UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de método analítico por eletroforese
capilar para quantificação de éster do ácido pirazinóico em
nanosuspensão

Andrea Sofo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profª. Dra. Maria Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de método analítico por eletroforese
capilar para quantificação de éster do ácido pirazinóico em
nanosuspensão

Andrea Sofo

Versão original

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profª. Dra. Maria Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

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

S682d Sofo, Andrea
Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar
para quantificação de éster do ácido pirazinóico em nanosuspensão /
Andrea Sofo. – São Paulo, 2015.
102p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Aurora Prado, Maria Segunda

1 . Fármaco : Controle de qualidade 2 . Nanopartículas I . T . II .
Aurora Prado, Maria Segunda, orientador.

615.19015

CDD

Andrea Sofo

**Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para
quantificação de éster do ácido pirazinóico em nanosuspensão**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de 2015.

Ao Senhor *Jesus Cristo*, Autor da vida,
a quem devo todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Gabriel, pela constante compreensão nas separações e ausências que este trabalho exigiu.

Aos meus pais José e Maria e minha irmã Alessandra, por todo o apoio desde a graduação.

À Prof^a.Dra. María Segunda Aurora Prado, pela orientação , confiança, incentivo a vida acadêmica e suporte em todo este trabalho.

À Prof^a.Dra. Veni Maria Andres Felli, pela credibilidade depositada em mim desde a iniciação científica, apoio e orientação de todo o trabalho de síntese do produto.

Ao Prof.Dr. João Paulo Fernandes e sua aluna Michele pela contribuição no trabalho de síntese.

À Prof^a.Dra. Nádia Abou Chacra pelas sugestões, suporte técnico e material e aos seus alunos: Jéssica, Katherine e Iván.

Aos Amigos do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Fármacos e Cosméticos: Laura Victoria Español Mariño, Aline de Souza, Claudia Oliveira e Fernando Kaneko Prado. Muito obrigada pelos momentos de aprendizado e descontração compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Síntese pelo apoio: Charles, Fernando, Elys e Rosane.

Aos amigos de outros laboratórios que fiz durante este período, Maria Verónica Carranza Oropeza (IQ-USP) e Adir Jose (Poli-USP).

Aos funcionários da pós-graduação David Filho, Irineu, Sueli, Jorge e Kelma pela presteza e cordialidade.

A todas as pessoas que não mencionei e que dispensaram a mim o seu tempo e atenção colaborando neste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

SOFO, A. **Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para quantificação de éster do ácido pirazinóico em nanosuspensão**. 2015. 102f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A tuberculose é a segunda maior causa de mortes por doença infecciosa no mundo depois do HIV. A pirazinamida, um dos fármacos utilizados no tratamento atual, é um pró-fármaco do ácido pirazinóico que tem ação relevante contra *Mycobacterium tuberculosis* latentes, possui alta atividade bactericida sendo capaz de eliminar micobactérias intracelulares como nos macrófagos, por exemplo. A observação de que micobactérias resistentes à pirazinamida ainda são suscetíveis aos ésteres do ácido pirazinóico direcionou as pesquisas no desenvolvimento de derivados ésteres como pró-fármaco, com a vantagem de que as esterases presentes nas micobactérias possibilitam a ativação do pró-fármaco. O éster do ácido pirazinóico, pirazinoato de etila, apresenta como vantagem a fácil obtenção por apenas uma etapa de reação. A estruturação de fármacos em nanopartículas poliméricas traz como vantagens a melhora na estabilidade e alta capacidade de carregamento do fármaco. A nanoestruturação de ativos cria a necessidade de métodos capazes de quantificar os componentes presentes. Neste contexto, a eletroforese capilar apresenta-se como uma técnica analítica de baixo custo e tem como vantagem a diminuição do tempo de análise. O objetivo deste trabalho foi desenvolver a nanoestruturação do éster pirazinoato de etila e quantificar o mesmo nas nanopartículas pela técnica de eletroforese capilar. O éster do ácido pirazinóico foi caracterizado por ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial, análise elementar, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear. As nanopartículas obtidas pelo método de nanoprecipitação foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, potencial Zeta, pH, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura. Um método por eletroforese capilar foi desenvolvido e validado de acordo com os guias ANVISA e ICH. O método apresentou boa linearidade ($R^2 > 0,99$), precisão ($DPR < 3\%$) e exatidão (recuperação de $99\% \pm 0,2$). O método desenvolvido foi usado para quantificar o éster contido nas nanopartículas e a eficiência da encapsulação do fármaco foi determinada.

Palavras chave: pró-fármacos, ácido pirazinóico, nanopartículas, eletroforese capilar.

ABSTRACT

SOFO, A. **Development of an analytical method by capillary electrophoresis to quantify pyrazinoic acid ester loaded in nanoparticles.** 2015. 102p. (Master thesis). Faculty Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Tuberculosis the second leading cause of deaths from infectious diseases after HIV. Pyrazinamide, one of the drugs available in therapy of tuberculosis, is a prodrug from pirazinoic acid which is active against latent bacilli, besides the high bacterial activity since it is capable to eliminate within macrophages. Since bacteria which is not susceptible to pyrazinamide is still susceptible to pyrazinoic acid esters, has directed research on developing pirazinoic acid esters derivative as prodrug, with the advantage this is activated for mycobacterial esterases. Pyrazinoic acid ester, ethyl pyrazinoate, it has the advantage to be done in only one reaction step and simply obtaining. Structured drugs in polymeric nanoparticles presenting advantages such as stability improvement and high drug carrying capacity. The drugs nanostructuring makes necessary methods to this quantifying. In this context, capillary electrophoresis represents an analytical technique low cost and the advantage of the shorter analysis. The aim of this work was the nanostructuring of ethyl pyrazinoate ester and quantify this in nanoparticles by capillary electrophoresis. The pyrazinoic ester was characterized by melting point, differential scanning calorimetry, elemental analysis, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. Nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and were characterized by dynamic light scattering, zeta potential, pH, differential scanning calorimetry and scanning electron microscopies. A capillary electrophoresis method was developed and validated in accordance with the requirements of ANVISA and ICH guidelines. The method showed good linearity ($R^2 > 0,99$), precision ($RSD < 3\%$) and accuracy (recovery $99\% \pm 0,2$). The method was used to quantify the ester loaded in nanoparticles and the entrapment efficiency was determined.

Keywords: prodrugs, pyrazinoic acid, nanoparticles, capillary electrophoresis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Membrana celular micobacteriana
- Figura 2** Mtb corados por coloração Ziehl-Neelsen
- Figura 3** Estrutura química da pirazinamida
- Figura 4** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas
- Figura 5** Estrutura molecular da poli(ϵ -caprolactona)
- Figura 6** Sistema de Eletroforese Capilar
- Figura 7** Esquema de síntese do pirazinoato de etila
- Figura 8** Pirazinoato de etila
- Figura 9** Espectro de ^1H -RMN do Pirazinoato de Etila
- Figura 10** Espectro de ^{13}C -RMN do Pirazinoato de Etila
- Figura 11** Espectro de absorção no IV do PE
- Figura 12** Espectro de absorção UV do PE: $6,7 \cdot 10^{-9} \text{ mmol mL}^{-1}$ e $5,36 \cdot 10^{-9} \text{ mmol mL}^{-1}$
- Figura 13** Suspensão de NPs contendo pirazinoato de etila
- Figura 14** Espectroscopia de correlação de fótons de NPs: sem fármaco e com fármaco
- Figura 15** Representação gráfica do potencial Zeta das NPs: sem fármaco e com fármaco
- Figura 16** Curva DSC: A) pirazinoato de etila, B) NPs vazias e C) NPs com pirazinoato e de etila
- Figura 17** Micrografia por MEV de nanopartículas de PCL contendo PE e sem PE) submetidas a liofilização na presença de crioprotetor.
- Figura 18** Micrografia por MEV de nanopartículas de PCL contendo PE e sem PE submetidas ao dessecador
- Figura 19** Eletroferograma do pirazinoato de etila ($400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido pirazinóico $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Figura 20** Representação da ionização do pirazinoato de etila
- Figura 21** Eletroferograma do pirazinoato de etila ($300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido pirazinóico ($400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e pirazinoato de etila ($300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) com ácido pirazinóico ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)
- Figura 22** Eletroferograma (A) fármaco e padrão interno (PE $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e AP $300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) placebo.
- Figura 23** Curva analítica do PE na faixa de concentrações entre 320 a $480 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Figura 24** Eletroferograma de PE em ultrafiltrado de suspensão de NPs
- Figura 25** Eletroferograma de PE total contido em suspensão de NPs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema básico de tratamento para TB
Tabela 2	Esquema de tratamento para MDR-TB
Tabela 3	Fórmula base para obtenção de NPs pelo método de nanoprecipitação para volume final de 10 mL
Tabela 4	Condições de trabalho para desenvolvimento de método por CE.
Tabela 5	Parâmetros eletroforéticos alterados para o ensaio de robustez
Tabela 6	Valores de absorção no Infravermelho para PE
Tabela 7	Características físico-químicas das suspensões de nanopartículas logo após o preparo
Tabela 8	Resultados obtidos por CE para reta analítica do PE. Detecção 268 nm
Tabela 9	Resultados para avaliação da exatidão do método por CE
Tabela 10	Resultados para avaliação da repetibilidade método analítico por CE
Tabela 11	Resultados para avaliação da precisão intermediária
Tabela 12	Resultados para avaliação da robustez do método por CE

