presença das micobactérias. Simões et al (2009) avaliaram a estabilidade dos derivados amidas e ésteres da pirazinamida em

meio aquoso, em plasma humano e homogenato de fígado de ratos e constataram que os derivados amida de cadeia mais longa são mais resistentes em plasma do que os de cadeia curta e que os ésteres mais lipofílicos são ativados mais facilmente do que os derivados amidas. Os valores de CIM (ug/mL) encontrados para o composto ácido pirazinóico (POA), pirazinamida, éster com 12, com 14 e com 16 carbonos, amida com 12, com 14 e com 16 carbonos foram, respectivamente, 200; 200; 20-40, 10-20; 40; >800; >800 e > 800. Pode-se observar que os compostos ésteres são mais efetivos devido às questões supramencionadas e que o aumento da cadeia alifática deve proporcionar o aumento da lipossolubilidade, o que traz vantagens para a penetração do produto pela membrana celular. No entanto é conhecido o fato de que as características estruturais das membranas – camada bilipídica intermediada por estruturas hidrofílicas – determinam absorção mais eficaz para compostos de lipossolubilidade intermediária, o que pode explicar o valor de CIM inferior encontrado para o derivado éster com cadeia alifática composta por 14 carbonos.

Com a finalidade de identificar possíveis candidatos ao tratamento da tuberculose, Zhang e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antimicobacteriana de 30 análogos da etilenodiamina e verificaram que a substituição deste grupamento por um anel piperazínico provocou aumento da atividade tuberculostática do composto, no entanto, quando o anel benzênico foi substituído por um anel heteroaromático os compostos apresentaram menor atividade antimicobacteriana. Os compostos obtidos, em comparação com o etambutol demonstraram maior atividade na eliminação de cepas de *M. tuberculosis*.

Candéa *et. al.* (2009) investigaram uma classe de compostos heterocíclicos – com núcleos quinolônicos – encontrados em muitos produtos sintéticos e naturais com uma ampla variedade de atividades farmacológicas, tais como antiviral, antitumoral, antibacteriana, anti-obesidade e antiinflamatória. Nesta investigação alguns compostos apresentaram menor citotoxicidade do que o etambutol e atividade antimicobacteriana com CIM entre 2,5 e 12,5 ug/mL, comparável ao do etambutol (3,12 ug/mL); assim foram considerados como produtos promissores para futuras investigações.

Guo *et. al.* (2010) identificaram compostos derivados do tetraidroindazol como novas potencialidades terapêuticas em decorrência de sua alta atividade contra micobactérias replicantes – avaliadas por MABA em cepa H37Rv – e baixa citotoxicidade. Na relação de estrutura atividade, estes autores postulam que a presença de um substituinte *para* no grupamento arila leva a um aumento da atividade antimicrobiana quando comparado a substituintes na posição *orto*.

Jaju *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicobacteriana utilizando MABA com cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, de uma nova série de composto derivados da isonicotinoilhidrazida e os resultados obtidos revelaram que a atividade é consideravelmente afetada por vários substituintes introduzidos no núcleo aromático de tal forma que para os compostos em que não houve introdução de substituintes neste sítio de ligação, não ocorreu atividade farmacológica considerável. A introdução de grupamentos hidroxila ou metoxila aumentou significativamente a atividade antimicobacteriana, com valores de CIM na faixa de 0,31 a 5 ug/mL; comparáveis aos fármacos de primeira linha

no tratamento da tuberculose, tais como isoniazida (CIM=0,2 ug/mL) e rifampicina (CIM=1ug/mL).

Uma nova classe de compostos derivados da diarilquinolina foi avaliada por Lounis *et. al.* (2009) e apresentou atividade antimicobacteriana em ratos, *in vitro* e em humanos. *In vitro* um destes compostos apresentou atividade tanto em cepas sensíveis quanto em multiresistentes de *M. tuberculosis*. A associação deste produto com os fármacos clássicos levou ao extermínio da cultura de micobactérias após dois meses de terapia. O CIM para este composto apresentou valores de 0,002 e 0,13 ug/mL para cepas de bactérias sensíveis e multiresistentes, respectivamente. O principal composto sintetizado por este grupo – R207910 – foi administrado em voluntários saudáveis e pacientes portadores de tuberculose em diferentes doses, para avaliação do perfil farmacocinético e eficácia. Os resultados obtidos indicam uma importante atividade deste composto sobre os bacilos, superior àquela encontrada para a isoniazida e rifampicina e uma atividade similar à da associação de rifampicina, pirazinamida e isoniazida. Ainda, esta molécula permite uma redução do período de tratamento da tuberculose, tanto para bactérias sensíveis, como àquelas multiresistentes e a associação deste composto com fármacos de 2ª linha é capaz de eliminar os bacilos multiresistentes mais rapidamente.

Lougheed *et. al.* (2009) avaliaram a atividade antimicobacteriana por MABA de uma série de compostos já utilizados na terapêutica e, entre estes, o antibacteriano de uso tópico tiostrepton, o antimalárico primaquina, o antidepressivo nialamida e o anti-helmíntico pamoato de pirvinium apresentaram resultados promissores para seu emprego no tratamento da tuberculose.

Pode-se observar que no contexto atual das tentativas de inovação para o tratamento da tuberculose existem diversos caminhos, seja através da síntese de novas moléculas, da avaliação da atividade antimicrobiana de fármacos já utilizados na terapêutica, da nanotecnologia ou da construção de diferentes sistemas de liberação de fármacos.

### **2.3. A Latenciação e o Sistema de Liberação Química (CDS)**

A utilidade do etambutol no tratamento da meningite tuberculosa apresenta limitações por aspectos relacionados às suas características farmacocinéticas. O produto não atravessa significativamente as meninges intactas e apenas 10 a 50% da dose administrada podem atravessar meninges inflamadas (BOBROWITZ, 1972).

Esse obstáculo pode ser vencido com a latenciação, uma abordagem que, entre outras, almeja o aumento da permeabilidade de fármacos e redução de sua toxicidade. A latenciação consiste em converter o fármaco em forma inativa, que por biotransformação *in vivo* químico ou enzimático, torna-se novamente ativa, preferencialmente próximo ao local de ação (CHUNG *et al*, 2005; CHUNG & FERREIRA, 1999).

A modificação molecular por meio de latenciação é justificada por muitas razões relacionadas ao fármaco matriz, como um perfil farmacocinético desfavorável, que pode incluir uma baixa biodisponibilidade, uma distribuição insuficiente no local de ação ou uma incapacidade de atravessar algumas barreiras biológicas como a barreira hematoencefálica (BHE); uma elevada toxicidade; ou uma baixa estabilidade química (CHUNG *et. al*, 2005; CHUNG & FERREIRA 1999; BUNGAARD, 1992).

A forma de transporte utilizada pelos pró-fármacos pode ser diferente, dependendo do objetivo a ser alcançado durante o planejamento. Essas diferentes formas de transporte permitem uma classificação dos pró-fármacos.

A subdivisão, cuja forma de transporte é característica da latenciação inclui os *pró-fármacos clássicos* - neste o pró-fármaco é obtido por meio de ligação do fármaco protótipo a um transportador - o que o torna inativo. Nos *fármacos dirigidos*, o fármaco é acoplado a um transportador específico para determinados receptores ou enzimas existentes no local de ação do fármaco. Os *pró-fármacos recíprocos* caracterizam-se por uma ligação de dois fármacos com ações distintas ou não, que só tem atividade após a clivagem *in vivo*. Já os *bioprecursores* são formas não ligadas a um transportador e sua ativação é feita por uma reação que é biorreversível. Por último, têm-se os *pró-fármacos mistos*, uma combinação das características dos pró-fármacos clássicos com os bioprecursores, a bioativação é feita em dois passos, no primeiro o fármaco ligado ao transportador é polarizado por uma oxidação, acumulando-o no local de ação, em seguida há a clivagem da ligação entre o transportador oxidado e o fármaco, que pode agir (CHUNG *et. al*, 2005; MISRA *et. al*, 2003; CHUNG & FERREIRA, 1999; WERMUTH, 1996).

Na meningite tuberculosa, a BHE representa um problema para ação do fármaco na região e a chegada de uma quantidade menor de fármaco leva a uma necessidade de aumento da dose administrada ou que o quadro clínico alcance progressão no processo inflamatório para que concentrações significativas do fármaco sejam atingidas e então ocorra o efeito terapêutico. A BHE é responsável por isolar hermeticamente o encéfalo do sangue circulante, sua impermeabilidade é devida principalmente a duas características: a

resistência elétrica e a ausência de poros. A resistência elétrica trans-endotelial da BHE é da ordem de 1500 a 2000  $\Omega\text{cm}^2$ , muito mais alta que a de outros tecidos (3-33  $\Omega\text{cm}^2$ ), isso impede a passagem de moléculas polares, a não ser por transporte mediado. Quanto aos poros, a transferência transcelular de moléculas é restrita pela inexistência de fenestras e baixa transcitose, ou seja, impedimento da translocação de moléculas de alto peso molecular. Conseqüentemente, a difusão passiva de fármacos através da BHE é limitada a compostos lipofílicos de baixo peso molecular (EYAL *et. al*, 2009; MISRA *et. al*, 2003).

Existem várias estratégias para acesso dos fármacos ao sistema nervoso central, como a distribuição mediada por carreador, cujo exemplo pode ser a levodopa, um pró-fármaco que mesmo sendo hidrossolúvel atravessa a BHE por ter uma alta afinidade pelo sistema de transporte para grandes aminoácidos neutros. Outra forma de acesso ao sistema nervoso central é a mediada por vetor ou receptor, em que o fármaco é ligado a uma proteína ou anticorpo monoclonal receptor-específico que sofre transcitose (SCHERRMANN, 2002).

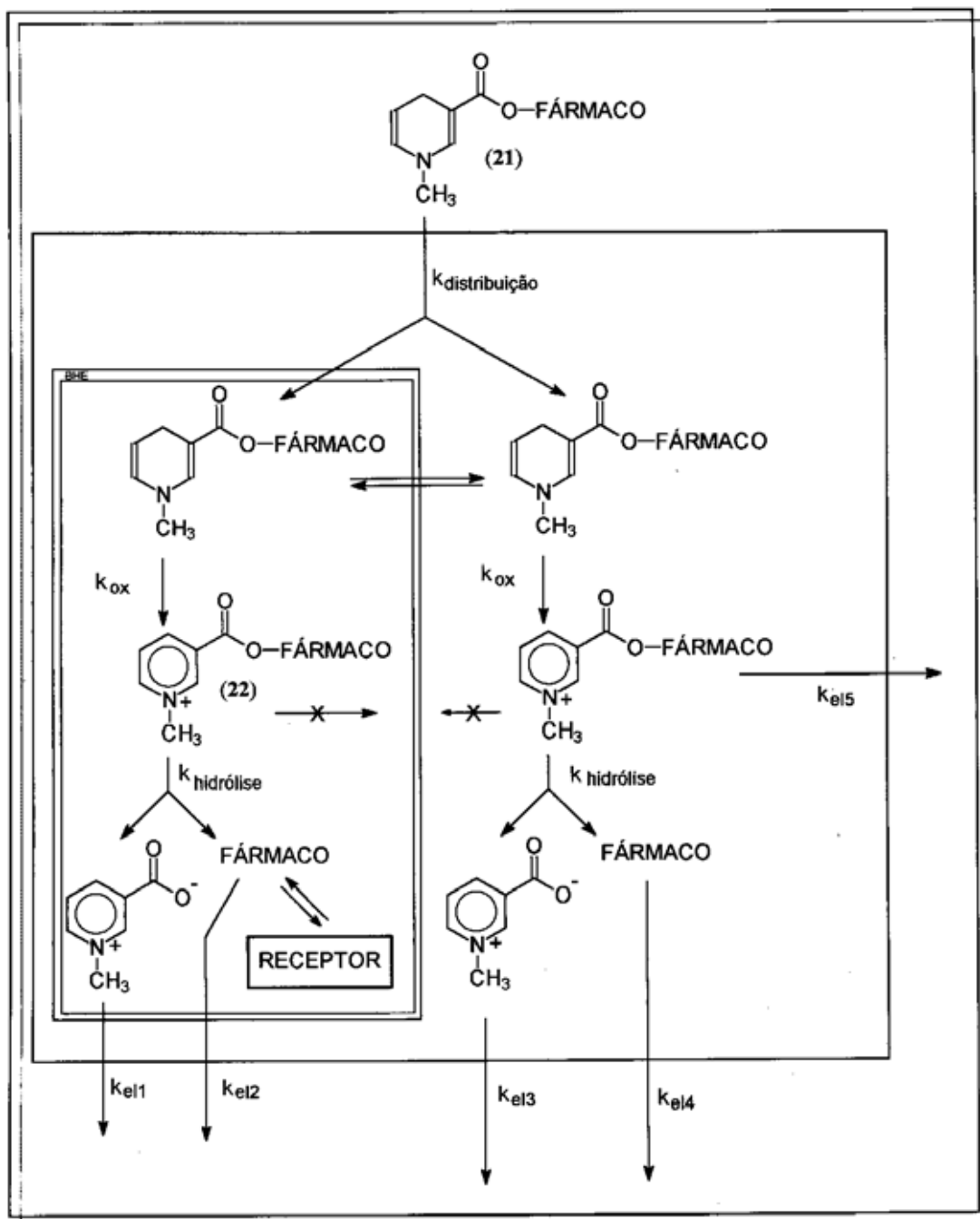
O uso de pró-fármaco misto constitui outra abordagem promissora para a meningite tuberculosa, se utilizado o sistema CDS (Chemical Delivery System) de Bodor & Abdelalim (1985). Neste sistema o fármaco matriz é ligado a um transportador suscetível a oxidação, que depois de oxidado libera o fármaco matriz no sistema nervoso central (PAVAN *et. al*, 2008; RAUTIO *et. al*, 2008; MISRA *et. al*, 2003).

No sistema CDS (Figura 1) o fármaco, que sozinho não alcança o sistema nervoso central, é ligado a um carreador, que torna o complexo

fármaco-carreador lipofílico o suficiente para atravessar a BHE, tendo, portanto acesso a praticamente todos os compartimentos corporais. Já no sistema nervoso central, o pró-fármaco sofre reação de oxidação, passando a uma forma positivamente carregada, isso também ocorre em outros compartimentos corporais, no entanto, especificamente no encéfalo, o complexo positivamente carregado não pode retornar à circulação sistêmica a partir do SNC e através da BHE, o que leva a um acúmulo do pró-fármaco. Para ter ação, o pró-fármaco será clivado liberando o fármaco ativo dentro do SNC, enquanto fora desta região o complexo positivamente carregado é rapidamente eliminado devido a alta polaridade (PERIOLI et al., 2004; SILVA, 2001; PROKAI *et al.*, 2000; BODOR & BUCHWALD, 1999; BODOR & BREWSTER, 1983; BODOR & FARAG, 1982).



Figura 1. Esquema CDS-SNC (CHUNG & FERREIRA, 1999).



### 3. JUSTIFICATIVA

As doenças infecciosas são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade em muitos países e têm sido alvo de inúmeras pesquisas por atingirem grandes contingentes populacionais (JONES & VARNAM, 2002).

Antes considerada moléstia infecciosa sob controle, a tuberculose (TB) ressurge como um problema de saúde pública, onde a ausência de recursos e o emprego de programas de controle inadequados mantiveram elevados os índices de incidência e prevalência (BLOOM, 1994).

A ocorrência da tuberculose extra pulmonar (Ep-TB) é diretamente proporcional à prevalência da infecção TB (HOPEWELL, 1994), e o comprometimento neurológico da infecção TB, definida como meningite tuberculosa, constitui-se a mais séria complicação (KATTI, 2004).

O esquema terapêutico preconizado para meningite tuberculosa envolve o uso de etambutol, rifampicina e isoniazida, em combinações segundo a fase do tratamento (BRASIL, 1995; II CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, 2004; KOROLKOVAS, 2001).

Assim, a terapêutica atual é composta por fármacos introduzidos a tempo considerável no mercado, apresentando poucas inovações. Sua eficácia tem sido progressivamente afetada em face do aparecimento da tuberculose multirresistente e da tuberculose extensivamente resistente. Existem poucos fármacos seguros e efetivos para o tratamento e, ainda, com a co-infecção por HIV, o problema torna-se maior, considerando-se a necessidade de associação de outros fármacos. Desta forma, o desenvolvimento de novas entidades químicas e novas estratégias de tratamento é imperativo, acompanhados de seus estudos de estabilidade, atividade farmacológica, toxicidade e perfil

farmacocinético, que produzem as informações fundamentais e necessárias aos estudos de fase clínica e então o surgimento de alternativas terapêuticas

O etambutol, embora útil quanto à sua ação não atravessa satisfatoriamente a barreira hematoencefálica (BOBROWITZ, 1972), podendo ocasionar efeitos adversos como cefaléia, hiperuricemia, transtornos gastrintestinais, erupção cutânea, neurite óptica e hipersensibilidade.

O sistema de liberação química, CDS, abre perspectivas de que haja o aumento da disponibilidade do etambutol nas meninges, minimização de efeitos adversos, maior eficácia e ação prolongada, levando à maior eficácia terapêutica (BODOR & BUCHWALD, 1999).