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Referências de aplicações de NPs de PCL
Quadro 2	Análise elementar teórica e experimental do PE
Quadro 3	Resultados relativos ao LD e LQ do PE por CE.

LISTA DE ABREVIações

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Ácido pirazinóico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Eletroforese capilar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CV	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar em zona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EMB	Etambutol
ES	Estreptomicina
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FEO	Fluxo eletrosmótico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INH	Isoniazida
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LFA	Levofloxacin
MDR-TB	Tuberculose multirresistente
MEEKC	Cromatografia eletrocinética em microemulsão
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NPs	Nanopartículas poliméricas
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PdI	Índice de polidispersividade
PE	Pirazinoato de etila
PLA	Ácido poli(D,L-ácido láctico)
PLGA	Ácido poli(lactideo-co-glicolideo)
PZA	Pirazinamida
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEA	Trietilamina
TB	Tuberculose
TBS	Tetraborato de sódio
TRM-TB	Teste rápido molecular para TB
TZA	Terizidona
UV	Ultravioleta
XDR-TB	Tuberculose extremamente resistente

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Limite de detecção
Equação 2	Limite de quantificação
Equação 3	Coeficiente de variação
Equação 4	Exatidão
Equação 5	Eficiência de encapsulação

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Tuberculose	18
2.1.1	Agente etiológico	19
2.1.2	Patogenia	21
2.1.3	Diagnóstico laboratorial	22
2.2	Fármacos antimicobacterianos	24
2.2.1	Fármacos de primeira escolha	24
2.2.2	Fármacos de segunda escolha	26
2.2.3	Esquema de tratamento básico da TB	27
2.2.4	Resistência micobacteriana	28
2.3	Desenvolvimento de fármacos	29
2.3.1	Latenciação	29
2.3.2	Ésteres do ácido pirazinóico	31
2.4	Nanotecnologias na saúde	32
2.4.1	Nanopartículas poliméricas	34
2.4.1.1	Caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas	38
2.4.1.2	Determinação do pH	39
2.4.1.3	Potencial Zeta (ξ)	39
2.4.1.4	Distribuição de tamanho das nanopartículas	40
2.4.1.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	40
2.4.1.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
2.5	Associação de fármacos a nanopartículas	41
2.6	Eletroforese Capilar (CE)	43
2.6.1	Separação por CE	44
2.6.2	Técnicas de separação	45
2.6.2.1	Eletroforese Capilar em solução livre ou de zona (CZE)	45
2.6.2.2	Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC)	46
2.7	Validação de métodos analíticos	46
2.8	Determinação quantitativa de fármacos contidos em nanopartículas	50
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivos Específicos	51
3.3	Material e métodos	52
3.3.1	Material	52
3.3.2	Métodos	53
3.3.2.1	Obtenção do pirazinoato de etila	53
3.3.2.2	Caracterização do pirazinoato de etila	54

3.2.2.3	Obtenção de nanocápsulas contendo pirazinoato de etila	57
3.2.2.4	Caracterização físico-química das nanocápsulas	59
3.4	Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para quantificação de pirazinoato de etila contido em nanopartículas	60
3.5	Determinação da eficiência de encapsulação	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Obtenção e caracterização do éster do ácido pirazinóico	66
4.2	Obtenção e caracterização físico-química de nanopartículas contendo pirazinoato de etila	71
4.3	Desenvolvimento do método por eletroforese capilar para quantificação do pirazinoato de etila	78
4.3.1	Validação do método analítico para quantificação do éster por MEKC ...	81
4.4	Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do éster	87
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	89
6	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) continua sendo um grave problema de saúde pública, que afeta um terço da população mundial (cerca de 2 bilhões de pessoas). A TB é uma doença infecciosa com alta taxa de mortalidade. Este quadro tem se agravado com o surgimento de cepas resistentes, associado ao tratamento padrão (LIMA *et al.*, 2011).

Até a década de 50, a TB era uma doença facilmente tratável com a introdução da estreptomicina, que utilizada em altas doses na monoterapia apresentava alta toxicidade. Posteriormente foram introduzidos os fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina, introduzida na terapia em 1967. Atualmente o tratamento de primeira escolha, além do uso de isoniazida, rifampicina, pirazinamida inclui o etambutol e tem duração de um período mínimo de seis meses. Esta terapia provoca diversos efeitos colaterais, resultando no abandono do tratamento pelo paciente e, como consequência, o surgimento de bactérias resistentes aos fármacos. O aparecimento de linhagens de bacilos resistentes aos fármacos conhecidos tem causado preocupação aos órgãos de saúde pública, pois contribui com o aumento de mortes por TB (BRASIL, 2015).

Dentre os fármacos utilizados, a pirazinamida (PZA) tem ação relevante contra bacilos latentes, é um bom bactericida sendo capaz de eliminar bacilos intracelulares como, por exemplo, nos macrófagos (COLL, 2003; de SOUZA, 2005).

A PZA é um análogo estrutural da nicotinamida e é considerada um pró-fármaco que é transformado em ácido pirazinóico (AP) pela ação das amidases

bacterianas. O acúmulo de AP diminui o pH intracelular inibindo a síntese de ácidos micólicos da membrana micobacteriana (LIMA *et al.*, 2011; SIMÕES, 2008).

Considerando que as taxas de tuberculose resistente têm aumentado e que a terapêutica atual, apesar dos esforços, basicamente utiliza fármacos antimicobacterianos existentes há décadas, é necessário desenvolver novos fármacos capazes de diminuir o tempo de tratamento, diminuir os efeitos colaterais aumentando a adesão ao tratamento.

Entre as estratégias usadas no desenvolvimento de fármacos, a latenciação é uma boa alternativa para a obtenção de novos fármacos. Formas latentes (pró-fármaco) podem reduzir o número de doses pelo aumento da biodisponibilidade e, conseqüentemente, redução da toxicidade (CHUNG *et al.*, 2005).

Tendo em vista que a PZA é um pró-fármaco do AP, outros pró-fármacos do AP podem ter atividade contra o *M. tuberculosis* resistente. Tem sido relatado que os ésteres do AP possuem atividade antimicobacteriana *in vitro* significativa, mesmo nas formas resistentes à PZA (SEITZ *et al.*, 2002; SIMÕES *et al.*, 2009).

A verificação de que o *M. tuberculosis* resistente a PZA ainda é suscetível aos ésteres do ácido PZA direcionou as pesquisas no desenvolvimento de derivados ésteres como pró-fármaco com a vantagem de que as esterases presentes nas micobactérias possibilitem a ativação do pró-fármaco. Entretanto, esterases também estão presentes no plasma humano podendo haver a possibilidade de hidrólise dos ésteres antes destes atingirem o alvo (CYNAMON *et al.*, 1992, 1995).

Uma proposta para resolver este problema é o uso de carreadores do pró-fármaco protegendo o ativo e aumentando seu tempo de ação por liberação modificada. O carreamento em nanopartículas protege o fármaco da degradação

enzimática e por se tratar de uma substância lipofílica melhora a penetração e distribuição intracelular (CHAVEZ *et al.*, 2002; COUVREUR & VAUTHIER, 2006).

A utilização de nanoestruturas representa um avanço significativo no tratamento de infecções intracelulares, pois estes sistemas são capazes de se acumular em tecidos e células (como os macrófagos). Além disso, estes sistemas têm demonstrado menor toxicidade do fármaco pela diminuição da concentração inibitória mínima. Simões *et al.* (2008) comprovaram que ésteres encapsulados em lipossomas apresentaram maior atividade *in vitro* quando comparados com a forma livre dos compostos. Também comprovaram maior estabilidade das suspensões de ésteres com o uso desses carreadores. Estudos indicam que nanocápsulas são facilmente absorvidas pela mucosa intestinal. Outras vantagens são: a maior solubilidade destes compostos pela difusão da molécula através dos tecidos até atingir o sítio de ação, alteração do perfil de liberação do fármaco e redução das concentrações plasmáticas e dos efeitos tóxicos locais e sistêmicos o que resultaria em uma maior adesão ao tratamento (DAMGE *et al.*, 1990; SIMÕES, 2008).

Nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1 µm. A vantagem sobre outros sistemas de carreadores é maior proteção do ativo e a possibilidade de maior eficiência de encapsulação da substância ativa (CRUZ *et al.*, 2006).

Neste trabalho, nanopartículas contendo um éster do ácido pirazinóico foram preparadas utilizando-se um polímero biodegradável amplamente empregado em preparações de nanopartículas poliméricas. A caracterização físico-química das nanopartículas segue as recomendações do *Food and Drug Administration* (FDA) como a verificação do potencial Zeta, polidispersividade e microscopia eletrônica.

A nanoencapsulação de ativos traz vantagens terapêuticas, mas também gera a necessidade de métodos capazes de quantificar os ativos em formas nanoestruturadas. A literatura apresenta vários métodos analíticos para determinação de ésteres sendo a espectroscopia UV, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar (CE) os mais frequentes (CARVALHO *et al.*, 2012; FORST, WARNER, 2012; QUAGLIA *et al.*, 2005).

Com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi possível detectar compostos e analisar traços de compostos em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos e petróleo. Entretanto a HPLC, como todas as técnicas de cromatografia, possui suas limitações, pois o tempo de análise é longo além do uso de solventes orgânicos que, se descartados incorretamente, são contaminantes ambientais (SISMOTTO,PASCHOAL,REYES, 2013).

A eletroforese capilar (CE) apresenta-se como uma técnica analítica de baixo custo e tem como vantagem a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise (JAGER & TAVARES, 2001; VEUTHEY, 2005).

Esta técnica instrumental de separação permite analisar desde íons pequenos como lítio até macromoléculas como proteínas e fragmentos de DNA, em um único capilar. Outra vantagem é que o uso de solventes orgânicos é praticamente nulo com baixo consumo de amostra (AURORA-PRADO *et al.*, 2002; BONATO *et al.*, 2005; TAVARES, 1997; TÔRRES, 2009).

Até o presente momento, pela revisão da literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que descreva a determinação e quantificação do pirazinoato de etila (PE) através de alguma técnica analítica. Um método por CE foi desenvolvido e validado para quantificação do PE contido em nanopartículas e a eficiência de encapsulação foi determinada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tuberculose

A TB é uma doença infecciosa que afeta principalmente os pulmões sendo transmitida entre indivíduos através de gotículas do aparelho respiratório de indivíduos portadores de TB pulmonar. Os sintomas da TB pulmonar são tosse produtiva persistente por mais de 2 semanas, febre, dor torácica, perda de peso e fraqueza. A TB apresenta formas extrapulmonares como TB pleural, ganglionar, urinária, meningoencefálica e disseminada. Portadores de HIV imunossuprimidos são mais acometidos pelas formas extrapulmonares (BRASIL, 2015; WHO, 2013).

No contexto da saúde pública, a TB pulmonar tem maior relevância devido a maior frequência e probabilidade de transmissão. Em um ano, um indivíduo portador de TB pulmonar poderá infectar até 15 pessoas, por isso a Organização Mundial de Saúde orienta a busca ativa do paciente sintomático como estratégia no controle da TB. A transmissão da TB está associada a diversos fatores socioeconômicos, ao surgimento do HIV, a certas condições clínicas (diabetes, imunossupressão, idade) e principalmente ao surgimento de novos casos durante o tempo em que o indivíduo portador de TB pulmonar ainda não foi diagnosticado (BRASIL, 2002; FERREIRA *et al*, 2005).

A probabilidade de desenvolver a doença aumenta grandemente em portadores do vírus HIV, sendo o maior impacto na mortalidade por HIV e por TB no Brasil. Em 2012 a taxa de co-infecção TB-HIV foi de 9,6%. Ainda outros grupos vulneráveis devido a condições sociais e de saúde estão mais expostos que a população geral, como a

população privada de liberdade, que contribui com 7,2% dos casos novos, seguida de população em situação de rua e população indígena (BRASIL, 2015).

A infecção afeta mais adultos em idade economicamente ativa e cerca de 2/3 dos casos ocorrem entre pessoas com idade entre 15 a 59 anos. Cerca de oito milhões de novos casos (dos quais 13% também estão infectados pelo HIV) são notificados anualmente resultando em 1,5 milhões de mortes a cada ano. Em 2010 a incidência global foi de 128 casos a cada 100.000 pessoas (WHO, 2013).

A TB é a segunda maior causa de mortes por doença infecciosa no mundo, depois do HIV. O Brasil ocupa a 17ª posição entre os 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo. Em 2013 foram notificados 71.123 novos casos de TB, sendo Amazonas, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo os responsáveis por 55% da carga da doença no país. A taxa de mortalidade é de 2,4 em 100.000 resultando em cerca de 4.600 óbitos a cada ano. No período de 2005 a 2014 foram diagnosticados 73 mil casos novos de TB por ano (BRASIL, 2015).

Segundo o Boletim da Coordenação de Epidemiologia e Informação (CEInfo) da Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo, em 2013 a TB foi a doença de notificação compulsória com maior número de casos (5.711), seguida da dengue (2.546) e HIV (2.117) (CEInfo, 2014).

2.1.1 Agente etiológico

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é o principal agente da TB. Outras espécies de micobactérias podem causar a doença como *M. africanum* e *M. canettii*, que são endêmicos na África e o *M.bovis* que só acomete o homem

através do contato com produtos animais contaminados. Micobactérias apresentam-se como bacilos de forma alongada, aeróbios estritos, imóveis, não esporulados e resistentes à descoloração quando tratados com mistura de álcool e ácido clorídrico durante os procedimentos de coloração pela fucsina. Esta resistência se deve a grande quantidade de lipídeos denominados ácidos micólicos em sua parede celular. (BRENNAN, 2003; LIMA *et al.*, 2011).

A estrutura da parede celular da micobactéria (**Fig.1**) é complexa e formada por três estruturas poliméricas: arabinogalactanas, peptoglicanas e lipoarabinomanas. A estrutura consiste em uma camada peptidoglicana ao redor de uma bicamada lipídica (lipoarabnomana). A segunda camada arabinogalactana circula paralela à camada peptidoglicana. A terceira camada estende-se perpendicular a arabinogalactana e compõe uma complexa rede de ácidos micólicos. Este complexo confere à micobactéria impermeabilidade à maioria dos compostos hidrofílicos, permitindo resistência a compostos ácidos e alcalinos (CORRÊA, 2009; SCORPIO, 1996).

Figura 1: Membrana celular micobacteriana (adaptado de TRA & DUBE, 2014)

2.1.2 Patogenia

A forma mais comum da infecção é a TB pulmonar (cerca de 80% dos casos), e é transmitida principalmente por via aérea, através da inalação dos bacilos dispersos nos aerossóis liberados durante a tosse do indivíduo infectado. Os pulmões são a via de instalação e manifestação do bacilo, alcançando os alvéolos pulmonares e se não houver uma resposta imune eficiente (eliminação do bacilo) há o desenvolvimento da infecção. As chances de desenvolver TB aumentam em portadores de imunodeficiência (HIV). Neste caso o risco de mortalidade aumenta em poucas semanas de infecção quando se trata de bacilos resistentes a terapia atual (SACKS; BEHRMAN, 2008; SAMUELSON, 2000).