#### 4. OBJETIVOS

- Síntese e caracterização do pró-fármaco de etambutol (DEREMB);
- Determinação da atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Desenvolvimento e validação um método analítico para a determinação de etambutol (EMB) em plasma e do derivado de etambutol(DEREMB) em solução e plasma;
- Avaliação da estabilidade química do DEREMB em soluções tamponadas em pH 1,2 e 7,4 e em plasma;
- Investigar a disposição cinética do DEREMB em ratos wistar tratados com dose única *via endovenosa* (25 mg/kg) e *via gavagem* (100 mg/kg);
- Investigar a disposição cinética do Etambutol em ratos wistar tratados com dose única *via endovenosa* (25 mg/kg);
- Investigar a liberação de etambutol na circulação sistêmica de ratos wistar que receberam DEREMB em dose única por *via endovenosa* (25 mg/kg);
- Calcular os parâmetros farmacocinéticos do DEREMB administrado por *via endovenosa* e por *gavagem* e comparar ao parâmetros farmacocinéticos da *via endovenosa* entre DEREMB e etambutol.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Síntese

#### 5.1.1. Reagentes e solventes

Diclorometano, clorofórmio, dicloridrato de etambutol, ácido nicotínico, dicitclohexilcarbodiimida (DCC), acetona, iodeto de metila, metanol, éter etílico, acetato de etila, bicarbonato de sódio, ditionito de sódio. Todos os reagentes e solventes utilizados na síntese do DEREMB foram produtos P.A.

#### 5.1.2. Métodos sintéticos

##### 5.1.2.1. Síntese do *N*-nicotinoiletambutol (NEB)

Em uma solução de 0,05 mol de ácido nicotínico (6,16 g) em diclorometano adicionou-se 0,05 mol de DCC (10,32 g) a 0 °C por um período de 30 minutos. Logo após, adicionou-se 0,05 mol de dicloridrato de etambutol (10,22 g). A mistura reacional foi levada à refluxo e mantida sob agitação por 24 h. Após este período removeu-se a dicitclohexiluréia (DCU) formada na reação por filtração e o diclorometano foi removido sob pressão reduzida. O resíduo de coloração amarela foi cristalizado em mistura clorofórmio: acetato de etila (1:1; V/V), filtrado e seco a temperatura ambiente, obtendo-se um sólido cristalino, branco a amarelo pardo com faixa de fusão de 173,3 – 180,3 °C. O rendimento do produto purificado foi de 50%.

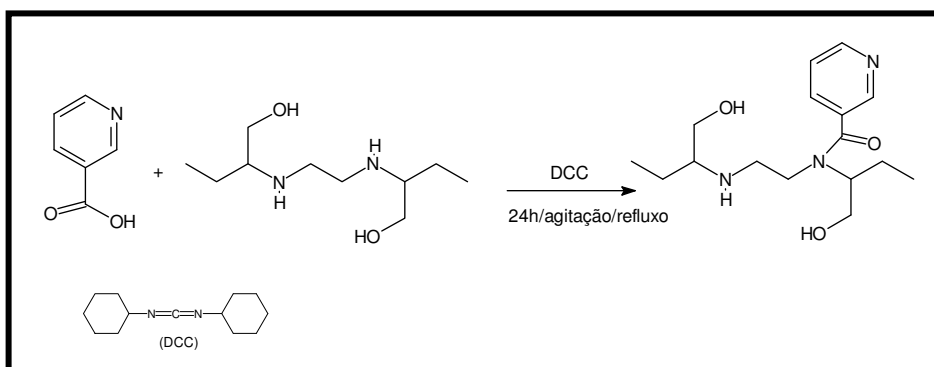


Figura 2 - Esquema da reação de obtenção do *N*-nicotinoiletambutol.

### 5.1.2.2. Síntese do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol (IMEB)

A uma solução de 5 mmol de N-nicotinoiletambutol (NEB) (1,56 g) em 10 mL de acetona, adicionou-se lentamente, por gotejamento, 10 mmol (1,41 g) de iodeto de metila sob atmosfera de N<sub>2</sub> em refluxo e agitação. Após 6 horas da adição do iodeto, a solução amarelo-parda torna-se escurecida, sugerindo que houve reação. A acetona então foi removida sob pressão reduzida e o resíduo amarelo-ouro foi lavado com éter etílico e em seguida cristalizado com mistura metanol:éter etílico (1:1; V:V). Obteve-se um sólido cristalino de coloração amarelo-marrom com faixa de fusão de 165,0 – 173,9 °C. O rendimento do produto formado foi de 33,33%.

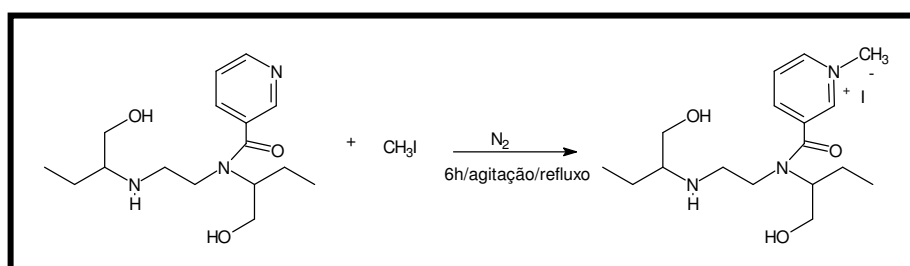
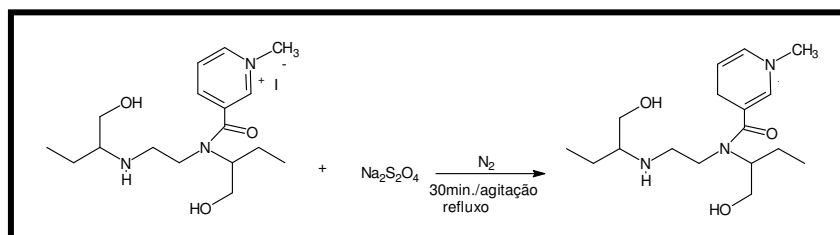


Figura 3 - Esquema da reação de obtenção do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol.

### 5.1.2.3. Síntese do 1-metil-diidropiridina-4-etambutol (DEREMB)

A uma solução resfriada de 14 mmol (1,18 g) de bicarbonato de sódio e 14 mmol (2,44 g) de ditionito de sódio em 100 mL de acetato de etila destilado, adicionaram-se lentamente 3,5 mmol de IMEB (1,58 g), sob agitação magnética e atmosfera de N<sub>2</sub>. Manteve-se a mistura sob atmosfera de N<sub>2</sub> por 30 minutos, com formação de uma solução bifásica. A reação foi filtrada e o acetato de etila

foi removido sob pressão reduzida. O produto formado foi dissolvido em acetona, filtrado e evaporado sob pressão reduzida até a secura, obtendo-se um sólido de coloração amarela escura a laranja, com faixa de fusão experimental de 164,0 – 167,0 °C. O rendimento percentual desta reação foi de 64,3.



**Figura 4 - Esquema da reação de obtenção do 1-metil-diidropiridina-4-etambutol.**

## 5.2. Caracterização

### 5.2.1. Determinação das faixas de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho de fusão capilar SMP3 da Bibby Stuart, disponível no Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) – UNESP – Araraquara.

### 5.2.2. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro Shimadzu, modelo FTIR-8300 do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR-UNESP-Araraquara.

### **5.2.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e carbono (RMN $^{13}\text{C}$ )**

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram realizados utilizando espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX300 – 125 MHz, 300 MHz e 500 MHz do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP. Foram utilizados tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro e solvente deuterado adequado (DMSO- $d_6$  e  $\text{CDCl}_3$ ).

### **5.2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A CCD será utilizada para acompanhamento da reação e da purificação dos derivados. Cromatofolhas com Sílica gel 60 F254 e sistema eluente adequado ao composto em questão.

### **5.2.5. Coeficiente de partição**

Os valores de logP foram obtidos através do método de fragmentação utilizando o programa ChemDraw Ultra 8.0.

## **5.3. Ensaio biológicos**

Os ensaios biológicos foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismos e Micobacteriologia “Prof. Dr. Hugo David” do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAR-UNESP-Araraquara, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Maria Bauab e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite, respectivamente.



### 5.3.1. Fármacos de referência e testes

Como fármaco de referência (controle positivo) foi utilizada uma solução de ciprofloxacino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO - USA) - preparada em água estéril na concentração final de 35 µg/mL - para o teste de atividade sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; e uma solução estoque de isonizida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – USA) - na concentração de 10 mg/mL em água estéril – para o teste de atividade em *Mycobacterium tuberculosis*. Foi utilizada como controle negativo a manutenção de orifício nas microplacas, contendo apenas o meio de cultura.

O ensaio de atividade para etambutol e DEREMB foi realizado utilizando-se soluções estoque de dicloridrato de etambutol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO - USA) preparada em água estéril e de DEREMB preparada em metanol: tween 80 (1:1 v/v), na concentração de 10 mg/mL.

### 5.3.2. Cepas Bacterianas

Foram utilizadas as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 (mantidos a – 20 °C em glicerol/caldo Müller-Hinton (Difco), CMH, até o momento do uso) e *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 (mantidos a – 80 °C em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC e 0,05% de Tween 80, até o momento do uso).

### 5.3.3. Preparação das suspensões bacilares

#### ➤ *S. aureus* e *E. coli*

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se um cultura de 24 horas, em tampão fosfato – salino (PBS) estéril pH 7,2 até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL). Posteriormente, para a realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1/10 em tubo, obtendo-se uma suspensão de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL (SANCHES, 2004).

#### ➤ *M. tuberculosis*

A cepa de *M. tuberculosis* H37RV ATCC 27294 foi cultivada de 7-10 dias à 37 °C no caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com Ácido Oléico, Albumina Bovina fração V, Dextrose e Catalase (OADC-BD/BBL) e 0,05% de Tween 80 para evitar formação de grumos. As suspensões foram preparadas e a turvação ajustada até atingir o padrão de densidade óptica da escala de McFarland nº 1. A cultura foi diluída 1:25 em caldo 7H9 enriquecido com OADC para a sua utilização.

### 5.3.4. Determinação da atividade antibacteriana e antimicobacterina e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas

#### ➤ *S. aureus* e *E. coli*

O teste foi realizado utilizando os 96 orifícios das microplacas de fundo chato (Figura 5). Aos poços das linhas de A até H das colunas 1 a 12 foram adicionados 80µL de CMH. Nas colunas 3 e 10, linha A a H foram adicionados 100µL da solução-estoque do controle positivo (solução de ciprofloxacino a 35

$\mu\text{g/mL}$ ) e negativo, respectivamente. Aos orifícios das colunas de 4 a 9 (divididas em duas substâncias em triplicata), linha A foram adicionados  $100\mu\text{L}$  do EMB ou DEREMB, após homogeneização foram realizadas diluições, passando  $100\mu\text{L}$  de cada orifício até a linha H. Obtendo um volume final de  $80\mu\text{L}$  nos orifícios das microplacas com as concentrações finais das amostras variando de  $100\mu\text{g/mL}$  a  $0,4\mu\text{g/mL}$ . Aos orifícios das colunas 11 e 12, linha A foram adicionados  $100\mu\text{L}$  das amostras testadas que sendo a homogeneização idêntica aos das colunas 4 a 9.

Subseqüentemente foi adicionado  $20\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana de  $10^7$  UFC/mL em cada orifício, exceto nos orifícios da coluna 1 (branco) e nos orifícios de controle da amostra testada (colunas 11 e 12). As microplacas foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas.

➤ ***M. tuberculosis***

Nas colunas 1 e 12 de uma microplaca de 96 orifícios (Figura 5) foram depositados  $200\mu\text{L}$  de água destilada, para evitar a desidratação do meio de cultura no ensaio durante a incubação na estufa. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas das soluções de isoniazida, etambutol e DEREMB na própria microplaca com caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC enrichment – BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA), de maneira a se obter concentrações variáveis de 1 a  $0,03\mu\text{g/mL}$  para isoniazida e de  $250\mu\text{g/mL}$  a  $0,10\mu\text{g/mL}$  para etambutol e DEREMB. O primeiro orifício da microplaca contendo cada composto a ser analisado foi utilizado para avaliar a viabilidade do método. Neste orifício foi adicionado apenas o meio de cultura e a amostra na diluição, onde se espera não haver crescimento de nenhuma espécie bacteriana. Em seguida,  $100\mu\text{L}$

da diluição (1:25 em caldo 7H9 enriquecido com OADC) foi inoculada em cada um dos orifícios contendo os compostos em análise e a isoniazida. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C.

#### **Leitura espectrofotométrica (ELLOF, 1998; NCCLS, 2003)**

A leitura espectrofotométrica foi realizada nos ensaios com as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922.

Após incubação, este ensaio realizado com as cepas bacterianas acima citadas foi submetido à leitura no leitor de microplacas a 595nm. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência ou redução de turvação no meio, que pode ser demonstrada através das leituras das absorbâncias em 595nm. A concentração mínima inibitória (CIM) foi considerada como a menor concentração do DEREMB capaz de inibir em 90% a multiplicação das cepas bacterianas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata na mesma microplaca.

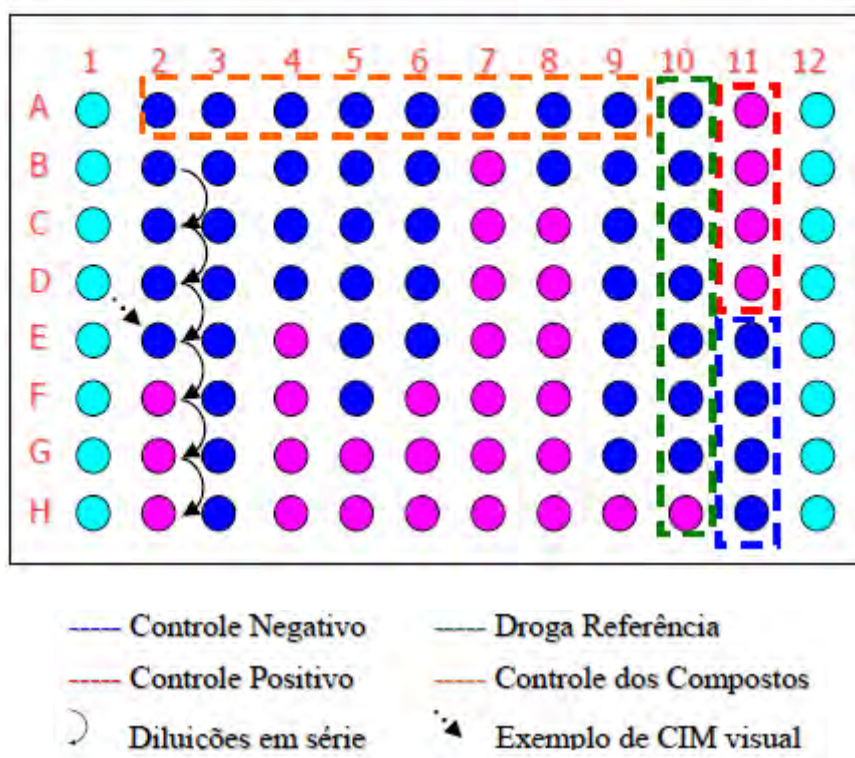
#### **Leitura utilizando resazurina (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO, 2005)**

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana (PALOMINO *et al*, 2002 e MONTEJANO, 2005). A manutenção da cor violeta nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do derivado de etambutol sem a mudança de coloração para rosa (Figura 5).

Nos ensaios com *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foram pipetados 50µL da solução de resazurina a concentração de 0,01% nos orifícios das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas até a mudança de coloração.

No ensaio com *M. tuberculosis* H37RV ATCC 27294, após seis dias de incubação foi adicionado no orifício de controle de cepa micobacteriana e no orifício de controle de meio, o volume de 30 µL da resazurina 0.01% diluída em água estéril. A microplaca foi reincubada a 37° C por 24 horas, após foi realizada a leitura visual. Obtendo-se o desenvolvimento de cor rósea no orifício controle de cepa micobacteriana, foram adicionados 30 µL da solução de resazurina nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37° C por 24 h. Nos casos onde não houve alteração para a cor rósea, a placa foi incubada por mais 24 h. Após este período, foi realizada a leitura final, baseada na interpretação da fluorescência no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), em que se utilizou filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, de acordo com Pavan (2009), considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com bactéria e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

$$100 \times \left\{ 1 - \frac{b}{a} \right\} = \% \text{ de Inibição da Multiplicação Bacteriana.}$$



**Figura 5:** Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de CIM através da técnica do *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA)

## 5.4. Determinação de etambutol em plasma por HPLC.

### 5.4.1. Soluções-Padrão e Reagentes

A solução estoque de dicloridrato de etambutol (DEB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) foi preparada em água tipo I na concentração de 100 µg/ml. A partir dessa solução foram preparadas as soluções diluídas - em água tipo I - nas concentrações de 0,25;0,5;1,0;2,0;4,0 e 8,0 µg/mL.

A solução de hidróxido de sódio, NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) foi preparada em água ultrapura na concentração de 4 M.

O tampão fosfato 0,05 M pH 5,0 foi preparado utilizando fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico grau p.a. (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO-USA) e adicionado de 2 mM de cloreto de potássio grau P.A. (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO-USA). Os solventes empregados no procedimento de

extração foram obtidos da *Merk* (Darmstadt, Alemanha) como grau P.A.. A fase móvel utilizada no sistema cromatográfico foram obtidos da JTBaker (México) grau HPLC.