Micobactérias não produzem toxinas e sua patogenicidade está relacionada à capacidade de se evadir da ação de macrófagos graças à parede celular hiperlipídica do bacilo que, entre outros fatores, possui a propriedade de inibir a ativação dos macrófagos via interferona γ e ainda estimula a formação de granulomas típicos da infecção. Estes granulomas são constituídos por uma massa celular sólida formada por macrófagos, que atraídos ao local da infecção para fagocitar o bacilo, podem se transformar em grandes células epitelióides denominadas células de Langhans envolvidas por linfócitos T CD4+ e CD8+. Uma vez no centro do granuloma, o bacilo deprime sua atividade metabólica e fica latente. Mesmo deprimindo seu metabolismo, o bacilo pode reativar a infecção multiplicando-se caso houver uma baixa da resposta imune. Então o número de bacilos aumenta exponencialmente se disseminando através da circulação linfática até os linfonodos. Neste estágio o pulmão é o órgão mais afetado. Após aproximadamente 12 semanas do início da infecção os macrófagos infectados podem ser disseminados a outros órgãos importantes como fígado, rins e sistema nervoso central. A resposta imunológica a este quadro produz inflamações e lesões em outros órgãos podendo progredir para necrose de tecidos. Este é o estágio extrapulmonar com complicações que podem levar ao óbito (FLYNN&CHAN, 2001;JORDAO *et al.*, 2008;PINHEIRO *et al.*,2011;SAMUELSON, 2000).

2.1.3 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos laboratoriais preconizados pelo Ministério da Saúde são a baciloscopia e a cultura do bacilo para confirmar o diagnóstico associado ao exame

radiológico pulmonar em indivíduos que apresentam a sintomatologia já citada (BRASIL, 2002; 2014).

A baciloscopia identifica microscopicamente o bacilo em um esfregaço da amostra (escarro) fixado em lâmina e corado pela coloração de Ziehl-Neelsen (**Fig.2**), onde posteriormente é realizada a leitura e interpretação do exame. Para diminuir a possibilidade de falsos-negativos recomenda-se a coleta de 2 A 3 amostras em dias diferentes pela manhã em jejum (LEITE; KANUFRE, 2013).

Figura 2: Mtb corados por coloração Ziehl-Neelsen.

A cultura do bacilo permite a multiplicação e isolamento do bacilo em meios de cultura específicos. O crescimento micobacteriano é lento e pode variar de 15 a 30 dias, e por isso este método é utilizado para confirmação da TB não sendo útil na tomada de decisão no tratamento inicial. A cultura é mais indicada para indivíduos sintomáticos que apresentam baciloscopia negativa e para o diagnóstico de formas extrapulmonares. A cultura, acompanhada de testes de sensibilidade a antibióticos, tem relevância também nos casos de suspeita de resistência micobacteriana ao tratamento básico (BRASIL, 2002).

Em 2008 a Organização Mundial de Saúde recomendou os testes moleculares para o diagnóstico de TB resistente ao tratamento básico. Estes testes moleculares consistem na amplificação e identificação das sequências de ácidos nucleicos do *M. tuberculosis* por reação em cadeia da polimerase (PCR). Entre estes existem testes moleculares que detectam simultaneamente o *M. tuberculosis* e a resistência a rifampicina, fornecendo resultados mais rápidos que na cultura do bacilo (FIND, 2011).

No Brasil, 92 municípios foram selecionados para receber equipamentos para testes moleculares nomeados de teste rápido molecular para TB (TRM-TB), compondo a Rede de Teste Rápido para TB (RTR-TB). Em dezembro de 2014 o Ministério da Saúde publicou nota recomendando o TRM-TB para adultos e crianças menores de 10 anos (BRASIL, 2015).

2.2 Fármacos antimicobacterianos

2.2.1 Fármacos de primeira escolha

O primeiro antibiótico capaz de atuar eficazmente no tratamento da tuberculose foi a estreptomicina (ES), um aminoglicosídeo descoberto em 1944. A resistência à estreptomicina na micobactéria ocorre por vários mecanismos, entre eles: alterações nos ribossomos (alvo do fármaco) devido a mutações genéticas, alterações no RNA e ainda alterações no sistema de influxo do fármaco pela membrana micobacteriana (FINKEN *et al.*, 1993; LEMKE, 2008).

Quase uma década depois (1952) a isoniazida (INH), um pró-fármaco do ácido isonicotínico, foi um dos primeiros antibióticos introduzidos na terapia

antituberculosa combinada, pois inibe duas enzimas necessárias na síntese dos ácidos micólicos. A resistência à INH é principalmente por mutações nos genes que codificam importantes enzimas, como as catalases-peroxidases, envolvidas na conversão do pró-fármaco (HEYEM *et al.*,1995; LEMKE, 2008)

Outro antibiótico introduzido na terapia combinada é a rifampicina (RMP), descoberta em 1965. A RMP é um bacteriostático que inibe a atividade da polimerase do ácido ribonucleico (RNA) do bacilo. Embora menos frequente, a resistência a RMP ocorre comumente em associação à INH, devido a mutações em subunidades da RNA-polimerase, inviabilizando a ação efetiva da rifampicina (WILLIAMS *et al.*,1994; LEMKE, 2008).

O etambutol (EMB), assim como a INH, interfere na síntese da parede micobacteriana inibindo enzimas responsáveis pela síntese das arabinogalactanas. A resistência ao EMB tem sido descrita em micobactérias isoladas nos casos de multirresistência ao tratamento padronizado, e está relacionada em 70% dos casos a mutações nos genes *embB* (LEE *et al.*,1995; TELENTI *et al.*,1997).).

A pirazinamida (PZA) é um análogo da nicotinamida (precursor da niacina), sua atividade atinge bacilos no interior de macrófagos, complementando a ação dos demais fármacos utilizados no tratamento de primeira escolha. Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas sabe-se que a PZA (**Fig. 3**) é um pró-fármaco que é transformado em ácido pirazinóico (ativo) pela ação da enzima micobacteriana nicotinamidase/pirazinamidase. O ácido pirazinóico (AP) quando acumulado no interior do bacilo diminui o pH intracelular inativando enzimas essenciais ao mesmo. A PZA é internalizada nos macrófagos por difusão passiva e transporte ativo, acumulando-se no seu interior. Acredita-se que a

acumulação de AP inibe a síntese de ácidos micólicos presentes na membrana celular do bacilo. Devido a sua atividade em meios ácidos (característicos de focos inflamatórios), a PZA tem influência no ataque a bacilos latentes, já que os mesmos se encontram nestas regiões (macrófagos alveolares e granulomas). A PZA é classificada, pelo sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), como classe III – alta solubilidade e baixa permeabilidade.

Sabe-se que a PZA é altamente específica para *M.tuberculosis* não tendo ação significativa contra as demais espécies de micobactérias que são naturalmente resistentes ao fármaco (LIMA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2000; ZHANG & MITCHISON, 2003).

Figura 3 : Estrutura química da pirazinamida

2.2.2 Fármacos de segunda escolha

O tratamento de segunda escolha preconizado pela Organização Mundial de Saúde tem duração de 18 a 24 meses. Os fármacos de segunda escolha são uma alternativa ao tratamento a partir do surgimento da resistência micobacteriana e são: etionamida que atua por inibição da biossíntese dos ácidos micólicos, mas gera hepatotoxicidade significativa; cicloserina que impede a formação da peptideoglicana, mas apresenta neurotoxicidade; PAS (ácido *p*-aminosalicílico) que é bacteriostático; amicacina e canamicina que inibem a síntese proteica da micobactéria; capreomicina um aminoglicosídeo nefro e ototóxico; tiosemicarbazona que apresenta alta toxicidade; e mais recentemente ofloxacina uma fluorquinolona que inibe a enzima responsável pela replicação do

DNA micobacteriano e é, portanto, um efetivo bacteriostático. A utilização destes fármacos torna a terapia mais demorada e apresenta taxas de cura menores, além da elevação do custo do tratamento (COLL, 2003; WHO, 2008).