#### **5.4.2. Sistema cromatográfico**

A análise do DEB em plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), equipamento Waters® Alliance 2695, constituído de um detector eletroquímico Waters 2465 com um eletrodo de trabalho de carbono vítreo. O potencial utilizado foi de + 1000 mV (*versus* eletrodo de referência Ag/AgCl).

O DEB foi separado em coluna fase-reversa (Symmetry C18, 250mm x 4.6 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA-USA), com utilização de pré coluna Symmetry C<sub>18</sub> de 5 µm, 3,9 x 20mm e fase móvel contendo tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 5,0):metanol:acetonitrila (95:3:2) e KCl na concentração de 2mmol em fluxo de 0,8 mL/min.

#### **5.4.3. Preparação das amostras**

Alíquotas de 500 µL de plasma foram adicionadas de 100 µL de solução de hidróxido de sódio (4 M). Após agitação em vórtex durante 1 minuto a mistura foi acrescida de 4 mL de acetato de etila e então agitada em agitador horizontal por 20 minutos e em seguida centrifugada por 15 minutos (2500 rpm). A seguir, as fases orgânicas (3,9 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas sob fluxo de nitrogênio à temperatura de 35 °C. Os resíduos foram reconstituídos com 200 µL da fase móvel e volumes de 50 µL foram introduzidos no sistema cromatográfico.

#### **5.4.4. Validação do método (Resolução ANVISA - RE nº 899, de 29 de maio de 2003)**

##### **Linearidade**

A curva de calibração foi obtida através da análise, em triplicata, das amostras de 500 µL em plasma (ratos wistar) branco e adicionados de DEB nas concentrações 0,25;0,5;1,0;2,0;4,0 e 8,0 µg/mL.

##### **Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada, cuja área da concentração correspondeu a 5 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 5 replicatas.

##### **Limite de detecção**

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração detectada, cuja área da concentração correspondeu a 3 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

##### **Precisão e Exatidão intra e inter-ensaios**

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes de DEB (1; 2,5 e 8 µg/mL), 5 replicatas durante 3 dias consecutivos (inter ensaios) e em 5 replicatas num mesmo ensaio (intra-ensaio). A exatidão (%erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados



obtidos experimentalmente com os valores reais dos compostos na amostra. O coeficiente de variação aceitável para todos os ensaios foi de 15%.

### **Seletividade**

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando os fármacos rifampicina, pirazinamida, além do pró-fármaco DEREMB foram submetidos ao procedimento de análise empregado. Estes fármacos foram selecionados devido ao fato de serem rotineiramente empregados no tratamento da tuberculose e apresentarem grande importância nos estudos clínicos; e o pró-fármaco por estar presente nas amostras de animais que o receberam.

### **Recuperação**

Foi realizado o estudo de recuperação em três concentrações de etambutol (1; 2 e 4 ug/mL) para avaliar a eficiência do procedimento de extração do método analítico. Este resultado foi expresso como a porcentagem da quantidade conhecida do etambutol obtida por comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

## **5.5. Determinação de DEREMB em plasma por HPLC**

### **5.5.1. Soluções-Padrão e Reagentes**

A solução estoque de 1-metil-4-carbamoil-etambutol, DEREMB, foi preparada em metanol grau cromatografia (JTBaker, México) na concentração de 100 µg/ml. A partir dessa solução foram preparadas as soluções diluídas em água tipo I nas concentrações 0,25;0,5;1,0;2,0;10 e 20 µg/mL.

A solução de hidróxido de sódio, NaOH (Sigma-Aldrich, MO-USA) foi preparada em água tipo I na concentração de 0,1 M. O acetato de etila empregado no procedimento de extração foi obtido da *Merk* (Darmstadt, Alemanha) como grau P.A.. A fase móvel foi constituída por metanol:água:acetonitrila (20:20:60) sendo os solventes obtidos da JTBaker (México) como grau HPLC.

### **5.5.2. Análise Cromatográfica**

A análise do pró-fármaco em plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo líquido Waters® Alliance 2695 equipado com detector UV-Vis 2487 operando a 256 nm. O DEREMB foi separado em coluna fase-reversa (Resolve C18, 300 mm x 3,9 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA-USA), com utilização de pré coluna Symmetry C<sub>18</sub> de 5 µm, 3,9 x 20mm. A fase móvel foi constituída pela mistura metanol:água:acetonitrila (20:20:60, v/v) em modo isocrático. O fluxo utilizado foi de 0.8 mL/min, o volume de injeção foi de 100 µL e o tempo de corrida foi de 12 minutos.

### **5.5.3. Preparação das amostras**

Alíquotas de 500 µL de plasma foram adicionadas de 100 µL de solução de solução de hidróxido de sódio (0,1 M) e agitadas em vórtex durante 15 segundos. Em seguida adicionou-se 2 mL de acetato de etila agitando-se em vortex por 15 segundos e centrifugando-se a 2900 rpm por 15 minutos; este procedimento foi realizado por duas vezes consecutivas, juntando-se as fases orgânicas obtidas nas duas etapas com um volume final de 3,8 mL . A fase

orgânica (3,8 mL) foi transferida para tubo cônico e evaporada sob fluxo de ar à temperatura ambiente. O resíduo foi reconstituído com 150 µL de metanol e 100 µL introduzidos no sistema cromatográfico.

#### **5.5.4. Validação do método (Resolução ANVISA - RE nº 899, de 29 de maio de 2003)**

##### **Linearidade**

A curva de calibração foi obtida através da análise, em triplicata, das amostras de 500 µL em plasma (ratos wistar) branco e adicionados de DEREMB nas concentrações 0,25;0,5;1,0;2,0;10 e 20 µg/mL. Foi feita uma curva de calibração em soluções nas mesmas concentrações.

##### **Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada, cuja área da concentração correspondeu a 5 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

##### **Limite de detecção**

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração detectada, cuja área da concentração correspondeu a 3 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

### **Precisão e Exatidão intra e inter-ensaios**

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes de DEREMB (1,0; 2,5 e 8  $\mu\text{g/mL}$ ), 5 replicatas durante 3 dias consecutivos (inter ensaios) e em 5 replicatas num mesmo ensaio (intra-ensaio). A exatidão (%erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais dos compostos na amostra. O coeficiente de variação aceitável para todos os ensaios foi de 15%.

### **Seletividade**

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando os fármacos rifampicina, pirazinamida e etambutol foram submetidos ao procedimento de análise empregado. Estes fármacos foram selecionados devido ao fato de serem rotineiramente empregados no tratamento da tuberculose e apresentarem grande importância nos estudos clínicos; e o etambutol por supostamente estar presente nas amostras de animais que receberam DEREMB.

### **Recuperação**

Foi realizado o estudo de recuperação em três concentrações de DEREMB (1; 2,5 e 8  $\mu\text{g/mL}$ ) para avaliar a eficiência do procedimento de extração do método analítico. Este resultado foi expresso como a porcentagem da quantidade conhecida do DEREMB obtida por comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

## **5.6. Estudo de estabilidade *in vitro* - Hidrólise em pH 1,2 e 7,4**

Triplicatas de soluções tampão fosfato 1M (pH 7,4) e tampão acetato 1M (pH 1,2) adicionadas do pró-fármaco à uma concentração de 6 µg/mL, foram agitadas por 24 horas em temperatura de 37 °C. Alíquotas de 500 µL de cada solução foram coletadas e analisadas por HPLC nos tempos 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Estes resultados foram analisados através do cálculo do coeficiente de variação ponderado.

## **5.7. Estudo de estabilidade *ex vivo* - Hidrólise em plasma**

Triplicatas de plasma humano adicionadas do pró-fármaco à uma concentração de 10 µg/mL, foram agitadas por 24 horas em temperatura de 37 °C. Alíquotas de 500 µL de plasma foram coletadas, processadas (como descrito no item 5.5.3.(Preparação de das amostras) e analisadas por HPLC nos tempos 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Estes resultados foram analisados através do cálculo do coeficiente de variação ponderado.

## **5.8. Farmacocinética pré-clínica do pró-fármaco de etambutol e do etambutol**

### **5.8.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de 200g ± 50, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1° C), umidade (55 ± 5%) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e

obtiveram alimento e água a vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

Foram utilizados um total de 60 animais distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo I** --tratados DEREMB, via endovenosa (n = 20);
- **Grupo II** -tratados DEREMB, por gavagem (n = 20);
- **Grupo III** -tratados com etambutol, via endovenosa (n = 20);

### **5.8.2. Protocolo Experimental (Protocolo - CEP/FCF/CAr. nº 13/2008**

#### **- Anexo)**

##### **a) Via endovenosa**

Para os animais deste grupo foi administrado DEREMB e etambutol (25 mg/kg) pela veia femoral, em dose única, após jejum de 12 h. O veículo utilizado para dissolução do DEREMB foi constituído de DMSO:propilenoglicol (20:80, v:v) em decorrência da sua insolubilidade em água; o etambutol foi dissolvido em água estéril.

Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue, pela cauda do animal e a partir da decapitação dos mesmos, para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Foram colhidos 500 uL de sangue em eppendorffs heparinizados (Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos 5,10,15,20,30,45,60,90 e 120 minutos após a administração para o DEREMB e 5;15;30;45;60;90 e 120 minutos para o etambutol. Para cada animal foram realizadas 3 coletas, utilizando um total de 20 animais.

As amostras de sangue para obtenção do plasma foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o plasma armazenado a  $-80^{\circ}$  C até a realização das análises laboratoriais.

## **b) Via gavagem**

Os animais deste grupo receberam dose única de 100 mg/Kg de DEREMB. Esta dose foi determinada a partir de extrapolação alométrica da dose de etambutol utilizada no homem (25 mg/kg) para o modelo animal utilizado (rato). O veículo utilizado para o DEREMB foi constituído de DMSO:propilenoglicol (20:80, v:v) em decorrência da sua insolubilidade em água.

A disposição cinética do DEREMB foi investigada com base na relação concentração *plasmática x tempo*. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos 5,10,15;20;30; 45; 60; 90 e 120 minutos após a administração.

As amostras de sangue obtidas da cauda dos animais e a partir da decapitação dos mesmos foram colhidas, respectivamente, em seringas e tubos de vidro heparinizados, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o plasma armazenado a  $-80^{\circ}$  C até a realização das análises laboratoriais.

### **5.8.3. Análise Farmacocinética**

A disposição cinética do DEREMB foi avaliada após a administração de dose única via endovenosa (25 mg/kg) e por gavagem (100 mg/kg). A disposição cinética do etambutol foi avaliada após administração endovenosa (dose única; 25 mg/kg).

A concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) e foi obtida diretamente dos dados experimentais e os demais parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas concentração plasmática *versus* tempo.

A meia-vida foi obtida pelo método gráfico e determinada por modelo monocompartimental, que melhor se adaptou aos dados experimentais.

A constante de velocidade de eliminação foi calculada através da equação  $0.693/t_{1/2}$ . As áreas sob as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo  $AUC^{0-t}$  e  $AUC^{0-\infty}$  foram calculadas através do método dos trapezóides. O parâmetro  $AUC^{0-\infty}$  foi empregado nos cálculos do *clearance* plasmático ( $Cl = \text{dose} / AUC^{0-\infty}$ ) e do volume de distribuição ( $Vd = Cl/\beta$ ).

## 5.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise foram expressos como média  $\pm$  EPM e foram analisados através do coeficiente de variação ponderado. As curvas de calibração e os coeficientes de variação foram calculados utilizando-se o programa Origin®.

Os resultados obtidos no estudo de farmacocinética pré-clínica foram apresentados através das medianas e médias (IC 95). O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para avaliar razões diferentes da unidade, com nível de significância fixado em 5% para a comparação entre as cinco replicatas da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Para esta comparação foi utilizado o programa GraphPad InStat®. Os parâmetros farmacocinéticos foram comparados utilizando-se o teste de Mann-Whitney pelo programa GraphPad InStat®.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Síntese e caracterização

Em linhas gerais, na síntese proposta, o fármaco de partida [F], o EMB, é acoplado ao ácido nicotínico (transportador terciário) [C] por ligação amídica e, em seguida quaternizado [QC] com iodeto de metila. Posteriormente, [QC] é reduzido quimicamente com ditionito de sódio para a forma diidro lipoidal [F-DHC]. Tal mecanismo foi selecionado, já que o processo de acoplamento primário do ácido nicotínico, seguido de quaternização com iodeto de metila pode gerar produtos mais estáveis à hidrólise, fato relatado na literatura na obtenção de diversos pró-fármacos CDS (PROKAI et. al., 2000; BUCHWALD & BODOR, 1998; BODOR & ABDELALIM, 1985; BODOR & FARAG, 1982).

#### 6.1.1. N-nicotinoiletambutol (NEB)

Na síntese do NEB foi empregada a metodologia de preparo de amidas baseada na utilização do reagente diciclohexilcarbodiimida (DCC), que atua como ativador do grupo carbonila, facilitando a reação de adição-eliminação nucleofílica (MLADENOVA et al., 2001; SOLOMONS et al., 2002; STÖCKIGT et al., 1975). Apesar do uso do DCC permitir a obtenção da amida a partir do ácido em uma etapa com excelentes rendimentos, esta metodologia apresenta como inconveniente a remoção de dicicloexiluréia (DCU) formada como sub-produto na reação.

Desta forma, o NEB advém da reação entre ácido nicotínico e etambutol, em presença de agente condensante, no caso, DCC. O esquema reacional encontra-se ilustrado na Figura 2.

A formação do intermediário reativo advém do ataque nucleofílico da carboxila do ácido nicotínico ao carbono imínico do DCC. Posteriormente, o ataque nucleofílico da amina secundária do etambutol ao carbono carbonílico do intermediário, resulta na formação de ligação amida, caracterizando o produto desejado N-nicotinoiletambutol.

Em procedimentos realizados no laboratório previamente, a síntese do NEB, baseou-se no método sintético proposto por Bodor e Farag (1982), que utilizava piridina como solvente da reação em temperatura ambiente. No entanto, frente ao baixo rendimento, a impregnação por piridina e, principalmente, as dificuldades para se isolar o produto desejado, resolveu-se modificar o método sintético. A piridina foi substituída por diclorometano visando favorecer a precipitação da DCU no meio reacional, facilitando assim sua remoção, levando-se em conta a baixa solubilidade do DCU no referido solvente (MERCK, 1996).

Na prática, observou-se que 3 h após o início da reação, a mistura reacional que inicialmente se apresentava como uma suspensão esbranquiçada foi se tornando amarelada com aspecto leitoso, indicando que a reação estava ocorrendo. Após o período de 24 horas a reação foi encerrada, de acordo com o preconizado por Stöckigt (1975) na metodologia de preparação de amidas a partir de ácidos carboxílicos utilizando DCC, e principalmente, pelo indicativo da completa separação apresentada na CCD que foi realizada com fase móvel metanol:clorofórmio (60: 40 v/v). Ainda, a solução apresentava-se amarela e translúcida. Assim, o produto foi submetido aos experimentos de caracterização e elucidação estrutural.

O NEB apresenta-se em forma de pó de coloração amarelo claro, solúvel em clorofórmio e metanol, levemente solúvel em etanol e insolúvel em água, hexano, éter etílico e acetato de etila. Ante ao perfil de solubilidade, o composto em questão apresenta comportamento distinto ao do reagente de partida dicloridrato de etambutol (DEB) e ácido nicotínico (AN) (MERK, 1996), especialmente nos solventes clorofórmio, acetona, água e acetato de etila, o que permitiu utilizar os mesmos em técnicas de purificação.

Em relação aos procedimentos efetuados para isolamento do NEB, a recristalização em clorofórmio:acetato de etila (1:1, v/v) mostrou-se como técnica de maior rendimento (50%), em contrapartida com o baixo rendimento dos testes em hexano : acetato de etila (1:1, V/V), clorofórmio : éter (1:1, V/V) e água : etanol (1:1, V/V). Entretanto, o sistema solvente utilizado para purificar o produto apresenta inconveniente como um longo período de cristalização (21 dias).

Na Tabela 1 observa-se que a faixa de fusão, determinada experimentalmente, do NEB é significativamente mais baixa que aquelas dos reagentes de partida, corroborando com a obtenção do produto desejado.

**Tabela 1-** Faixas de fusão.

<b>Compostos</b>	<b>Faixa de Fusão (°C)</b>
<b>NA</b>	233,8 – 235,7
<b>DEB</b>	198,3 – 204,2
<b>NEB</b>	173,3 – 180,3

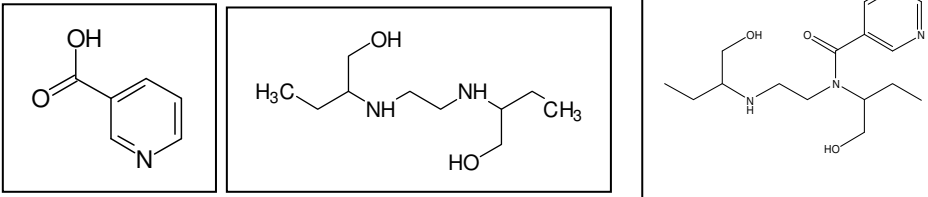
AN-ácido nicotínico; DEB-dicloridrato de etambutol; NEB-N-nicotinoiletambutol

As análises espectrofotométricas e espectrométricas permitiram confirmar a obtenção do NEB.