2.2.3 Esquema de tratamento básico da TB

O esquema básico (**Tab.1**) de tratamento padronizado (exceto para meningite tuberculosa) para maiores de 10 anos no Brasil a partir de 2009 foi estabelecido no intuito de diminuir o tempo de tratamento de 9 para 6 meses. Para simplificar o tratamento, os quatro fármacos utilizados na primeira fase da terapia foram associados em uma única formulação. O tratamento básico é recomendado para casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto para meningite tuberculosa) infectados ou não pelo HIV e no retratamento (BRASIL, 2011).

Tabela 1: Esquema básico de tratamento para TB*

Fármacos	RMP+INH+PZA+EMB	RMP+INH
Duração do tratamento	2 meses	4 meses

Fonte: Min. da Saúde, Man. de Recomend. Contr. da TB 2011

*As doses variam de acordo com o peso do paciente

Embora a associação dos fármacos de primeira escolha seja eficiente, os diversos efeitos colaterais e a longa duração do tratamento contribuem para a baixa adesão ao mesmo (LIMA *et al.*, 2011).

A terapia utilizada atualmente apresenta muitos efeitos colaterais, sendo os mais frequentes, intolerância gástrica (náuseas e vômitos), alterações cutâneas, asma, e os efeitos adversos mais graves como a hepatotoxicidade (isoniazida,

rifampicina e pirazinamida), neurite ótica (etambutol), neuropatia periférica e dores articulares resultando no abandono do tratamento pelo paciente (AGUAYO, 2011; De SOUZA, 2005).

No Brasil o tratamento padronizado (**Tab.2**) em caso de multirresistência (MDR-TB) a fármacos do esquema básico tem, além da PZA e EMB, a estreptomicina (ES), a amicacina, a canamicina e a capreomicina como fármacos obrigatórios na composição do esquema de tratamento. No grupo das fluoroquinolonas, a levofloxacina (LFA) é o fármaco de escolha atual. A terizidona (cicloserina) (TZA) também tem sido selecionada no tratamento de bacilos multirresistentes (MDR-TB) devido a menor incidência de efeitos adversos (BRASIL, 2011).

Tabela 2: Esquema de tratamento para MDR-TB*

Fármacos	ES+EMB+LFA+ PZA+TZA	ES+EMB+LFA+ PZA+TZA	EMB+LFA+TZA
Duração do tratamento	2 meses fase intensiva 1ª etapa	4 meses fase intensiva 2ª etapa	12 meses fase manutenção

Fonte: Min. da Saúde, Man. de Recomend. Contr. da TB 2011

*As doses variam de acordo com o peso do paciente

2.2.4 Resistência micobacteriana

Outro fator preocupante com relação ao tratamento da TB é o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos que compõem a terapia antimicobacteriana. Existem dois níveis de resistência micobacteriana: os bacilos multirresistentes (MDR-TB) são resistentes a isoniazida e rifampicina e extremamente resistentes

(XDR-TB) que além de resistentes a isoniazida e rifampicina, são também resistentes a ofloxacina e a canamicina ou amicacina (LIMA *et al.*, 2011).

A maioria (mais de 70%) das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA apresentaram mutações no gene *pncA* que codifica as pirazinamidases, que perdem sua atividade, impedindo a conversão do fármaco em sua forma ativa (AP). As demais cepas sem correlação com mutações no gene *pncA* indicam a possibilidade de ao menos um mecanismo adicional mediador à PZA, possivelmente a partir de mutações no alvo do AP no bacilo (MESTDAGH *et al.*, 1999; SCORPIO; ZHANG, 1996; SUN *et al.*, 1999).

Tendo em vista que a resistência micobacteriana a fármacos é um fenômeno relativamente frequente e progressivo e que nos últimos 40 anos nenhum fármaco foi desenvolvido especificamente para micobactérias resistentes, há a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e pró-fármacos aumentando as alternativas terapêuticas (MA *et al.*, 2010).

2.3 Desenvolvimento de fármacos

2.3.1 Latenciação

A latenciação consiste na transformação química de um fármaco a uma forma de transporte inativa (fármaco latente) que, *in vivo*, libera o fármaco através de transformação química ou enzimática. A finalidade é aumentar a biodisponibilidade, prolongar sua ação e reduzir os efeitos tóxicos do fármaco (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Substâncias ativas como omeprazol,

enalapril, aciclovir e sinvastatina são exemplos de pró-fármacos disponíveis no mercado atualmente (ETTMAYER *et al.*, 2004).

Formas latentes foram classificadas como pró-fármacos por Wermuth em 1984 e subdivididos em duas categorias: pró-fármacos (clássicos, bioprecursores e mistos), e fármacos dirigidos.

Pró-fármacos clássicos apresentam transportadores adequados geralmente lipofílicos e liberam a porção ativa (fármaco matriz) após reações hidrolíticas. O objetivo destes transportadores é aumentar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade. Derivados da ampicilina pertencem a este grupo e o valaciclovir (pró-fármaco do aciclovir). Bioprecursores não apresentam um transportador, mas são moléculas modificadas formando um novo composto inativo que sofrerá metabolização para torna-se ativo. Lovastatina, zidovudina e metronidazol são exemplos de bioprecursores. Pró-fármacos mistos apresentam características de pró-fármacos clássicos e bioprecursores. Fármacos dirigidos apresentam transportadores seletivos capazes de transportar o fármaco especificamente até o alvo de ação (receptores ou enzimas no sítio de ação do fármaco). (CHUNG *et al.*, 2005 ETTMAYER *et al.*, 2004; WERMUTH, 2003; WILLIAMS; LEMKE, 2008)

Diversos métodos de preparação de pró-fármacos são empregados na formação de carbamatos, amidas, imidas e principalmente ésteres. Fármacos que contêm grupos hidroxila (-OH) ou carboxila (-COOH) podem ser convertidos em pró-fármacos ésteres em que sua forma ativa é recuperada por ação de esterases no alvo. Grupamentos ésteres conferem maior lipossolubilidade aos compostos e consequentemente maior capacidade de penetração celular devido a sua lipofilicidade (CHUNG *et al.*, 1999, 2005).

2.3.2 Ésteres do ácido pirazinóico

Cynamon *et al* (1992, 1995), verificaram a atividade antimicobacteriana *in vitro* de derivados ésteres do ácido pirazinóico contra *M.tuberculosis* suscetíveis e resistentes a pirazinamida (PZA), bem como as demais espécies *M.bovis*, *M.kansasii* e *M.avium*. Também relataram a relação entre os derivados ésteres do ácido pirazinóico e a diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Esta maior atividade é devido a presença de esterases micobacterianas que liberam o ácido pirazinóico (AP) mesmo nas formas resistentes do bacilo. Observaram, entretanto, que a atividade dos ésteres *in vivo* não foi satisfatória, pois os ésteres são facilmente hidrolisados, antes de atingirem o alvo, pelas esterases presentes no plasma.

Outro estudo demonstrou que ésteres do AP podem ser facilmente ativados por esterases micobacterianas, mas indicou limitações das formulações devido à hidrólise dos ésteres afetando a estabilidade. O estudo também indicou valores de CIM obtidos para os ésteres cinco vezes inferiores aos valores de CIM para PZA e AP em micobactérias. Os resultados também demonstraram que em um período de sete dias os ésteres do AP foram mais efetivos que a PZA e o AP na eliminação das micobactérias nos macrófagos estudados (SIMÕES *et al.*, 2009).

Seguindo as vantagens citadas, os ésteres do AP são uma inovação no tratamento da TB, entretanto seu desenvolvimento ainda é um desafio devido as limitações quanto a estabilidade e efetividade *in vivo*. Uma proposta promissora é associar os ésteres a carreadores que levariam o fármaco até o alvo sem sofrer a ação enzimática. Neste contexto, nanopartículas são possíveis potenciais no tratamento da TB (SHEGOKAR *et al.*, 2011).