Junto aos resultados, propriamente ditos, referentes ao *N*-nicotinoiletambutol estão dispostos dados dos reagentes de partida, dicloridrato de etambutol (DEB) (Espectros 2, 4 e 5) e ácido nicotínico (AN) (Espectro 1) no Anexo, para efeito de comparação.

No Espectro 3 correspondente à espectrofotometria de absorção no IV do NEB, observa-se que a principal informação, comparativamente às matérias-primas (AN, DEB), espectros 1 e 2 respectivamente, é o surgimento de absorção em  $1695\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento da carbonila da amida. Absorções referentes aos demais grupamentos da molécula também são observadas (estiramentos e deformações fora do plano do anel heteroaromático, cadeia alifática). Abaixo uma tabela (Tabela 2) onde são detalhadas as atribuições observadas nos espectros de IV.

**Tabela 2** – Atribuições da espectrofotometria de infravermelho do AN, do DEB, do NEB.

Grupo Químico	IV <sub>v</sub> máx (KBr, cm <sup>-1</sup> )		
	NA	DEB	NEB
			
<b>CH=C<sub>ar</sub></b>	1417,6;1488,9;1583,4; 1595,0	—	1654,8 e 1541
<b>CHCH<sub>2</sub></b>	—	2970	2935-2852
<b>CH<sub>ar</sub> mono</b>	680,8;694,3; 746,4;	—	715
<b>C=O<sub>ácido</sub></b>	1705,0	—	—
<b>OH<sub>livre</sub></b>	3486	3342	3464,1
<b>NH<sub>sec</sub> alif.</b>	—	—	3211
<b>CO<sub>amida</sub> ar.</b>	—	—	1695,4

A conversão do etambutol na amida nicotínica desejada (*N*-nicotinoiletambutol) pode ser constatada pela observação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto em questão (Espectros 6, 7).

Os sinais em δ8,83 (d; *J*= 1,5 Hz), δ8,58 (dd; *J*= 1,5 e 5,0 Hz), δ7,93 (dt; *J*= 1,5 e 8,0 Hz) e δ7,34 (dd; *J*= 5,0 e 8,0 Hz) observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 6) permitem inferir a presença de um substituinte aromático (grupo piridínico) na estrutura do *N*-nicotinoiletambutol.

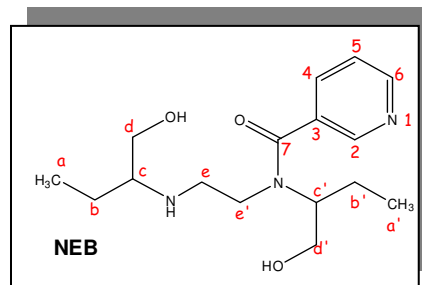
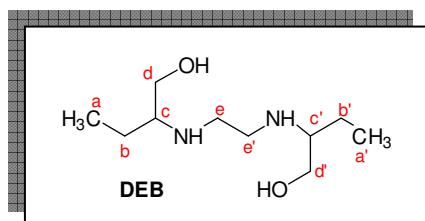
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Espectro 7) evidencia a aromaticidade do derivado planejado, visto a presença dos cinco sinais em 134,0, 146,6, 149,0, 136,0, 123,5 ppm os quais são compatíveis com um derivado piridínico. A

função amida presente no *N*-nicotinoiletambutol pode ser observada, também, pela presença do sinal em 166,8 ppm de uma carbonila de amida. Adicionalmente, os carbonos e hidrogênios dos grupos metilênicos, ligado aos N (c, c', e, e') são diferentes, o que sugere a ligação amídica em um dos N.

Ao observa-se a simetria do etambutol, as posições a, b, c, d, e são idênticas às posições a', b',c', d', e', esse fato é bem caracterizado pela presença de um único conjunto de sinais apresentado pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Espectros 4 e 5) e observados na tabela 3.

Dessa forma, salienta-se para o processo de amidação, o qual poderia conduzir a dois produtos (monoamida ou diamida). Se o procedimento culminasse na obtenção da diamida, o produto também seria simétrico, tendo a mesma coerência com um conjunto de sinais simplificado, observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do etambutol. Por outro lado, estes experimentos de RMN mostraram sinais complexos, ou seja, não havendo mais similaridade entre as posições a, b, c, d, e com as posições a', b', c', d', e'. Assim, propõe-se que o procedimento sintético resultou na obtenção seletiva da monoamida planejada.

Na Tabela 3 encontram-se as atribuições dos espectros RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do DEB (Espectro 4 e 5) e do NEB (Espectro 6 e 7).

**Tabela 3.** Atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do *DEB* e do *NEB*.

Posição	$\delta_c$ (PPM)	$\delta_H$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz)	Posição	$\delta_c$ (PPM)	$\delta_H$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz)
a/ a'	9,76	0,93; t; 7,5	a	8,56	1,32; t; 7,5
b/b'	20,3	1,64 e 1,73; m	b	25,1	1,47 e 1,61; m
c/c'	60,3	3,08; m	c	49,7	3,36; m
d/d'	57,2	3,66; dd; 3,0 e 12,5	d	45,8	3,03; m
e/e'	40,8	3,43; m	e	30,7	1,47; m
-OH ou -NH		5,30 e 9,30	a'	8,56	1,32; t; 7,5
			b'	26,0	1,71 e 1,77; m
			c'	56,4	4,08; m
			d'	45,8	3,03; m
			e'	32,0	1,82; m
			2	149,0	8,83; d; 1,5
			3	134,0	-
			4	136,0	7,93; dt; 1,5 e 8,0
			5	123,5	7,34; dd; 5,8 e 8,0
			6	146,6	8,59; dd; 1,5 e 5,0
			7	166,8	-

Ao término da reação, o filtrado constituirá a fração de interesse, que originará o produto desejado, após purificação, *N*-nicotinoiletambutol

### **6.1.2. Iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol (IMEB)**

A reação de obtenção do iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol, consiste em reação de *N*-alquilação, caracterizada, no presente caso, pela adição de um haleto de alquila (iodeto de metila) ao *N*-nicotinoiletambutol, resultando na formação de sal quaternário.

Nos procedimentos realizados no laboratório, inicialmente a reação apresenta coloração amarelo claro e foi se tornando amarelo ouro ao reagir com iodeto de metila. Após o período de 6 horas de reação, esta se tornou castanho o que sugeriu a ocorrência da reação e confirmada pela separação observada na CCD que foi realizada com fase móvel metanol:clorofórmio (60:40 v/v), então a reação foi encerrada. Desta forma, os experimentos de caracterização e elucidação estrutural foram realizados para o produto, IMEB.

O IMEB apresenta-se como um sólido cristalino de coloração marron claro, altamente solúvel em etanol, solúvel em acetona e metanol e, parcialmente solúvel em clorofórmio, insolúvel em água, hexano, éter etílico, acetato de etila e acetonitrila.

No procedimento de isolamento deste produto, se destaca a lavagem com éter etílico do resíduo sólido obtido após evaporação do solvente do filtrado da mistura reacional, consistiu em recurso para eliminação do excesso de iodeto de metila.

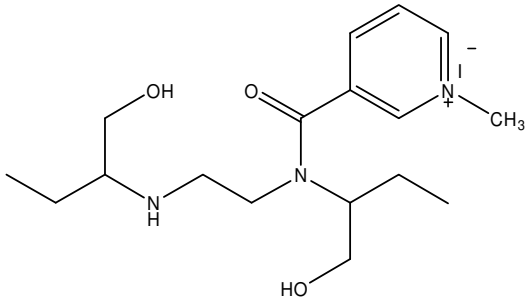
O rendimento percentual, após a purificação por recristalização com metanol: éter etílico (1:1 V/V), obtido nesta etapa foi de 67%. Este sistema de



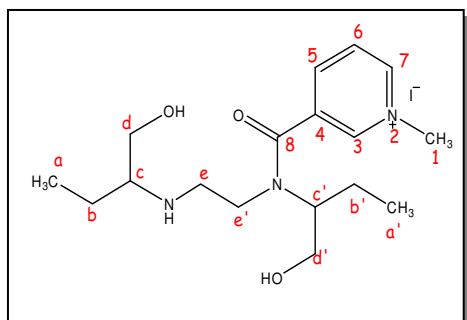
recristalização foi o mais eficiente dos testados, com menor tempo de cristalização e o rendimento mais elevado. Observa-se ainda, que a faixa de fusão experimental apresentou-se de 183 - 189 °C.

No espectro de absorção no IV do IMEB (Espectro 8) é possível observar a manutenção dos estiramentos referentes ao anel piridínico (1627 e 1575) e da carbonila da amida (1695) e o surgimento de deformação do anel aromático monosubstituído nas regiões 711 e 671  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atribuições da espectrofotometria no Infravermelho do IMEB.

IV <sub>v</sub> máx (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	
	
Grupo químico	IMEB
CH=C <sub>ar</sub>	1654,9;1627,9;1575,8
$\delta\text{C-H}_{\text{ar mono}}$	711,7; 671,2
CHCH <sub>2</sub>	2931,8
OH <sub>livre</sub>	3327,2
NH <sub>sec alif.</sub>	~ 3500

Desta forma, fez-se necessária a análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os resultados das análises espectroscópicas, espectros 9 e 10, de iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol encontram-se reunidos na Tabela 5.

**Tabela 5 - Atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do IMEB.**

Posição	$\delta_c$ (PPM)	$\delta_H$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz)
<b>a</b>	-	1,09; m
<b>b</b>	24,9	1,43; m
<b>c</b>	51,2	3,38; m
<b>d</b>	-	2,08; s
<b>e</b>	30,8	1,76; dl; 13,5
<b>a'</b>	-	1,23; m
<b>b'</b>	25,2	1,60; m
<b>c'</b>	55,8	4,1; m
<b>d'</b>	-	2,08; s
<b>e'</b>	31,8	1,97; dl; 7
<b>1</b>	49,5	4,56; s
<b>3</b>	146,5	9,68; s
<b>4</b>	137,1	-
<b>5</b>	145,1	8,56; d; 8,0
<b>6</b>	127,0	7,91; dd; 2,0 e 6,0
<b>7</b>	142,6	9,08; d; 6,0
<b>8</b>	161,0	-

Na análise espectroscópica de iodeto piridínico de 1-metil-4-carbamoil-etambutol, o principal aspecto a ser analisado foi o surgimento do sinal em torno 49,5 ppm ( $C_1$ ) e 4,56 ppm ( $H_1$ ), sugerindo a presença da metila ligada a *N* do anel piridínico.

### **6.1.3. 1-metil-4-carbamoil-etambutol (DEREMB)**

O DEREMB advém da reação de óxido-redução do IMEB, em presença de agente redutor ditonito de sódio. O esquema reacional encontra-se ilustrado na Figura 4.

A reação de síntese deste composto, que durou 30 minutos, ocorreu de acordo com o previsto no método de Bodor e Farag (1982) e visualmente sugeriu a formação do produto, através da mudança de cor e turvação da solução, assim como formação de duas fases e de sólido no decorrer do procedimento e, finalmente, confirmada pela separação na CCD que utilizou da fase móvel clorofórmio:metanol (90:10 v/v).

Após a dissolução com acetona, evaporação à pressão reduzida para eliminação de solventes utilizados, obteve-se um sólido com coloração amarela escura, solúvel em clorofórmio, acetona e metanol, insolúvel em água, e com faixa de fusão experimental de 164,0 – 167,0 °C. O rendimento percentual da reação de obtenção deste composto foi de 64,3.

A observação dos estiramentos do espectro no Infravermelho (Espectro 11) e os sinais no espectro de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  (Espectro 12 e 13) referentes ao anel 1,4-dihidropiridina reduzido sugerem que o procedimento sintético de redução com ditonito de sódio do sal piridínico, resultou na obtenção de 1-metil-4-carbamoil-etambutol.

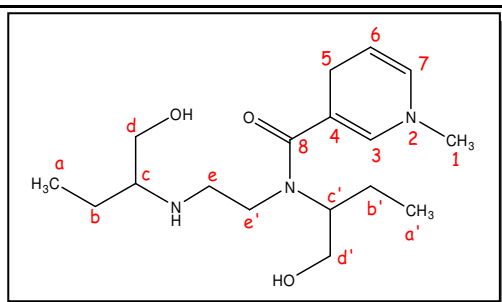
Destacam-se que no espectro infravermelho o desaparecimento dos estiramentos de 1627 e 1575  $\text{cm}^{-1}$  referentes à deformação da ligação entre carbonos em anel aromático, sugerindo a redução no anel aromático. A Tabela 6 mostra as atribuições referentes ao espectro de infravermelho (Espectro 11).

**Tabela 6.** Atribuições da espectrofotometria no infravermelho do DEREMB.

IV <sub>v</sub> máx (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	
Grupo químico	IMEB
CH=C	1654
$\delta\text{C-H}_{\text{mono}}$	711
CHCH <sub>2</sub>	2935
OH <sub>livre</sub>	3448
NH <sub>sec alif.</sub>	—
CO <sub>amida ar.</sub>	1695

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  evidenciam a não aromaticidade do derivado planejado, visto pela presença dos deslocamentos de todos os sinais do núcleo 1,4 – diidropiridina e, em especial, os sinais em 3,30 ppm e 26,0 ppm ( $\text{H}_5$  e  $\text{C}_5$ , respectivamente).

As atribuições das análises espectrométricas dos DEREMB encontram-se na Tabela 7, correspondente ao Espectro 12 e 13.

**Tabela 7.** Atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do DEREMB.

Posição	$\delta_c$ (PPM)	$\delta_H$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz)
<b>a</b>	-	1,11; m
<b>b</b>	25,4	1,50; m
<b>c</b>	50,2	3,78; m
<b>d</b>	-	2,36; s
<b>e</b>	28,8	1,70; m
<b>a'</b>	-	1,32; m
<b>b'</b>	25,1	1,61; m
<b>c'</b>	55,2	4,1; m
<b>d'</b>	-	2,36; m
<b>e'</b>	31,9	1,8; m
<b>1</b>	49,0	4,39; s
<b>3</b>	147,5	7,42; d; 15,5
<b>4</b>	143,0	-
<b>5</b>	26,0	3,30; s
<b>6</b>	128,1	5,58; d; 5,0
<b>7</b>	145,7	7,03; dd; 7,5 e 8,0
<b>8</b>	162,6	-

### **Coeficiente de Partição (log P ou $K_{O/W}$ )**

O valor do coeficiente de partição (log P ou  $K_{O/W}$ ) é um parâmetro frequentemente usado como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. O log P é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, como o sistema água e octanol. Nos últimos anos,  $K_{O/W}$  vem sendo muito utilizado em várias áreas, com um número elevado de publicações divulgando a sua correlação com outras propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos, além do sucesso de seu uso na estimativa de fatores de bioconcentração, coeficiente de partição carbono-orgânico, toxicidade e solubilidade (SILVA & FERREIRA, 2003; DEARDEN, 1985). Isto se deve ao fato de  $K_{O/W}$  estar relacionado com a interação do composto em estudo com o meio, no que diz respeito à absorção e transporte. Entre as técnicas experimentais utilizadas para medir  $K_{O/W}$  se destacam: (i) "shake-flask", que é o método clássico de determinação de  $K_{O/W}$ ; (ii) técnica geradora de coluna (GC); (iii) medidas de cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência e de camada fina (RP-HPLC e RP-TLC). Todas estas técnicas apresentam suas limitações, como a absorção e volatilização do soluto (GC) (RAPAPORT & EISENREICH, 1984), ou a dificuldade analítica na determinação de  $K_{O/W}$  de substâncias pouco solúveis (MILLER *et al.*, 1984).

$K_{O/W}$  pode também ser calculado teoricamente utilizando diferentes metodologias: (i) métodos baseados em fragmentos da molécula. Neste caso, log P é estimado a partir da contribuição aditiva de grupos funcionais e fragmentos anexados à base molecular (GHOSE *et al.*, 1998; LEO *et al.*, 1975);

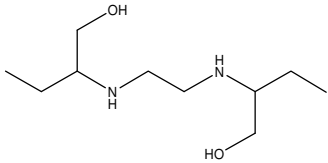
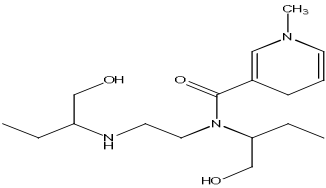
(ii) métodos baseados na contribuição atômica (WANG *et al.*, 1997; CROIZET *et al.*, 1990), em que cada átomo tem uma contribuição aditiva para o log P da molécula; (iii) métodos baseados em modelos que utilizam parâmetros obtidos por meio de cálculos quânticos (KLOPMAN & ZHU, 2005; BODOR & HUANG, 1991).

A investigação da natureza e grandeza do coeficiente de partição pode contribuir para uma compreensão do comportamento farmacocinético do DEREMB como candidato a pró-fármaco de liberação central ao tratamento da meningite tuberculosa.

A amidação do etambutol no CDS modifica a lipossolubilidade do composto aumentando a possibilidade de penetração no sistema nervoso central. Ainda, além de melhorar a solubilidade da substância no sistema biológico, esta transformação pode também melhorar sua estabilidade e conferir uma liberação sustentada no local de ação.