2.4 Nanotecnologias na saúde

Segundo a *European Medicines Agency*, a nanotecnologia compreende o uso de estruturas com diâmetro até 1 μm , desenvolvidas para ter propriedades específicas. As aplicações da nanotecnologia têm aumentado no âmbito farmacêutico devido aos benefícios dos nanosistemas como a proteção de ativos a oxidação e degradação aumentando a estabilidade, a diminuição da toxicidade e possibilidade de liberação modificada do fármaco. Atualmente grande parte dos estudos está direcionada no desenvolvimento nanotecnológico de formulações para o tratamento de doenças inflamatórias, cardiovasculares e principalmente o câncer. Estes nanosistemas são também chamados de carreadores coloidais de fármacos (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; DIMER *et al.*, 2013).

Um dos primeiros carreadores propostos foram as lipossomas, que são estruturas vesiculares compostas por bicamadas fosfolipídicas concêntricas com um núcleo aquoso. Devido a sua característica bifásica que confere alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, este sistema tem sido utilizado como carreador de fármacos lipofílicos e hidrofílicos como antimicrobianos, antitumorais e vacinas. Medicamentos como Doxil® e Myocet®, ambos contendo doxorrubicina, são exemplos do uso deste sistema (DIMER *et al.*, 2013; GULATI, 1998; MALAM, LOIZIDOU, SEIFALIAN, 2009; MARCATO, DURAN, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2011).

Posteriormente outros nanosistemas carreadores foram desenvolvidos como as nanopartículas lipídicas, micelas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas.

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são produzidas a partir de lipídeos com alto ponto de fusão e surfactantes submetidos à homogeneização a uma alta pressão. Por não conterem solventes orgânicos apresentam baixa toxicidade, e

devido a grande quantidade de lipídeos estão sendo empregadas para uso dermatológico. Adicionalmente, foram desenvolvidos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN). Estes sistemas, produzidos com lipídeos líquidos, contêm menos água em sua composição do que NLS, aumentando a estabilidade do produto final (MARCATO, 2009).

Os carreadores coloidais baseados em micelas possuem estrutura anfifílica, e por isso apresentam biocompatibilidade, sendo investigadas em estudos de liberação de fármacos. Estes sistemas permitem solubilizar moléculas de fármacos insolúveis em água melhorando sua incorporação em formulações intravenosas. Já existem para comercialização fármacos com esta tecnologia como, por exemplo, diazepam (Valium MM®), além do paclitaxel em micelas aprovado pelo *FDA* (GUENTERT *et al.*, 1987; SIDDIQUI, 2012; TORCHILIN, 2007).

Dendrímeros são estruturas tridimensionais de polímeros organizados em ramificações partindo de um núcleo central, e têm suas aplicações principalmente na incorporação de quimioterápicos para câncer. Dificuldades na purificação do produto final, a série de etapas durante a síntese complexa destas estruturas e o controle da cinética de liberação do fármaco ainda são desafios nas pesquisas destes sistemas (MEDINA, EL-SAYED, 2009).

Nanopartículas poliméricas são constituídas de polímeros naturais ou sintéticos e uma das grandes vantagens destes sistemas é a variedade de polímeros biodegradáveis que podem ser utilizados. Propriedades como biocompatibilidade, não tóxicas e biodegradabilidade, apresentam as nanopartículas poliméricas como uma alternativa promissora ao transporte de fármacos (GUTERRES, ALVES, POLHMANN, 2007).

2.4.1 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas (NPs) são definidas como partículas coloidais biodegradáveis e biocompatíveis com diâmetros entre 10 a 1000 nm. Esta definição inclui uma diversidade de estruturas moleculares, mas dois tipos são especialmente estudados: as nanoesferas em que o fármaco está adsorvido, dissolvido ou disperso em sua matriz polimérica estabilizada por um surfactante ou emulsificante e as nanocápsulas que são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de uma membrana oleosa onde o fármaco está dissolvido, ou adsorvido à parede polimérica (MELLO *et al.*, 2010; SCHAFFAZIC *et al.*, 2003).

Os métodos de preparação de NPs a partir de polímeros pré-formados são mais apropriados para a incorporação de princípios ativos lipofílicos. Os principais métodos de preparação de NPs a partir de polímeros pré-formados são: emulsificação-evaporação de solvente, *salting-out*, emulsificação-difusão do solvente e nanoprecipitação ou precipitação interfacial de polímero. Polímeros utilizados para fins biotecnológicos devem ter características químicas, mecânicas e biológicas a fim de não comprometer a liberação do fármaco e serem biodegradáveis por via enzimática, química ou microbiana. A preparação utilizando polímeros pré-formados feita por precipitação interfacial ou nanoprecipitação permite obter nanoesferas ou nanocápsulas. Para a obtenção de nanoesferas o princípio ativo deve estar dissolvido na solução orgânica polimérica, enquanto para a obtenção de nanocápsulas o princípio ativo deve estar dissolvido em um óleo que será posteriormente emulsificado na solução orgânica polimérica antes de sua dissolução em solução aquosa contendo tensoativo do tipo O/A. Nanoesferas, portanto, são sistemas matriciais nos quais a

substância ativa está fisicamente dispersa, enquanto as nanocápsulas são estruturas vesiculares em que o fármaco está retido ou dissolvido no núcleo oleoso (**Fig. 4**) (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; SOUTO *et al.*, 2012).

Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.
(Adaptado de SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003)

Nanocápsulas apresentam vantagens por terem propriedades mais flexíveis que outras nanopartículas poliméricas, transpondo espaços entre células como o endotélio vascular, além da alta estabilidade em fluídos biológicos comparadas a outros carreadores coloidais. Nanocápsulas (NCs) também têm vantagens sobre os demais sistemas no emprego em substâncias sensíveis a temperaturas acima de 40 °C e a fotodegradação (LEITE *et al.*, 2005; MULLER *et al.*, 2004).

Em um estudo de fotoestabilidade da tretinoína, Ourique *et al.*(2008) verificaram que suspensões de NCs contendo tretinoína apresentaram meia-vida superior a solução metanólica do fármaco e que a tretinoína contida nas NCs apresentaram menor fotodegradação.

Contri *et al.*(2011) relatam em um estudo de controle de liberação de capsaicinóides contidos em NCs, um aumento no efeito analgésico dos capsaicinóides e uma diminuição na sensação de queimação na pele. O estudo ainda verificou *in vitro* que a liberação de capsaicinóides foi prolongada através das NCs.

NCs também tem potencial para uso dermatológico com a função de restringir a penetração de substâncias na pele, funcionando como filtros UV ou carrear ativos nas camadas mais profundas da pele (POLETTTO *et al.*, 2011).

Diversos polímeros são empregados na obtenção de nanopartículas como a quitosana, um polímero natural, e os sintéticos como poli(D,L-ácido láctico)(PLA), poli(lactideo-co-glicolideo)(PLGA) e poli(ϵ -caprolactona)(PCL). A PCL tem sido o polímero mais utilizado para nanocápsulas em diversos estudos, enquanto o núcleo oleoso pode ser composto de óleos vegetais e minerais como triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, e compostos puros como benzoato de benzila e oleato de octila (BENDER *et al.*,2012; KHAYATA, *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*, 2001; NECKEL & LEMOS-SENNA, 2005; SOUTO *et al.*, 2012).

A PCL (**Fig. 5**) é um poliéster alifático biodegradável e biocompatível que vem sendo utilizada em preparações de nanopartículas devido a sua hidrofobicidade, maior permeabilidade em membranas celulares, além da ausência de toxicidade (CHA & PITT, 1990; DOMINGUES *et al.*, 2008; ESPUELAS *et al.*, 1997, GUTERRES *et al.*, 2001).

Figura 5: Estrutura molecular da poli(ε-caprolactona)
(adaptado de Domingues *et al.*, 2008)

A PCL apresenta versatilidade nas formulações de NCs podendo ser usada em forma líquida ou ainda incorporada em formas sólidas ou semi-sólidas. Além da possibilidade de controle de liberação de fármacos e proteção de fotodegradação, NPs de PCL têm a propriedade de refletir a luz atuando como protetor solar (POHLMANN *et al.*, 2013).

Em um estudo de biocompatibilidade da PCL, Blanco *et al.* (2003) relataram resultados em ratos através da injeção subcutânea de microesferas de PCL contendo bupivacaína (anestésico local), sendo considerado seguro, pois havia presença de macrófagos característicos nos processos de degradação de polímeros, ausência de histaminas e de linfócitos indicando não haver processo inflamatório nem rejeição dos implantes.

O **Quadro 1** apresenta algumas referências de aplicações de NPs de PCL em diversas classes de compostos.

Quadro 1: Referências de aplicações de NPs de PCL.

Fármaco	Estudo	Referência
Indometacina (AINE)	Aumento na tolerância gastro-Intestinal <i>in vivo</i>	RAFFIN <i>et al.</i> , 2003
Melatonina	Melhora no efeito antioxidante da melatonina diminuindo os efeitos de peroxidação lipídica	SHAFFAZIK <i>et al.</i> , 2008
Haloperidol (neuroléptico)	Melhora eficácia no tratamento <i>In vivo</i>	BENVEGNÚ <i>et al.</i> , 2011
Três herbicidas triazinas	Menor genotoxicidade que a forma livre, liberação controlada diminui o impacto ambiental	GRILLO <i>et al.</i> , 2012
Insulina	Aumento no efeito hipoglicemiante em diabetes tipo-1, ação prolongada em relação a forma livre	DE ARAUJO <i>et al.</i> , 2013
Cetoprofeno (AINE)	Melhora terapêutica de glioma	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2013
Prednisolona (AIE)	Sistema de liberação oftálmica, menor toxicidade	KATZER <i>et al.</i> , 2014
Dipropionato de Beclometasona (AIE)	Liberação controlada do fármaco, sem lesões agudas nos pulmões de ratos	CHASSOT <i>et al.</i> , 2015
Lopinavir (antirretroviral)	Aumento de biodisponibilidade e no perfil farmacocinético na forma oral	RAVI <i>et al.</i> , 2015

2.4.1.1 Caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas

A avaliação do comportamento físico-químico de NPs é um parâmetro importante, embora difícil devido ao tamanho reduzido das partículas. A caracterização destas estruturas é resultado da combinação de várias análises. O FDA (*Food and Drugs and Administration*) recomenda os parâmetros diâmetro médio, carga de superfície, avaliação morfológica e outras propriedades físico-químicas quando pertinentes (FDA, 2014).

2.4.1.2 Determinação do pH

A determinação do pH em suspensões de NPs é um parâmetro importante na verificação da estabilidade das preparações em função do tempo. As alterações de pH podem indicar degradação do polímero, ou ainda hidrólise do mesmo quando há diminuição nos valores de pH. Melo *et al.* (2010) verificaram um aumento nos valores de pH em suspensões de NPs de PLA contendo benzocaína após 60 dias de estocagem em temperatura ambiente. Este aumento no valor do pH foi atribuído a agregação do polímero e liberação da fase oleosa no meio.

2.4.1.3 Potencial Zeta (ξ)

Em uma solução, NPs apresentam uma camada de íons ao redor de sua superfície. Uma segunda camada exterior difusa é composta de íons livres ocorrendo a formação de uma dupla camada elétrica ao redor da nanopartícula. Devido ao movimento Browniano ou ainda por uma força aplicada ocorre uma distinção entre os íons da camada difusa que se move com a nanopartícula e os íons que permanecem dispersos. O potencial eletrostático está neste plano de cisalhamento que é chamado de potencial Zeta e avalia a superfície de carga da nanopartícula. Para determinar o potencial Zeta aplica-se um campo elétrico através da amostra e o movimento das NPs (mobilidade eletroforética) é medido pela técnica de espalhamento de luz. Os valores indicam o grau de repulsão das NPs e, portanto, sua resistência à agregação. NPs neutras apresentam potencial Zeta entre -10 mV e +10 mV, enquanto que NPs que apresentam valores superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV (catiônicas e aniônicas, respectivamente) conferem maior estabilidade a suspensão (CLOGSTON; PATRI, 2011).

2.4.1.4 Distribuição de tamanho das nanopartículas

O tamanho das NPs é um parâmetro importante por ser um dos fatores que controlam a cinética de liberação do fármaco. A verificação de mudanças na distribuição de tamanho das NPs também é um parâmetro importante, pois é possível monitorar a homogeneidade e a tendência à agregação e sedimentação que pode afetar a estabilidade do sistema. A distribuição média de tamanho das NPs é avaliada pelo índice de polidispersividade (Pdl) onde valores inferiores a 0,20 indicam boa estabilidade da suspensão. A determinação do diâmetro médio pode ser feita por espectroscopia de correlação de fótons, que possibilita a correlação do raio hidrodinâmico das NPs, e microscopia eletrônica à partir das imagens isoladas das NPs (GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2010)

2.4.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização de nanopartículas por DSC permite acompanhar as mudanças morfológicas e estruturais induzidas por tratamento térmico em função do tempo podendo ser relacionada às transições de fase do sistema. A técnica verifica a diferença de energia aplicada entre a amostra analisada e um composto referência termicamente inerte em função da temperatura nas situações de esfriamento e aquecimento. Ponto de fusão, calor específico, transição vítrea, sublimação, decomposição, degradação oxidativa e polimerização são algumas características avaliadas pela técnica. Informações sobre a forma cristalina do polímero e interações entre o fármaco e o polímero também podem ser obtidas. (ALMEIDA *et al.*, 2010).

2.4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a avaliação morfológica de nanopartículas poliméricas, técnicas por microscopia eletrônica são utilizadas para obter informações quanto ao diâmetro e forma das mesmas. A técnica de microscopia eletrônica por varredura (MEV) consiste em fixar a amostra em um suporte metálico para posteriormente ser revestida com uma fina camada de ouro. A amostra metalizada recebe um feixe de elétrons fornecendo imagens tridimensionais da amostra permitindo aumentos de 300.000 vezes e assim imagens de alta resolução (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

2.5 Associação de fármacos a nanopartículas

Diversos sistemas de liberação de fármacos têm sido propostos para carreamento e proteção de antimicrobianos como lipossomas, nanopartículas e nanopartículas sólido-lipídicas por diminuir a toxicidade e aumentarem a disponibilidade do fármaco no tecido alvo (MARCATO *et al.*, 2009).

A encapsulação de fármacos em nanopartículas traz como vantagens a alta estabilidade, a alta capacidade de carreamento do fármaco, a possibilidade de incorporação em substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, variedade de formas de administração incluindo oral e inalatória e maior capacidade terapêutica com liberação progressiva e controlada do fármaco (GUELPERINA *et al.*, 2005).

A eficácia do uso de fármacos nanoencapsulados tem sido comprovada em vários tratamentos, incluindo quimioterapia para câncer (CHO *et al.*, 2008). NPs contendo anfotericinaB (AmB) foram empregadas em estudos de nefrotoxicidade comparadas ao fármaco livre. Neste estudo, Espuelas *et al.*, (1997) concluíram

que formulações de AmB em NPs apresentaram menor toxicidade renal em doses similares do fármaco referência Fungizone®.

No contexto da tuberculose, nanopartículas oferecem a capacidade de carreamento e redução da degradação do fármaco no sistema digestório, o aumento da estabilidade e ainda permite a utilização em meios hidrofílicos e hidrofóbicos. Além desta versatilidade, é possível o direcionamento de nanopartículas a alvos específicos, proporcionando a liberação modificada do fármaco (PANDEY & AHMAD, 2011). Anisimova *et al.* (2000) comprovaram o potencial uso de NPs para fármacos antituberculosos, ao propor o acúmulo dos fármacos nos macrófagos, bem como a atividade antimicrobiana de fármacos encapsulados sobre *M. tuberculosis* resistentes intracelulares. O estudo envolveu três fármacos: izoniazida (INH), rifampicina (RIF) e estreptomicina (ES). Os experimentos demonstraram aumento da inibição bacteriana com menor concentração do fármaco encapsulado em relação ao fármaco livre, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) para INH e ES, quatro vezes menor nos fármacos encapsulados.