Os valores dos coeficientes de partição calculados para etambutol e DEREMB, pelo programa ChemDraw Ultra 8.0 que utiliza do método de fragmentação, dispostos abaixo na Tabela 8, indicaram uma melhoria nas propriedades lipofílicas, o que pode favorecer a absorção biológica, já que, em geral, a permeabilidade em membranas biológicas de um soluto aumenta de acordo com o log P, ou seja, se aumenta o coeficiente de partição, a taxa de absorção também pode aumentar (BANKER & RHODES, 2002; MISHRA *et al.*, 2008).

**Tabela 8.** Estrutura e valores de log P calculado pelo programa ChemDraw Ultra 8.0.

Composto	Estrutura	Log P calculado
Etambutol		0,06
DEREMB		0,5

Assim, esta distinta característica físico-química em relação ao etambutol, sugere uma melhor eficiência na capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica para atingir o SNC e liberar o composto ativo.

## 6.2. Atividade antibacteriana

A determinação da atividade antibacteriana é uma etapa importante na caracterização do potencial biológico e triagem de novos fármacos. A determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) desses novos agentes antimicobacterianos é decisiva na continuidade de seu desenvolvimento e estudo ou no abandono das substâncias não promissoras. A determinação da CIM das substâncias pode ser obtida por diversos métodos, dentre os mais citados na literatura estão: o método das proporções em ágar, ensaio de microplacas Alamar Blue (MABA), o sistema BACTEC (GUO *et. al.*, 2010; HUANG *et. al.*, 2009; JAJU *et. al.*, 2009; LILIENKAMPF *et. al.*, 2009;



LOUGHEED *et al.*, 2009; YAJKO *et al.*, 1995), o *Mycobacteria Growth Indicator Tubes* e o E-test (FRANZBLAU *et al.*, 1998).

As técnicas de difusão em ágar e diluição em tubos, em geral, utilizam grandes quantidades de substâncias-teste limitando a sua utilização nos bioensaios relacionados a diversos produtos que possuam baixo rendimento (LANGFIELD *et al.*, 2004).

No entanto, a difusão em ágar é extremamente utilizada devido à sua facilidade de execução, reprodutibilidade e viabilidade de avaliação de diversas concentrações de substância-teste em uma mesma placa (MORAIS, 2006; NCCLS – M2 A8, 2003; NETO *et al.*, 2002; COWAN, 1999).

A aplicação do método de difusão em ágar limita-se a microrganismos de crescimento rápido aeróbios ou facultativos. A avaliação comparativa frente a um padrão biológico de referência e o halo de inibição de crescimento é feita pelo diâmetro do halo até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY & THORNSBERRY, 1991). O método de difusão em ágar é um bioensaio adequado para condução da avaliação da atividade antibacteriana, porém ineficiente na quantificação da bioatividade (ALVES, 2006).

O método BACTEC radiométrico tem a vantagem de ser mais rápido do que o método de proporções em ágar - resultados disponíveis de 5 a 10 dias - mas requer o uso de radioisótopos e é dispendioso; porém possibilita ainda a determinação da CIM (YAJKO *et al.*, 1995).

Métodos de diluição em meio líquido também são amplamente utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. A prova de sensibilidade por este método foi uma das primeiras a ser desenvolvidas,

servindo ainda hoje como método de referência (LANGFIELD, 2004; NCCLS – M7 A6, 2003).

Considerando que o tempo de execução é o principal fator limitante da aplicação do método das proporções em ágar, foi desenvolvido o ensaio em microplacas com Alamar Blue - corante oxi-redutor utilizado como um indicador de viabilidade celular. O violeta, composto não fluorescente, resazurina, é reduzido à rosa, resazurina fluorescente dentro do citoplasma de células viáveis e a fluorescência é diretamente proporcional ao número de células. No ensaio em microplacas com Alamar Blue (MABA), o uso de um indicador colorimétrico elimina a necessidade de leitura das placas por espectrofotometria e evita a ambigüidade associada à comparação visual ou medição dos halos de inibição de crescimento em placas de ágar (LANGFIELD *et al.*, 2004). Esse ensaio tem se demonstrado um método rápido e pouco dispendioso para a triagem de compostos com atividade tuberculostática (LOUGHEED *et al.*, 2009; MONTEJANO, 2005; PALOMINO *et al.*, 2002).

O uso do MABA cresce progressivamente e diversos autores o têm utilizado para a avaliação da atividade antimicobacteriana - com cepas H37Rv do *M. tuberculosis* – de novos compostos com potencial para uso terapêutico no tratamento da tuberculose (GUO *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2009; JAJU *et al.*, 2009; LILIENKAMPF *et al.*, 2009; LOUGHEED *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2007).

Uma versão do ensaio de MABA com composição, tempo de reação e temperatura modificados foi utilizada para comparação das CIM's de 30 agentes antibacterianos em cepas H37Ra e H37Rv de *M. tuberculosis* com o sistema BACTEC 460. A relação entre os resultados obtidos foi de cerca de

87% para a maioria dos compostos testados, demonstrando excelente correlação entre o método radiométrico e o colorimétrico (FRANZBLAU *et. al.*, 1998).

Yajko et al.(1995) compararam o MABA com o método de proporções em ágar utilizando, entre outros, o fármaco etambutol. Estes autores também encontraram estreitas relações entre os métodos para 98% das cepas de *M. tuberculosis* testadas.

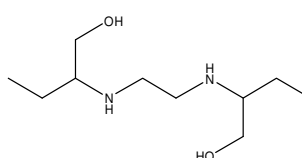
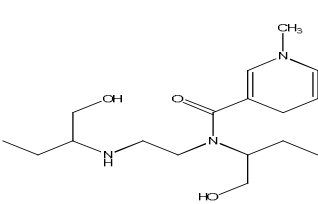
A comparação do MABA com outras técnicas, conforme acima descrito, permite-nos inferir que esta técnica apresenta vantagens em sua utilização devido à sua rapidez de execução e obtenção de resultados, pela sensibilidade, correlação com os métodos radiométrico e das proporções em ágar, baixo custo e com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), principalmente quando se trabalha com grande número de novos compostos, frente a micobactérias que são de crescimento lento (JAJU *et. al.*, 2009). Por estes motivos foi utilizado para determinar a atividade antibacteriana neste estudo.

No intuito de triagem e caracterização antibacteriana do derivado de etambutol foram realizados testes de determinação da atividade anti-*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pelo método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica e resazurina como revelador. Estes testes revelaram que o etambutol e DEREMB não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Seguindo as recomendações do National Institute of Allergy and Infectious Diseases e pelo National Institutes of Health (EUA), cada composto

foi avaliado frente ao *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, utilizando a técnica de *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA), determinando a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), disposta na Tabela 9 abaixo.

**Tabela 9.** Estruturas e valores de MIC ( $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ ) da atividade anti-*M. tuberculosis* do etambutol e seu derivado (DEREMB).

Composto	Estrutura	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC ( $\mu\text{M}$ )
Etambutol		4,0	19,6
DEREMB		31,25	96,1

O etambutol interferiu na atividade do *M. tuberculosis*, já que é um fármaco que apresenta um espectro específico, com atividade restrita a micobactérias, ou mesmo a apenas espécies de *Mycobacterium* (CHOPRA & BRENNAN, 1998). A CIM de  $4,0 \mu\text{g/mL}$  obtida para o etambutol encontra-se na inserida na faixa de CIM para o produto descrito na literatura (de 1 a  $5 \mu\text{g/ml}$ ) (COLL, 2003; HARDMAN & LIMBIRD, 2003; ZHANG *et. al.*, 2003).

A síntese proposta não gerou um pró-fármaco totalmente inativo visto que o DEREMB apresentou atividade, ainda que menor contra o *M. tuberculosis* quando comparada à atividade do etambutol (Tabela 9). Este fato é corroborado pelo conceito de latenciação, formação de produto inativo ou com menor atividade. Este resultado também foi previsto devido aos relatos de relação estrutura atividade que mostram que a substituição do nitrogênio do

etambutol leva à compostos com menor atividade biológica (LEMKE & WILLIAMS, 2008).

Adicionalmente, pode-se inferir que esta atividade pode ser devido ao aumento da permeabilidade celular como um resultado do aumento na lipofilicidade em conseqüência do processo de modificação molecular. Fato semelhante pode ser observado com o aumento da lipofilicidade de compostos antituberculose como isoniazida, tiacetazona e etambutol em reações de complexação (BOTTARI *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 1998).

### **6.3. Determinação de etambutol em plasma por HPLC**

O desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para a determinação do derivado e seu fármaco matriz em fluídos biológicos é essencial para a obtenção das informações farmacocinéticas que buscamos neste trabalho.

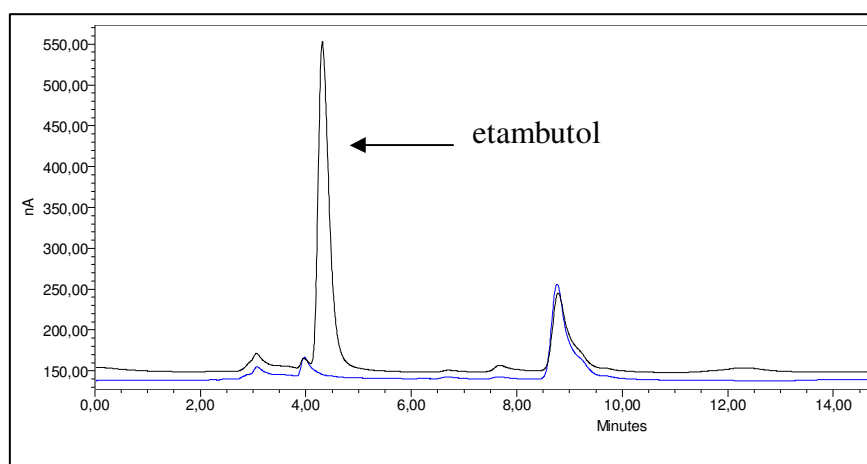
A determinação direta do etambutol por UV é insatisfatória devido à sua baixa absorvidade molar, de tal forma que se faz necessário o desenvolvimento de procedimentos pré-análise, tais como derivatização e complexação. Em contrapartida, os intermediários de síntese *O*-nicotinoiletambutol, 1-metil-3-carbamoil-etambutol e o derivado do etambutol 1-metil-diidropiridina-3-etambutol tendem a ser facilmente determinados diretamente por UV.

Vários métodos analíticos que utilizam técnicas cromatográficas foram propostos para determinar as concentrações de etambutol em diversas matrizes (JIANG *et al.*, 2002; RAGONESE *et al.*, 2002; CHENEVIER *et al.*, 1998; GAMBERINI & FERIOLI, 1988; LACROIX *et al.*, 1987) . Lacroix *et al.*

(1987) tentaram contornar as dificuldades de determinação do etambutol pela mensuração da absorvância em 270 nm do complexo EMB-sulfato de cobre. Contudo, esta técnica requer o uso de duas colunas analíticas e síntese do padrão interno. Gamberini & Ferioli (1988) propuseram o uso de derivatização química com feniletilisocianato e subsequente análise a uma absorvância de 254 nm, mas os resultados tiveram baixa sensibilidade. Chenevier et al.(1998) , também utilizaram a derivatização química com feniletilisocianato, aumentando a sensibilidade com uma detecção em UV a 200 nm com tempo de análise de 15 minutos. Este método foi testado em nosso laboratório e não encontramos reprodutibilidade e sensibilidade compatíveis com a finalidade analítica. A cromatografia por troca iônica através da formação do complexo catiônico  $\{[Cu_2EMB]^{2+}(SO_4)^{2-}\}$  em solução foi desenvolvida por Jiang et al. (2002). A complexação foi realizada em coluna após adição do sulfato de cobre adicionado na fase móvel e pH ajustado através da adição de ácido hidrocloreídrico diluído. Esta metodologia foi sugerida para aplicação no monitoramento de matéria-prima e controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Outros modos de detecção, tais como, espectrometria de massas e fluorescência também foram descritos para análise de EMB em fluidos biológicos. A respeito de procedimentos de eletroforese capilar, Ragonese *et. al.* (2002) propõem uso de um modelo Box-Behnken para otimização do sistema eletrolítico, que foi útil na separação de EMB com detecção em UV à 200 nm em 4 minutos. Contudo, apesar da importância, esta metodologia apresenta baixa sensibilidade, sendo necessário a presença de altas concentrações de etambutol na magnitude de  $10^3$  mg/l para obter sinal analítico satisfatório.

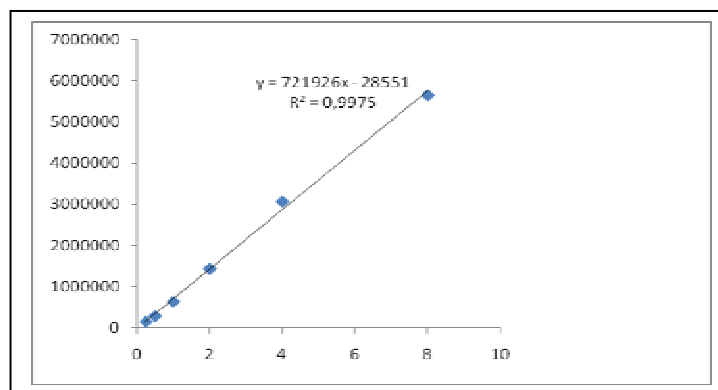
No presente trabalho foi desenvolvido um método bioanalítico para a determinação de etambutol por HPLC através da utilização de detector eletroquímico. Este método, inédito e ainda não publicado, foi idealizado com base nas características de óxido-redução do composto, que possibilita a detecção por este mecanismo com sensibilidade e especificidade adequadas à finalidade analítica.

A separação e detecção do etambutol no sistema cromatográfico proposto, no presente trabalho, resultaram nos cromatogramas demonstrados na Figura 6.



**Figura 6** – Cromatogramas branco e amostra adicionada de 8 ug/mL etambutol.

A curva de calibração em plasma de rato foi construída no intervalo de 0,5 – 8  $\mu\text{g/mL}$ , com coeficiente de correlação acima de 0,99, conforme demonstrado na figura 7. Este resultado foi considerado satisfatório para a continuidade do processo de validação do método.



**Figura 7** – Curva de calibração de etambutol em plasma.

O limite de detecção foi definido em 200 ng/mL (CV =18%) e o limite de quantificação em 500 ng/mL (CV =12,7%), valores aceitáveis para a aplicação do método no estudo da farmacocinética.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão intra-ensaio e inter-ensaios em plasma foram inferiores a 15%, conforme demonstrados na Tabela 10.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando os fármacos DEREMB, rifampicina e pirazinamida foram submetidos ao procedimento analítico empregado.



**Tabela 10** - Precisão e exatidão do método bioanalítico para etambutol em plasma.

Concentração adicionada	Intra-ensaio (n=5)		Inter-ensaio (n=15)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)
1 ug/ml	4,3	2,9	4,1	3,7
2,5 ug/ml	5,7	-2,1	5,1	-2,7
8 ug/ml	2,6	8,9	3,1	9,6

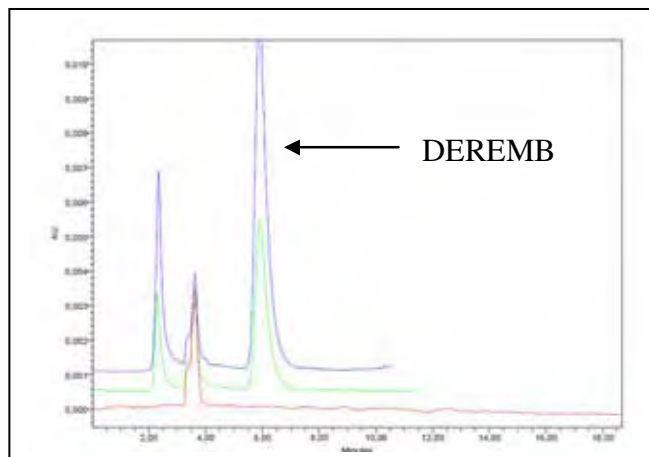
CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

A recuperação do método foi avaliada nas concentrações de 1;2 e 4 ug/mL e apresentaram valores de 106,9 %; 98,6% e 90,1 %, respectivamente.

#### **6.4. Determinação do pró-fármaco de etambutol em plasma por HPLC**

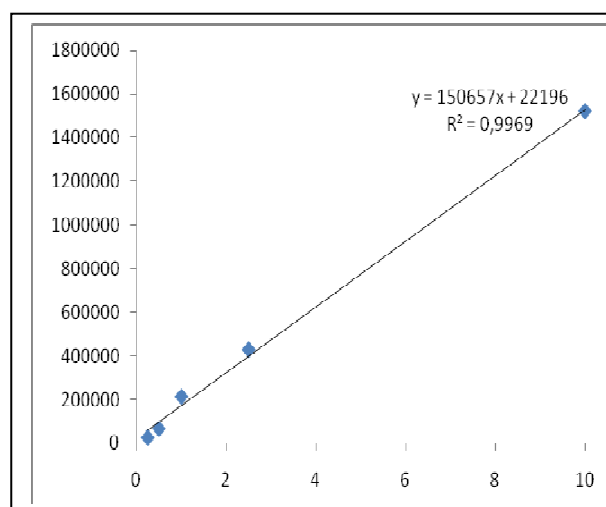
No presente trabalho foi desenvolvido um método bioanalítico para a determinação do DEREMB por HPLC através da utilização de detector ultravioleta. O comprimento de onda (256 nm) foi selecionado a partir da realização de varredura espectrofotométrica de uma solução de DEREMB na concentração de 10 ug/mL, observando-se a região de maior absorvidade e seletividade para o composto.

A separação e detecção do DEREMB no sistema cromatográfico proposto, no presente trabalho, resultaram nos cromatograma abaixo demonstrado (Figura 8).



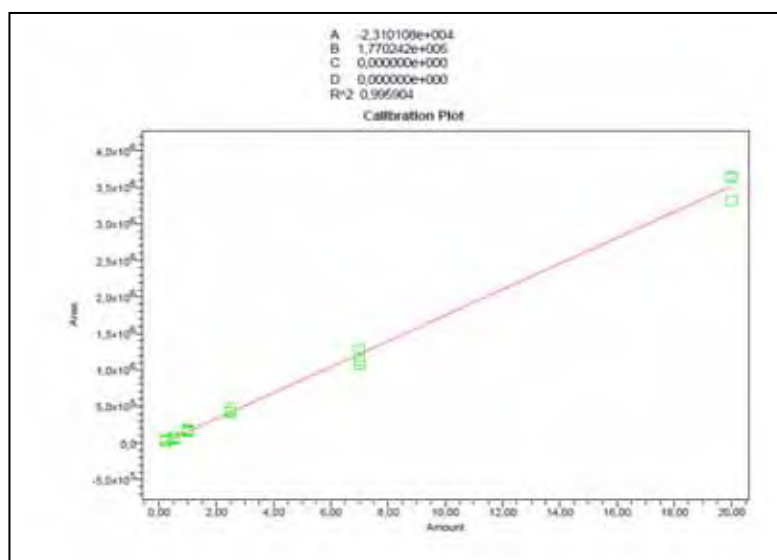
**Figura 8** – Cromatogramas branco (vermelho) e amostras de plasma adicionadas de 5 ug/mL(verde) e 10 ug/mL(azul) de DEREMB.

A curva de calibração em solução foi construída no intervalo de 0,5 – 10 µg/mL, mostrando resultados satisfatórios, com coeficiente de correlação acima de 0,99, conforme demonstrado na figura a seguir (Figura 9).



**Figura 9** – Curva de calibração do DEREMB em solução.

A curva de calibração em plasma foi construída no intervalo de 0,5 – 20 µg/mL, mostrando resultados satisfatórios, com coeficiente de correlação acima de 0,99, conforme demonstrado na figura a seguir (Figura 10).



**Figura 10.** Curva de calibração do DEREMB em plasma

O limite de detecção do método foi definido em 125 ng/mL (CV=16,7%) e o limite de quantificação em 250 ng/mL (12 %), valores aceitáveis para a sua aplicação no estudo de farmacocinética.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão intra-ensaio e inter-ensaios em plasma foram inferiores a 15%, conforme demonstrados na Tabela 11.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando os fármacos etambutol, rifampicina e pirazinamida foram submetidos ao procedimento analítico empregado.

**Tabela 11** - Precisão e exatidão do método bioanalítico para DEREMB em plasma.

Concentração adicionada	Intra-ensaio (n=5)		Inter-ensaio (n=15)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)
<b>Solução</b>				
1 ug/ml	10,0	7,3	9,7	7,5
2,5 ug/ml	6,0	8,2	7,7	12,3
8 ug/ml	8,7	-0,63	5,0	-1,3
<b>Plasma</b>				
1 ug/ml	10,4	0,7	10,4	5,4
2,5 ug/ml	8,3	2,5	12,3	2,7
8 ug/ml	5,1	- 7,0	6,6	- 4,7

CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

A recuperação do método para análise em plasma foi avaliada nas concentrações de 1; 2,5 e 8 ug/mL e apresentaram valores de 100,7 %; 106,3% e 101,2 %, respectivamente.

### 6.5. Estabilidade *in vitro* e *ex vivo* do pró-fármaco de etambutol

O aumento da lipossolubilidade de um composto, conforme descrito anteriormente, expressa modificações em sua capacidade de penetração através das barreiras biológicas, sendo esta característica o principal objetivo do pró-fármaco proposto. No entanto, esta maior lipossolubilidade também pode acarretar maior susceptibilidade deste composto às reações metabólicas oxidativas mediadas pelo complexo enzimático do CYP450 assim como às

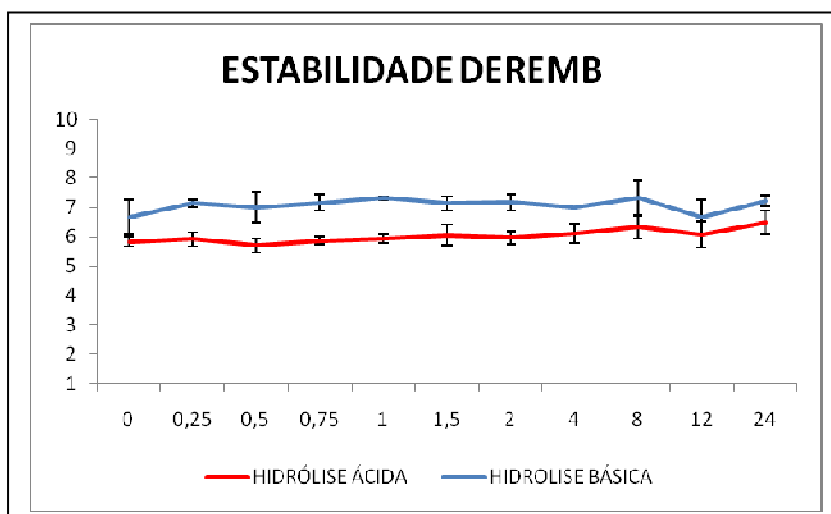
reações de hidrólise, com conseqüente ocorrência de decomposição do produto antes de sua disponibilização no sistema biológico. Assim, a estabilidade de novas moléculas deve ser investigada em estágio anterior à administração em modelos animais, de tal forma a garantir que o produto esteja intacto para que ocorra a sua absorção.

No presente trabalho foram executados ensaios de estabilidade *in vitro* – em soluções tamponadas em dois diferentes pHs - *ex vivo* com o objetivo de avaliar a susceptibilidade do composto sintetizado às reações de hidrólise química e decomposição por hidrólise mediada por enzimas plasmáticas.

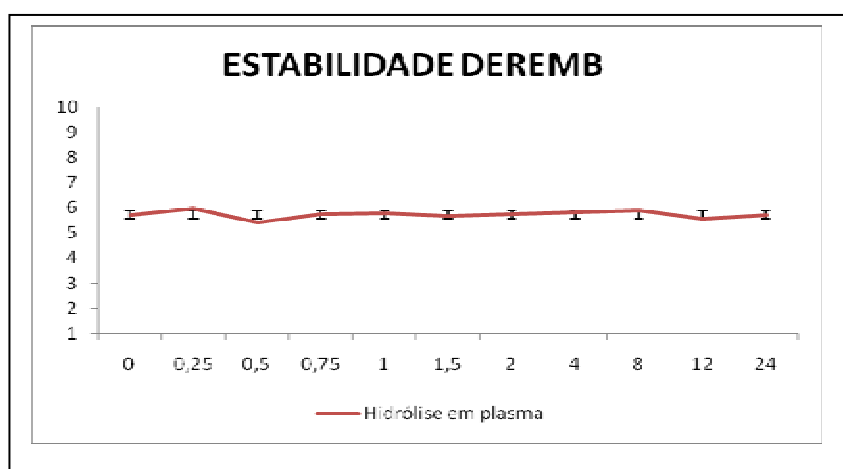
Os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise em diferentes pHs (1,2 e 7,4) e na submissão à ação de enzimas plasmáticas (Figuras 11 e 12) permitem observar estabilidade do produto no período de 24 horas, tempo suficiente para a sua passagem pelo trato digestório e introdução na circulação sistêmica. Estes resultados foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação ponderado, que apresentaram valores 4,84% e 7,04% para hidrólise ácida e básica, respectivamente e 5,4% em plasma.

É possível que estes resultados estejam relacionados ao fato do DEREMB ser um derivado amídico. Simões e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade de derivados ésteres e amidas de pirazinamida e verificaram que, embora os derivados amidas possuam menor atividade, apresentam maior estabilidade quando comparados aos derivados ésteres e ao eu fármaco matriz.

Diante destes resultados é possível inferir que o composto não sofrerá hidrólise química em meio ácido ou básico ou por enzimas presentes no plasma, abrindo perspectiva de sua administração por via oral.



**Figura 11** . Hidrólise do pró-fármaco de etambutol (6ug/mL) em solução tampão pH 1.2 e 7.4 (dados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n = 11$ , CV = 4,84% e 7,04%, respectivamente).

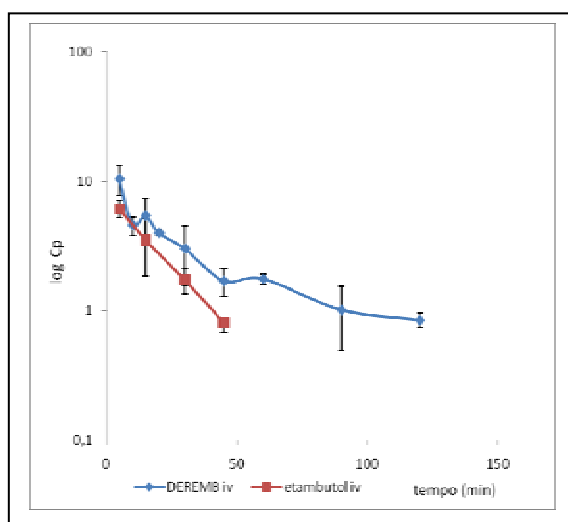


**Figura 12.** Hidrólise do pró-fármaco de etambutol (10ug/mL) em plasma humano (dados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n = 11$ , CV=5,4%).

## 6.6. Farmacocinética pré-clínica do pró-fármaco de etambutol

A disposição cinética do DEREMB foi avaliada após a administração intravenosa de 25mg/Kg e via gavagem de 100 mg/kg.

Os parâmetros farmacocinéticos do DEREMB e etambutol administrados pela via intravenosa foram calculados com base na curva concentração plasmática *versus* tempo abaixo demonstrada (Figura 13).



**Figura 13.** Perfil farmacocinético do pró-fármaco de etambutol e do etambutol administrados por via endovenosa (25 mg/kg; n=20). Dados apresentados como média (IC95).

Os parâmetros farmacocinéticos do DEREMB e do etambutol estão apresentados na Tabela 12 como média e intervalo de confiança 95% (IC95).

O valor de ASC0-t, para os dois produtos, corresponde a cerca de 85% da ASC0-INF, caracterizando que o tempo de coleta foi suficiente para o cálculo adequado dos parâmetros farmacocinéticos.

**Tabela 12.** Parâmetros farmacocinéticos do DEREMB e do etambutol administrados por via endovenosa na dose de 25mg/kg (n=20). Resultados apresentados como mediana, média (IC95).

PARÂMETRO	DEREMB	ETAMBUTOL
$C_{max}$ (ug/mL)	8,7 10,4 (6,7 – 14,2)	6,2 6,1 (5,3-7,0)
$AUC^{0-t}$ (ug/mL.min)	261,2 252,7 (200,8 – 292,9)	110,0 * 116,3 (95,3-137,3)
$AUC^{0-\infty}$ (ug/mL.min)	296,6 294,3 (256,7 – 331,9)	130,5 * 133,4 (112,6-154,3)
Vd (L/kg)	4,7 4,3 (3,1 – 4,9)	3,6 3,4 (2,8 – 4,1)
$Cl_T$ (mL/min/kg)	84,3 86,4 (72,3 -99,9)	201,1 * 198,1 (169,4 -226,8)
$t_{1/2}$ (min)	33,0 34,1 (28,5 – 39,6)	11,6 * 11,3 (10,1 -12,6)
$\beta$ ( $min^{-1}$ )	0,021 0,021 (0,0180 – 0,025)	0,06 * 0,062 (0,055 – 0,068)

A obtenção destes parâmetros farmacocinéticos preliminares do produto permite-nos discutir algumas questões relacionadas ao seu comportamento no sistema biológico e compará-las ao fármaco de partida..

*Clearance* (ou depuração) é um termo utilizado para indicar a remoção completa e irreversível do fármaco de um volume específico de fluido biológico por unidade de tempo. Assim, o *clearance* é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h) e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo. A biotransformação hepática somada à excreção renal e outras vias de excreção de um fármaco constituem a depuração sistêmica total ou *clearance* total (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).



Basicamente dois fatores fisiológicos interferem significativamente na capacidade de Cl: a perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca deste órgão para efetivar a eliminação do fármaco. Assim, o *clearance* é o produto do fluxo sanguíneo(Q) e da taxa de extração (E); e pode ser calculado a partir da equação:

$$Cl = Q \times E$$

onde E é o valor numérico entre 0 e 1 que pode ser considerado como a porcentagem do fármaco (de 0 a 100%) eliminado durante uma única passagem pelo órgão eliminador e Q é o fluxo sanguíneo (TOUTAIN & MÉLOU, 2004).

A perfusão sanguínea está intimamente ligada ao débito cardíaco - quantidade de sangue bombeada pelo coração em litros/minuto – que se expressa pela relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca, fatores intimamente relacionados às características anatômicas e funcionais de um organismo.

O débito cardíaco pode ser o fator limitante ao Cl e, em condições fisiológicas ideais de eliminação, o valor numérico máximo de Cl será aproximadamente o valor do débito cardíaco (TOUTAIN & MÉLOU, 2004).

As condições fisiológicas ideais de eliminação a que nos referimos é aquela em que a primeira passagem do fármaco pelo órgão eliminador resulta em sua completa remoção do organismo.

O cálculo do débito cardíaco pode ser realizado através da equação:

$$\text{Débito cardíaco (mL/min/kg)} = 180 \times \text{massa corpórea}^{-0,19}$$

Assim, a interpretação fisiológica do valor numérico de *clearance* deve considerar como referência o sistema biológico em questão uma vez que o

fluxo sanguíneo local e da taxa de extração do fármaco naquele órgão é essencialmente uma característica anatômica e funcional de cada organismo, além de relacionar-se às características físico-químicas do fármaco (TOUTAIN & MÉLOU, 2004).

Por exemplo, para um homem adulto de 70 kg, calculando-se o débito cardíaco (DC):

$$DC \text{ (mL/min/kg)} = 180 \times \text{massa corpórea}^{-0,19} \rightarrow DC = 180 \times 70^{-0,19}$$

$$DC \text{ (mL/min/kg)} \cong 80,3$$

Isto que significa que valores de CI próximos a 80 mL/min/kg são considerados extremos, no homem de 70 kg, para a eliminação de um fármaco de alta extração; no entanto, para um rato de peso médio de 0,2 kg:

$$DC \text{ (mL/min/kg)} = 180 \times \text{massa corpórea}^{-0,19} \rightarrow DC = 180 \times 0,2^{-0,19}$$

$$DC \text{ (mL/min/kg)} \cong 244$$

Então, o valor máximo de CI para um fármaco de alta extração pelo órgão eliminador, para um rato de 200 g, é de 244 ml/min/kg.

O valor de *clearance* obtido para o pró-fármaco de etambutol administrado foi de 84,3 mL/min/kg, inferior ao *clearance* apresentado pelo etambutol no mesmo modelo animal (209,9 mL/min/kg). Pode-se observar que o *clearance* do etambutol é muito próximo ao valor do débito cardíaco deste animal, o que significa alta extração do produto da circulação sanguínea; já o *clearance* observado para o pró-fármaco de etambutol expressa menor capacidade de extração (cerca de 1/3 do débito cardíaco).

Esta característica de menor velocidade de eliminação do pró-fármaco pode ser explicada pela menor hidrossolubilidade do composto quando comparada ao seu fármaco de partida (etambutol) e a necessidade de

biotransformação para que a eliminação ocorra; em contraste com a eliminação do etambutol, onde até cerca de 70% do fármaco é eliminado inalterado na urina em um período de 24 horas.

A extrapolação alométrica, através da escala interespecífica, tem sido frequentemente utilizada para prever os parâmetros farmacocinéticos em humanos a partir de estudos realizados em animais durante a fase de desenvolvimento de um produto (SHARMA & McNEILL, 2009; MAHMOOD, 2004).

Considerando que o *clearance* é um dos parâmetros mais importantes em farmacocinética, tem sido investigada uma série de modelos matemáticos para melhorar a relação entre os valores de *clearance* obtidos nos estudos pré-clínicos e os obtidos nos estudos com humanos (MAHMOOD, 2004). Entre os métodos propostos está a extrapolação simples, através da qual se pode estimar o valor de *clearance* em humanos pela equação alométrica:

$$Cl = a (W)^b$$

onde *W* é o peso corpóreo, **a** é o valor de *Cl* no modelo experimental ( em peso absoluto do animal) e **b** é o expoente encontrado na escala alométrica interespecífica.

Esta relação fundamenta-se no fato de que o tamanho de um organismo, geralmente caracterizado pela massa corporal, afeta a maioria dos parâmetros biológicos (BARBOSA, 2007).

Assim, o parâmetro farmacocinético *clearance* calculado por esta equação, está relacionado à massa corporal e ao expoente alométrico caracterizado pelas relações já construídas entre o tamanho corporal e a taxa metabólica.

O expoente alométrico tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas áreas de biologia e física com o propósito de encontrar a relação mais precisa entre o tamanho corporal e as diferenças metabólicas interespecíficas (BARBOSA, 2007).

Barbosa (2007) propõe, com base nestas pesquisas já realizadas, o valor de 0,714 para o expoente alométrico (**b**).

Assumindo o valor de 0,714 para **b**, extrapolamos o valor de *clearance* do pró-fármaco de etambutol obtido em ratos wistar para humanos da seguinte forma:

$$Cl = a (W)^b \rightarrow Cl (\text{ml/min}) = 16,82 \times 70^{0,714} \rightarrow Cl(\text{ml/min}) = 349,3$$

Neste cálculo, consideramos o peso de 70 kg para humanos e 200 g de peso para o rato wistar. Assim, o valor de *clearance* em um indivíduo de 70 kg será de 4,99 mL/min/kg .

O *clearance* do etambutol em humanos é estimado em 9 mL/min/Kg (HARDMAN & LIMBIRD, 2003) e, assim, o *clearance* estimado do DEREMB em humanos corresponde a aproximadamente 50% do *clearance* do etambutol.

É importante ressaltar que, além do débito cardíaco, o *clearance* é um parâmetro dependente da capacidade de excreção do fármaco inalterado – principalmente efetuada pelo sistema renal – e da capacidade metabólica do tecido hepático.

De maneira geral, os fármacos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo predominante de eliminação em: fármacos de eliminação renal,

fármacos de eliminação renal e não-renal e fármacos de eliminação não-renal (PECCININI,2010).

Os fármacos de eliminação não renal têm sua excreção dependente principalmente da metabolização hepática e, neste caso, o *clearance* depende essencialmente do fluxo sanguíneo hepático e da atividade enzimática neste local.

As características de solubilidade e o log P obtido para o pró-fármaco de etambutol sugerem que este produto é de eliminação não renal; contrapondo às características do etambutol, fármaco de eliminação essencialmente renal. No entanto, a determinação do *clearance* renal, feita através da determinação do produto inalterado excretado na urina, deve ser objeto de pesquisa futura para confirmar a hipótese de eliminação não renal.

O volume de distribuição (Vd) de um fármaco descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma e conceitualmente se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale a do plasma (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Quando Vd é pequeno, a captação pelos tecidos é limitada; por outro lado, grandes valores de Vd indicam uma ampla distribuição para os tecidos. Dependendo do grau de ligação às proteínas plasmáticas e aos tecidos, o Vd de um fármaco no homem pode variar de 0,04L/kg até 20L/kg ou mais.

O padrão de distribuição de um fármaco no organismo depende de suas propriedades físico-químicas e dos padrões fisiológicos do organismo em que se encontram. Assim, a distribuição de fármacos sofre influência de fatores tais como: perfusão sanguínea, extensão de ligação às proteínas plasmáticas,

características físico-químicas do produto, grau e extensão de penetração através das membranas e barreiras biológicas e extensão de eliminação.

Como citado anteriormente, o fluxo sanguíneo, ou perfusão sanguínea é função direta do débito cardíaco, que tem conseqüências diretas sobre a velocidade e extensão do transporte de substâncias nas diferentes regiões do organismo.

O volume de distribuição para o pró-fármaco de etambutol obtido após administração endovenosa em dose única foi de 860 mL. Considerando que um rato de 200 g possui um volume aproximado de 14 mL de sangue (CUBAS, 2007), este alto valor de  $V_d$  sugere que há acúmulo extravascular do produto. Não houve diferença estatística significativa entre os valores de  $V_d$  do pró-fármaco e etambutol e, embora esta não fosse a expectativa, o perfil de apresentado pelo etambutol sugere também alta distribuição.

É importante ressaltar que, apesar de um alto volume de distribuição sugerir a possibilidade de penetração do produto no sistema nervoso central, este parâmetro é calculado a partir das concentrações plasmáticas e, assim, não fornece informações com relação aos seus locais de penetração. Somente a determinação do pró-fármaco e do etambutol no tecido encefálico revelará se houve penetração neste compartimento e apontará possíveis diferenças de distribuição entre os compostos.

Os valores de  $V_d$  para um determinado fármaco diferem em função da idade, gênero, espécie e proporção água:gordura. Estas diferenças na composição corpórea possuem grande impacto sobre a distribuição de fármacos.

A extrapolação alométrica para este parâmetro exige a inclusão de vários fatores interferentes interespecíficos – como proporção água:lipídeo corpórea – de tal forma a tornar o método de extrapolação aplicado anteriormente para cálculo de *clearance* inadequado e impreciso (SHARMA & McNEILL, 2009).

A ligação de fármacos às proteínas plasmáticas influencia significativamente sua distribuição no organismo, uma vez que esta ligação forma um complexo de peso molecular suficientemente grande para impedir a passagem do fármaco para outros locais, fazendo com que somente a porção não ligada às proteínas seja distribuída amplamente. Para fármacos que se ligam extensivamente a proteínas plasmáticas, e não a constituintes teciduais, os valores de  $V_d$  se aproximam aos volumes plasmáticos. Considerando que o valor de  $V_d$  para o pró-fármaco é alto, é provável que a sua ligação às proteínas plasmáticas seja de pequena proporção. No entanto, somente a determinação da fração livre e ligada do produto em amostras de sangue pode elucidar devidamente esta hipótese.

A meia vida de eliminação obtida para o pró-fármaco foi de 33 minutos, estatisticamente diferente do seu fármaco de partida (11,6 minutos).

Este parâmetro farmacocinético é útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto tempo será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio, para prever quanto tempo será necessário para que uma dada concentração decline a outra concentração específica uma vez que não seja administrada nova dose ou para determinar o

tempo necessário para que o fármaco seja eliminado do organismo (BJORNSSON,1997)

É importante compreender a diferença entre clearance e meia vida de eliminação. O clearance expressa a capacidade do organismo de eliminar o fármaco e a meia vida expressa a taxa total de eliminação do fármaco na fase terminal da curva de concentração plasmática *versus* tempo; e este processo envolve tanto o clearance quanto a extensão de distribuição. Assim, é possível inferir que a meia vida é um parâmetro híbrido do clearance e do volume de distribuição.

Assim, uma meia vida de eliminação longa pode estar associada a um grande volume de distribuição (Vd) ou relacionada a um clearance baixo; no caso do DEREMB, o clearance mais baixo determina maior meia vida do produto em relação ao etambutol.

O impacto do Vd sobre a meia vida pode ser explicado pelo fato de que durante a fase terminal da curva de concentração plasmática *versus* tempo, para o fármaco ser eliminado, ele deve estar disponível para os órgãos responsáveis pela sua degradação, que em geral, estão contidos no compartimento central. Se o fármaco ficar retido no compartimento periférico – ou de difícil acesso - o processo de clearance será dificultado e a meia vida será longa (PECCININI,2010).

Assim, a meia vida é um parâmetro dependente, em contraste com clearance e Vd, que são independentes porque têm bases fisiológicas primárias e não são combinações de outros parâmetros farmacocinéticos. Por ser um parâmetro híbrido, a meia vida é uma ferramenta menos sensível para avaliar a influência de fatores fisiológicos (variações interespecíficas, idade,



sexo, etc.) ou patológicos (insuficiências renal e hepática, etc.) na disposição cinética.

Foram determinadas as concentrações plasmáticas de etambutol, pelo método HPLC/eletroquímico, após administração do DEREMB pela via endovenosa, nas mesmas amostras em que foram determinadas as concentrações plasmáticas do pró-fármaco. Estas determinações resultaram em níveis detectáveis de etambutol apenas nos 30 minutos iniciais, com valores médios de 0,75 ug/mL ; 1,22 ug/mL e 1,5 ug/mL nos tempos 5, 15 e 30 minutos após a administração, respectivamente. A partir de 45 minutos as concentrações plasmáticas atingiram níveis abaixo do limite de quantificação do método analítico desenvolvido. Assim, não foi possível calcular qualquer parâmetro farmacocinético para o etambutol produzido a partir do DEREMB. Este resultado sugere que o produto não libera significativamente o etambutol na circulação sanguínea após administração endovenosa, o que é adequado ao objetivo proposto, uma vez que a expectativa é que esta liberação ocorra no sistema nervoso central.

A administração do DEREMB pela via oral (gavagem/100 mg/kg) resultou em concentrações plasmáticas extremamente baixas, sendo detectadas apenas no tempo de 30 minutos após a administração, no valor médio de 1,6 ug/mL (cv= 22%; n=5). Este resultado sugere que ou a absorção por esta via é pequena ou que o produto sofre substancial metabolismo de primeira passagem. Em ambos os casos, consideramos que a administração por esta via, mesmo na dose de 100 mg/kg, é insuficiente para atingir níveis plasmáticos clinicamente significantes.

É importante ressaltar que, no entanto, o produto foi planejado para o tratamento da meningite tuberculosa, geralmente realizado em ambiente hospitalar, possibilitando a utilização da via endovenosa para a administração de agentes terapêuticos.

Desta forma, consideramos pertinente a continuidade dos estudos com o pró-fármaco na expectativa de sua utilidade terapêutica.

A avaliação dos níveis de etambutol liberados no SNC a partir da administração endovenosa do DEREMB constitui prioridade em um novo projeto de pesquisa, assim como a realização de ensaios de toxicidade em dose única e doses múltiplas, que fornecerão informações fundamentais para a avaliação do risco vs benefício do produto.

## 7. Conclusões

- O pró-fármaco, obtido através de múltiplas etapas reacionais, foi sintetizado e caracterizado por métodos analíticos;
- O log P dos compostos calculados usando o programa ChemDraw Ultra 8.0 mostrou que o pró-fármaco (DEREMB) apresenta log P maior que o etambutol;
- Os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise em diferentes pHs (1,2 e 7,4) e na submissão à ação de enzimas plasmáticas permitem observar estabilidade do produto no período de 24 horas;
- O pró-fármaco de etambutol apresentou atividade antimicobacteriana (MIC = 31,25µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294;
- O perfil farmacocinético do DEREMB revela alto volume de distribuição, característico de substâncias lipofílicas com possibilidade de ingresso no sistema nervoso central.

## 8. Referências Bibliográficas

1. ALVES, E. G. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia fallax***. Estudo comparativo de quatro técnicas de “screening”. Franca, 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Biológica) Universidade de Franca.
2. BANKER & RHODES – **Modern Pharmaceutics**. 4<sup>th</sup> ed., New York:Marcel Dekker Inc., 2002.
3. BARBOSA, L. A. **Lei de escala alométricas para as taxas metabólicas interespecíficas e para cadeias alimentares**.Belo Horizonte, 2007. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Minas Gerais.
4. BARRY, C.E. New horizons in the treatment of tuberculosis. **Biochem. Pharmacol.**, London, v. 54, p. 1165-1172, 1997.
5. BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY. H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: **Am. Soc. Microbiol**, p. 1117-1125,1991.
6. BELANGER, A. E.; BESRA, G. S.; FORD, M. E.; MIKUSOVA, K.; BELISLE, J. T.; BRENNAN, P. J.; INAMINE, J. M. The embAB genes of *Micobacterium avium* encode na arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that the is the target for the antimicobacterial drug ethambutol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 93, p. 11919-11924, 1996.
7. BHIGJEE, A. I.; PADAYACHEE, R.; PARUK, H.; HALLWIRTH-PILLAY, K. D.; MARAIS, S.; CONNOLY, C. Diagnosis of tuberculous meningitis: clinical and laboratory parameters. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 348-354, 2007.
8. BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and

- simulations. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.
9. BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, Washington, v. 257, p. 1055-64, 1992.
10. BOBROWITZ, I. D. Ethambutol in Tuberculous Meningitis. **Chest**, v. 61, n. 7, p. 629-632, 1972.
11. BODOR, N.; ABDELALIM, A. M. Improved delivery through biological membranes XIX: Novel redox carrier for brain-specific chemical delivery systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 74, n. 3, p. 241-245, 1985.
12. BODOR, N.; ABDELALIM, A. M. Improved delivery through biological membranes XX: Nicotinamide = diidronicotinamide based ester-linked redox carrier systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 75, n. 1, 1986.
13. BODOR, N., FARAG, H. H. Improved delivery through biological membranes. 13. Brain – Specific delivery of dopamine with a dihydropyridine-pyridinium salt type redox delivery system. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 26, n. 4, p. 528 – 535, 1982.
14. BODOR, N.; BREWSTER, M.E. Problems of delivery of drugs to the brain. **Pharmacol. Ther.**, v. 19, p. 337–386, 1983.
15. BODOR, N.; BUCHWALD, P. Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, n. 36, p. 229-254, 1999.
16. BODOR, N., HUANG, M. J. Predicting partition coefficients for isomeric diastereoisomers of some tripeptide analogs. **J. Comput. Chem.**, n.12, 1182–1186, 1991.
17. BOGATCHEVA, E.; HANRAHAN, C.; CHEN, P.; GEARHART, J.; SACKSTEDER, K.; EINNK, L. NACY, C.; PROTOPOPOVA, M. Discovery of piperidines as new antitubercular agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, n. 20, p. 201-205, 2010.
18. BOTTARI, B.; MACCARI, R.; MONFORTE, F.; OTTANÀ, R.; ROTONDO, E.; VIGORITA, M.G. Isoniazid-related copper(II) and

- nickel(II) complexes with antimycobacterial *in vitro* activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v.10, n.7, p. 657–660, 2000.
19. BOUTOTTE, J. TB the second time around...and how you can help to control it. **Nursing**, Jenkingtown, v. 23, n. 5, p. 42-50, 1993.
20. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária- CENEPI-FNS. **Manual de normas para o controle da tuberculose**. Brasília - D. F., 1995. 30 p.
21. BREWSTER, M. E.; POP, E.; BRAUNISTEIN, A. J.; POP, A. C.; DRUZGALA, P.; DINCULESCU, A.; ANDERSON, W.; ELKOUSSI, A.; BODOR, N. The effect of dihydronicotinato N-substitution on the brain-targeting efficacy of zidovudine chemical delivery system. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 9, 1357-1363, 1993.
22. BUNDGAARD, H. Ed. **Desing of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 360 p.
23. BUNDGAARD, H. Novel approaches in prodrug desing, **Drugs Fut.**, Barcelona, v. 5, p. 651-73, 1992.
24. CANDÉA, A. L.; FERREIRA, M. DE L.; PAIS, K. C.; CARDOSO, L. N.; KAISER, C. R.; HENRIQUES, M. G.; LOURENÇO, M. C.; BEZERRA F. A.; DE SOUZA, M. V. Synthesis and antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinylnhydrazones derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, n. 22, p. 6272-6274, 2009.
25. CHAN, R. Y. C.; KWOK, A. K. H. Ocular toxicity of ethambutol. **Hong Kong Med. J.**, v. 12, p. 56-60, 2006.
26. CHENEVIER, P.; MASSIAS, L.; GUEYLARD, D.; FARINOTTI, R. Determination of ethambutol in plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. **J. Chromatogr. B**, v. 708, p. 310-315, 1998.
27. CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-oxygen-recovery assay for hight-throughput screening of compounds against noreplication *Micobacterium*

- tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1380-1385, 2007.
28. CHOPRA, I; BRENAN,P. Molecular action of anti-mycobacterial agents. **Tuberc Lung Dis.** 78(2):89-98, 1997.
29. CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 22, n. 1,1999.
30. CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. de A.; CASTRO, L. F.; GÜIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. de Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, 2005.
31. COLLINS, L.; FRANZBLAU, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.
32. COLL, P. Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.**, v. 21, n. 6, p. 299-308, 2003.
33. II CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE - diretrizes brasileiras para tuberculose, 2004. **J. Br. de Pneum.**, v. 30, 2004.
34. COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564 – 82, 1999.
35. CROIZET, F., LANGLOIS, M.H. DUBOST, J. P.; BRAQUET, P. ; AUDRY, E. ; DALLET, PH. ; COLLETER, J.C. Lipophilicity force field profile: An expressive visualization of the lipophilicity molecular potential gradient. **J. Molec. Graph.** V. 8, n. 3, p. 153 – 155, 1990.
36. CUBAS,ZS;SILVA,JCR;CATÃO-DIAS,JL.Tratado de animais selvagens. São Paulo: Ed. Roca Ltda,2007.1376 p.
37. DENG, L.; MYKUSOV, K.; ROBUCK, G. K.; SCHERMAN, M.; BRENNAN, P. J.; McNeil, M. R. Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n, 39, p. 694-701, 1995.

38. DEARDEN, J. C. Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships. **Environ. Health Perspect.**, v. 61, p. 203 – 228, 1985.
39. DEVIENNE., K. F; RADDI, M. S. Screening for microbial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbial.**, v. 33, p. 166 – 168, 2002.
40. ELOFF, J.N. A. Proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts—a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **S. Afr. J. Sci.**, p. 116–118, 2000..
41. ELOFF., J. N. A. Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, p. 711-13, 1998.
42. ETHAMBUTOL. Tuberculosis, v. 86, n. 2, p. 102-105, 2008. Disponível em: [http:// intel.elsevierhealth.com/journals/tube](http://intel.elsevierhealth.com/journals/tube). Acesso em: 7 jan de 2010.
43. EYAL, S.; HSIAO, P.; UNADKAT, J. D. Drug interactions at the blood-brain barrier: Fact or fantasy? **Pharmacology & Therapeutics**,( In Press), 2009.
44. FIORAVANTI, C.; HOCKSTEIN, E. Árduos avanços: persistência da pobreza amplia incertezas das pesquisas de medicamentos e tratamentos contra tuberculose. **Rev. Pesquisa FAPESP**, n. 167, p.48-51, 2010.
45. FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MANDICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUNSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 362-366, 1998.
46. GAMBERINI, G.; FERIOLI, V. Determination of optical purity by high-performance liquid chromatography of compounds of pharmaceutical interest. **Farm. Ed. Prat.**, v. 11, n.43, p. 357-63, 1988.



47. GARCIA-MONCO, J. C. Central nervous system tuberculosis. **Neurol. Clin.**, v. 17, p. 737-759, 1999.
48. GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. **J. Phys. Chem. A.**, v. 21, n. 102, p. 3762 - 3772, 1998.
49. GOLDMAN, R. C.; LAUGHON, B. E. Discovery and validation of new antitubercular compounds as potential drugs leads and probes. *Tuberculosis*, n. 89, p. 331-333, 2009.
50. GUILLET, V.; CHEVROLLIER, A.; CASSEREAU, J.; LETORNEL, F. ; GUEGUEN, N. ; RICHARD, L. ; DESQUIRET, V. ; VERNY, C. ; PROCACCIO, V. ; AMATI-BONNEAU, P. ; REYNIER, P. ; BONNEAU, D. Ethambutol- induced optic neuropathy linked to OPA1 mutation and mitochondrial toxicity. **Mitochondrion**, (In Press), 2009.
51. GUO, S.; SONG, Y.; HUANG, Q.; YUAN, H. ; WAN, B. ; WANG, Y.; HE, R.; BECONI, M. G.; FRANZBLAU, S. G.; KOZIKOWSKI, A. P. Identification, synthesis, and pharmacological evaluation of tetrahydroindazole based ligands as novel antituberculosis agents. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 2, p. 649-659, 2010.
52. HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.) **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. cap. 48, p. 960.
53. HENG, J. E.; VORWERK, C. K.; LESSELL, E.; ZURAKOWSKI, D.; LEVIN, L. A.; DREYER, E. B. Ethambutol is toxic to retinal ganglion cells via an excitotoxic pathway. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 1190-1196, 1999.
54. HIJJAR, M. A.; OLIVEIRA, M.J.P.; TEIXEIRA, G.M. A Tuberculose no Brasil e no Mundo. **Bol. Pneumol. Sanit.**, v. 9, n. 2, p. 10-16, 2001.
55. HOPEWELL, P. C. Overview of clinical tuberculosis. In: BLOOM, B. R. (Ed.). **Tuberculosis pathogenesis, protection, and control**. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 25-46, 1994.
56. HUANG, Q., MAO, J.; WAN, B.; WANG, Y.; BRUN, R.; FRANZBLAU, S. G.; KOZIKOWSKI, A. P. Searching for new cures for

- tuberculosis: design, synthesis, and biological evaluation of 2-methylbenzothiazoles. **J. Med. Chem.**, n. 52, p. 6757-6767, 2009.
57. IMRAMOVSKY, A.; VINSOVÁ, J.; FÉRRIZ, J. M.; DOLEZAL, R.; JAMPÍLEK, J. New antitubercotics originated from salicylanilides with promising in vitro activity against atypical mycobacterial strains. **Biiorg. Med. Chem.**, n. 17, p. 3572-3579, 2009.
58. JAJU, S.; PALKAR, M.; VEERESH, M.; RONAD, P.; MAMLEDESAI, S.; SATYANAYANA, D.; GHATOLE, M. Synthesis and antimycobacterial activity of a novel series of isonicotinylhydrazina derivatives. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, n. 342, p. 723-731, 2009.
59. JIANG, Z.; WANG, H.; LOCKE, D. C. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. **Analy. Chim. Act.**, n. 456, p. 189-192, 2002.
60. JONES, R. N.; VARNAM, D. J. Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against gram-negative bacilli resistant to ceftazidime: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 44, n. 4, p. 379-382, 2002.
61. KATTI, M. K. Pathogenesis, diagnosis, treatment, and outcome aspects of cerebral tuberculosis. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, n. 9, p. 215-229, 2004.
62. KOO, K. H.; DOUGLAS, E.; AZADI, P.; INAMINE, J. M.; BESRA, G. S.; MIKUSOVA, K.; BRENNAN, P. J. CHATTERJEE, D. Truncadet structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smismatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. **J. Biol. Chem.**, n. 271, p. 28682-28690, 1996.
63. KLOPMAN, G.; ZHU, H. Recent methodologies for the estimation of n-octanol/water partition coefficients and their use in the prediction of membrane transport properties of drugs. **Mini Rev. Med. Chem.** Feb;5(2):127-33,2005.

64. KOROLKOVAS, A. Antiinfeciosos. In: - **Dicionário terapêutico guanabara 2001/2002**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 18- 26.
65. LACROIX, C.; CERUTTI, F.; NOUVEAU, J.; MENAGER, S.; LAFONT, O. Determination of plasma ethambutol with liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. **J. Chromatogr.**, v. 1, n. 415, p. 85-94, 1987.
66. LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 279-281, 2004.
67. LEE, C. S., BENET, L. Z. (Univ. Florida, Gainesville, FL - USA). Ethambutol Hydrochloride. **Anal. Prof. Drug Subst.**, 1978, 7, 231-249.
68. LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. (Ed.). **Foye's medicinal chemistry**. 6<sup>th</sup> ed. Woltershumer: Lippicott Williams & Wilkins, 2008.
69. LEO, A.; JOW, P. Y. C.; SILIPO, C.; HANSCH, C. Calculation of hydrophobic constant (log P) from .pi. and f constants. **J. Med. Chem.**, v. 9, n. 18, p. 865 -868, 1975.
70. LILIENKAMPF, A.; MAO, J.; WAN, B.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; KOZIKOWSKI, A. P. Structure-activity relationships for a series of quinoline-based compounds active against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Med. Chem.**, n. 52, p. 2109-2118, 2009.
71. LOUGHEED, K. E. A.; TAYLOR, D. L.; OSBORNE, S. A.; BRYANS, J. S.; BUXTON, R. S. New anti-tuberculosis agents amongst known drugs. **Tuberculosis**, n. 89, p. 364-370, 2009.
72. LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; VEZIRIS, N.; KOUL, A.; JALIER, V.; ANDRIES, K. R207910 (TMC207): un novel antibiotiqu pour le traitement de la tuberculose. **Med. Mal. Infec.**, 2009. In press. doi: 10.10161/j.medmal. 2009. 09. 007.

73. MA, Z.; LINHARDT, C. Towards an optimization therapy for tuberculosis? Drugs in clinical trials and in preclinical development. **Clin. Chest. Med.**, n. 30, p. 755-768, 2009.
74. MAHMOOD, I. Interspecies scaling of protein drugs: prediction of clearance from animals to humans. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, n. 1, p. 177-185, 2004.
75. MAILLARD, M. C.; NIKODIJEVIC, O.; LaNOUE, K. F. ; BERKICH, D. ; JI, XIAU-D. ; BARTUS, R. ; JACOBSON, K. A. Adenosine receptor prodrugs: Synthesis and biological activity of derivatives of potent, A<sub>1</sub>-selective agonists. **J. Pharm. Sci.**, v. 83, n. 1, 46-53, 1994.
76. **MERCK** Index. 13.ed. Whitehouse Station, NJ : Merck, 1996.
77. MIKUSOV, K.; SLAYDEN, A. R.; BESRA, G. S.; BRENNAN, P. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. 39, p. 2484-2489, 1995.
78. MILLER, M. M.; GHODBANE, S.; WASIK, S. P.; TEWARI, Y. B.; MARTIRE, D. E. Aqueous solubilities, octanol water partition coefficients, and entropies of melting of chlorinated benzenes and biphenyls. **J. Chem. Eng.**, v. 2, n. 29, p 184–190, 1984.
79. MISHRA, A.; VEERASAMY, R.; JAIN, P. K.; DIXIT, V. K.; AGRAWAL, R. K. Synthesis, Characterization and Pharmacological Evaluation of Amide Prodrugs of Flurbiprofen. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 1, p. 89-100, 2008.
80. MISRA, A.; GANESH, S.; SHAHIWALA, A. Drug delivery to the central nervous system: a review. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 2, n.6, p. 252-273, 2003.
81. MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117-124, 2005.

82. MORAIS, H.P. **Avaliação “in vitro” da atividade antibacteriana de extratos de *Bysonima spp* e *Alchornea spp***: Estudos comparativos entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. Araraquara, 2006. 79f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2006.
83. MLADENOVA, R.; PETROVA, T.; MANOLOVA, N.; IGNATOVA, M.; RASHKOVI, I.; KUBISA, P. Preparation, characterization and biological activity of amides and esters from 8-hydroxyquiloline-2-carboxylic acid and Jeffamines ED<sup>®</sup> or Poly(ethylene glycol). **J. Bio. Comp. Polym.**, v. 16, p. 259 – 276, 2001.
84. MUTTIL, P.; WANG, CHENCHEN, W.; HICKEY, A. Inhaled drug delivery for tuberculosis therapy. **Pharmt. Research**, v. 26, n. 11, 2009.
85. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por difusão em ágar para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 8<sup>a</sup> ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M2-A8, v. 23, No 1, 2003).
86. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 6<sup>a</sup> ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, No 2, 2003).
87. NETO, C.C.; OWENS, C.W.; LANGFIELD, R.D.; COMEAU, A.B.; St. ONGE, J.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 133–138, 2002.
88. OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; SUZANA, O.; NISHIKAMA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade e determinação da concentração mínima

- inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Braz. J. Phamacocogn.**, v. 18, p. 301-307, 2008.
89. PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
90. PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Oral nanoparticle-based antituberculosis drug delivery to the brain in an experimental model. **J. Antimicrob. Chem.**, n. 57, p. 1146–1152, 2006.
91. PAVAN, B.; DALPIAZ, A.; CILIBERTI, N.; BIONDI, C.; MANFREDINI, S.; VERTUANI, S. Progress in Drug Delivery to the Central Nervous System by the Prodrug Approach. **Molecules**, n. 13, p. 1035-1065, 2008.
92. PAVAN, F. R. **Atividade anti-Mycobacterium tuberculosis Intra e Extracelular e citotoxicidade dos complexos de rutênio e vanádio e seus ligantes**. 2009. 109f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus Araraquara, São Paulo.
93. PECCININI, RG. Fundamentos de farmacocinética clínica. In: Aizeinstein, M. **Fundamentos para o uso racional de medicamentos**. São Paulo: Ed. Artes Médicas; 2010. p.87-114.
94. PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; BERNARDINI, C.; GRANDOLINI, G.; RICCI, M.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C. Potential prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory agents for targeted drug delivery to the CNS. **Europ. J. Med. Chem.**, n. 39, p. 715-727, 2004.
95. PIERONI, M.; LILIENKAMPF, B. W.; YUEHONG, WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; KOZIKOWSKI, A. P. J. Synthesis, biological evaluation, and structure –activity relationships for 5-[(E)-2-arylethyl]-3-isoxazolecarboxylic acid alkyl ester derivatives as valuable

- antitubercular chemotypes. **J. Med. Chem.**, n. 52, p. 6287-6296, 2009.
96. PROKAI, L. PROKAI-TATRAI, K., BODOR, N. Targeting Drugs to the Brain by Redox Chemical Delivery Systems. **Med. Res. Rev.**, v. 20, n. 5, p.367-416, 2000.
97. RAGONESE, R.; MACKA, M. HUGHES, J.; PETOCZ, P. The use of the Box–Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, n. 27, p. 995–1007, 2002.
98. RAMASWAMY, S. V.; AMIN, A. G.; GOKSEL, S.; STAGER, C. E.; DOU, S. J.; SAHLY, H. E.; MOGHAZED, S. L.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. Molecular genetics analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. 44, p. 326-336, 2000.
99. RAPAPORT, R. A.; EISENREICH, S. J. Chromatographic determination of octanol-water partition coefficients (Kow's) for 58 PCB polychlorinated biphenyl congeners. **Environ. Sci. Technol.**, v.3, n.18, p. 163 – 170,1984.
100. RAUTIO, J.; LAINE, K.; GYNTHNER, M.; SAVOLAINEN, J. Prodrug Approaches for CNS Delivery. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p. 92-102, 2008.
101. RICH, A.R.; MCCORDOCK, H. A. The pathogenesis of tuberculous meningitis. **Bull. John Hopkins Hosp.**, v. 52, p. 5-37, 1993.
102. SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth, atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.** Araraquara, 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

103. SHARMA, V.; McNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **Br. J. Pharm.**, n.157, p. 907–921, 2009.
104. SHERRMANN, J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. **Vascul. Pharmacol.**, v.38,n6, p.349-354,2002.
105. SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Quím. Nova**, v. 26, n. 3, p. 312 - 318, 2003.
106. SILVA, M. **Tuberculostáticos potenciais: pró-fármacos poliméricos formadores de micela derivados de isoniazida, rifampicina, pirazinamida.** 2001. 166f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2001.
107. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 5<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan S.A., 1994. p. 93-119; 193-233.
108. SIMÕES, M.F.; VALENTE, E.; GÓMEZ, M.J.R.; ANES, E.; CONSTANTINO, L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and Ester prodrugs. Stability, activation and activity against M. tuberculosis. **Eur. J. Pharm. Sci.**, n.37, p. 257-263, 2009.
109. SITE:(<http://www.medicosdomundo.pt/content/news/tuberculose%20pdf.pdf>). Acesso em 7 de jan de 2010.
110. SITE:(<http://www.lincx.com.br/lincx/orientacao/doencas/aspectostuberculose.html>). Acesso em 7 de jan de 2010.
111. SOCIEDADE BRASILEIRA PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Tuberculose: disseminação global TB multi-resistente. Campinas, 2001. Disponível em: <http://www.nib.unicamp.br/sbpt/newreltb.html>. Acesso em: 26 fev. 2008.
112. SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica.** 11 ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, v. 3, p. 796-97, 1983.
113. SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica.** 7 ed. Tradução de W. O. Lin. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 2 v.
114. SOSNIK, A.; CARCABOSO, A. M.; GLISONI, R. J.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. New old challenges in tuberculosis:



- Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.18, n.62(4-5), p.547-59, 2010.
115. STÖCKIGT, J.; ZENK, M. H. Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 30c, p. 352 – 358, 1975.
116. TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. O.; Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n, 33, p. 1493-1499, 1989.
117. TAYLOR, D.M.; WILLIAMS, D.R. **In trace element medicine and chelation therapy**. London: Royal Society of Chemistry, 1998.
118. TELENTI, A.; PHILIPP, W. J.; SREEVATSAN, S.; BEMASCONI, C.; STOCKBAUER, K. E.; WIELES, B.; MUSSER, J. M.; JACOBS, Jr. W. R. The emb operon, gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nat. Med.**, n. 3, p- 567-570, 1997.
119. THWAITES, G. E.; HIEN, T. T. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. **Lancet Neurol.**, v. 4, p. 160-170, 2005.
120. TOUTAIN, P.L.; MÉLOU, A.B. Plasma Clearance. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 415 - 425, 2004.
121. WANG, R.; FU, Y.; LAI, L. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 3, n. 37, p. 615 – 621, 1997.
122. WERMUTH, M. C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLES, G.; WOOLDRIDGE, K. R. H.; Eds. **Drugs design: fact or fantasy?** New York: Academic Press, 1984. p. 47-72.
123. WERMUTH, M. C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: **The practice of medicinal chemistry**. New York: Academic Press, 1996. p. 80-99.
124. WHO annual report on global TB control summary. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 78, n. 15, p. 122-128, 2004.

125. WHO annual report on global TB control summary. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 2007.
126. WHO annual report on global TB control summary. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 2008.
127. WHO annual report on global TB control summary. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 2009
128. YAJKO, D. M.; MADEI, J. J.; LANCASTER, M. V.; SANDERS, C. A.; CAWTHON, V. L.; GEE, B.; BABST, A.; HADLEY, W. Colorimetric method for determination MICs of antimicrobial agentes for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Mcrobial.**, v. 33, n. 9, 1995.
129. YOON, Y. H.; JUNG, K. H.; SADUN, A. A.; SHIN, H. C.; KOH, J. Y. Ethambutol-induced vacuolar changes and neuronal loss in rat retinal cell culture: mediation by endogenous zinc. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 162, n. 2, p. 107-114, 2000.
130. ZHANG, N.; TORELLES, J. B.; McNEIL, M. R.; ESCUYER, V. E.; KHOO, K. ; BRENNEN, P. J.; CHATTERJEE, D. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinisylation of lipoaranamannam an arabinagalactan Via Na N- terminal recognition region and C-terminal synthetic region. **Molecular Microbiology**, v. 1, n. 50, p. 69-76, 2003.
131. ZHANG, X.; HU, Y.; CHEN, S.; LUO, R.; YUE, J.; ZHANG, Y.; DUAN, W.; WANG, H. Synthesis and evaluation of (S,S)-N,N'-bis-[3-(2,2',6,6'-tetramethylbenzhydryloxy)-2-hydroxy-propyl]-ethylenediamine (S2824) analogs with anti-tuberculosis activity. **Bioog. Med. Chem. Lett.**, n. 19, p.6074-6077, 2009.