Em comparação a fármacos orais, a administração de fármacos nanoencapsulados tem apresentado eficácia reduzindo a degradação na luz intestinal. O tamanho da nanopartícula facilita a captação entre as células do epitélio intestinal, reduzindo a perda do fármaco antes de atingir a circulação sanguínea e aumentando sua biodisponibilidade (PANDEY *et al.*, 2003; GUELPERINA *et al.*, 2005).

Nanopartículas também têm potencial para fármacos inalatórios para tuberculose pulmonar, forma mais comum da infecção. É possível direcionar o fármaco diretamente ao sítio da infecção, uma vez que macrófagos alveolares

contêm bacilos latentes, e nanopartículas são facilmente envolvidas pelos macrófagos. A administração por inalação pulmonar resulta em concentrações superiores do fármaco em relação à administração oral e parenteral, diminuindo as chances de disseminação da infecção para outros órgãos. Além disto, a inalação do fármaco exclui o efeito de primeira-passagem metabólica (ANISIMOVA, 2000; GUEPERINA *et al.*, 2005).

2.6 Eletroforese Capilar (CE)

Desde a década de 80 (JORGENSEN & LUKACS, 1981) a eletroforese capilar (CE) tem se popularizado como uma técnica de separação eficaz e de baixo custo e sua importância na área analítica vem aumentando expressivamente (DITTIMANN *et al.*, 1997; HELLE *et al.*, 2008; SILVA, 2003; SILVA *et al.*, 2007; TAVARES, 1996).

A Eletroforese Capilar é um método de separação baseado na migração dentro de um capilar, de solutos carregados, dissolvidos em uma solução eletrolítica, sob a influência de uma corrente elétrica (SILVA, 2003).

A Eletroforese Capilar é constituída por dois reservatórios contendo solução eletrolítica (eletrólito de corrida), ligados por um capilar de sílica fundida preenchida com a mesma solução eletrolítica. Uma haste de platina é mantida dentro de cada reservatório e conectada a uma fonte de alta tensão que fornece a diferença de potencial para que ocorra a separação. A injeção da amostra contida no reservatório pode ser eletrocineticamente (gradiente de potencial), ou hidrodinamicamente (gradiente de pressão). Conectado ao capilar encontra-se um detector que fornece os sinais a um sistema de aquisição de dados para a obtenção do eletroferograma (**Fig.6**).

Figura 6: Sistema de Eletroforese Capilar (BONATO *et al*, 2005)

A utilização de capilares como canais de migração em eletroforese permite uma diferença de potencial (ddp) de até 30 kV aumentando o desempenho e a eficiência da separação eletroforética. Além da vantagem da utilização de pequenos volumes (1-10 μL), este sistema é compatível com vários sistemas de detecção como absorção no UV-VIS, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade, espectrometria de massas, entre outras. Por possuir mecanismo de separação distinto, a CE é uma boa alternativa para quantificar fármacos com precisão (TAVARES, 1996; VEUTHEY, 2005).

2.6.1 Separação por CE

A separação dos compostos ocorre pela aplicação de voltagem, de modo que os cátions migram para o polo negativo (cátodo) e os ânions migram para o polo positivo (ânodo). Esta mobilidade eletroforética das partículas é determinada pelo

tamanho e número de cargas dos íons: na separação, quanto menor o íon e maior a sua carga mais rapidamente será a saída deste íon. A velocidade em que ocorre esta separação depende da diferença de potencial (ddp) aplicada. Outro fator importante na mobilidade dos íons é o pH das soluções, a mobilidade pode ser influenciada pelo valor do pKa, portanto quanto mais ionizada a partícula maior será sua mobilidade. Partículas neutras não são atraídas aos polos e seguem o fluxo eletrosmótico (ALTRIA, 1996; SILVA *et al.*, 2007).

O fluxo eletrosmótico é a força responsável pelo transporte dos solutos, independente da carga, ao longo do capilar e ocorre pela ionização dos grupos silanóis presentes na sílica no interior do capilar. O fluxo é gerado quando cátions presentes no eletrólito de corrida são atraídos pelos grupos silanóis formando uma camada fixa próxima à parede interna do capilar, uma segunda camada móvel de cátions é formada migrando no sentido do cátodo, na aplicação de um campo elétrico, e deslocando o volume da solução contida no capilar (SANTORO *et al.*, 2000).

A CE oferece várias estratégias de separação possibilitando a separação em diversos modos de operação de analitos carregados ou neutros. Além disto, uma variedade de capilares internamente revestidos aumenta ainda mais a possibilidade de seletividade. Estes revestimentos podem melhorar, eliminar ou inverter o fluxo eletrosmótico (ALTRIA, 1999).

2.6.2 Técnicas de separação

2.6.2.1 Eletroforese Capilar em solução livre ou de zona (CZE)

A separação por esta técnica é baseada na mobilidade eletroforética associada ao fluxo eletrosmótico de espécies eletricamente carregadas. Sob a corrente elétrica aplicada analitos carregados têm diferentes mobilidades eletroforéticas e são facilmente separados por Eletroforese Capilar de Zona (CZE). Analitos neutros co-migram com o fluxo eletrosmótico e não podem ser separados por esta técnica (USP 34, 2011).

A técnica por CZE tem sido utilizada em uma ampla gama de áreas de aplicação por utilizar uma instrumentação simples e pela fácil implementação. A amostra é injetada no capilar contendo a solução eletrolítica, e na aplicação de campo elétrico os analitos migram no sentido do detector separando-se de acordo com as mobilidades eletroforéticas de cada analito (PIÑERO, BAUZA, ARCE, 2011; SILVA, 2007; TAVARES, 1996).

2.6.2.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

As limitações da CZE para separar analitos neutros foram superadas com a introdução da Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC) por TERABE *et al.*(1984). Em MEKC tensoativos iônicos são adicionados ao eletrólito de corrida formando micelas (anfifílicas). As micelas formadas pelo tensoativo e o soluto migram com uma velocidade eletroforética diferente da fase aquosa no eletrólito de corrida, formando duas fases, permitindo a separação seletiva por partição entre os solutos neutros e a fase aquosa (TERABE, CHEN, OTSUKA, 1994).

2.7 Validação de métodos analíticos

O processo de validação de um método analítico abrange o planejamento, o desenvolvimento e os estudos estatísticos que garantirão que o método desenvolvido é adequado para a análise proposta fornecendo uma evidência documentada de sua finalidade (ICH, 2005)

A validação de métodos analíticos deve seguir as diretrizes estabelecidas por órgãos reguladores. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução Anvisa RE nº 899 estabelece os procedimentos para validação de métodos analíticos (ANVISA, 2003).

Os parâmetros fundamentais que atendam as exigências de uma validação de ensaio analítico são: linearidade, especificidade, exatidão, precisão (repetibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (GIL, 2010).

Linearidade

Linearidade é definida como a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo de atuação (ANVISA, 2003).

A determinação da linearidade exige a análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, em triplicata, de soluções-padrão. Os dados obtidos permitem determinar a equação da reta ($Y = bx + a$) e os parâmetros: inclinação (b), ponto de intersecção com o eixo Y (a), coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou calculada por regressão linear (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Limites de detecção e quantificação

Estes dois parâmetros estão associados à sensibilidade do método diferindo entre eles apenas pelo peso atribuído a cada parâmetro: 3 para limite de detecção e 10 para limite de quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor concentração detectável do analito sob condições experimentais estabelecidas, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito determinada quantitativamente com precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Precisão

A precisão de um método analítico é definida pelo grau de repetibilidade e reprodutividade entre os resultados obtidos em medições idênticas e sequenciais de uma mesma amostra. A precisão intermediária é definida pelo grau concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias, analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. O coeficiente de variação (CV) expresso em porcentagem (%) e o desvio-padrão relativo estão associados a este parâmetro (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Especificidade e Seletividade

Especificidade é a capacidade de um método analítico avaliar, inequivocamente, um analito na presença de outros componentes presentes na amostra (impurezas, produtos de degradação). O termo seletividade também é

aceito pelo ICH e sugerido como único pela IUPAC. A seletividade/especificidade de um método está relacionada à detecção. Se o método apresenta resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que apresenta respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito frente aos demais é chamado seletivo (ANVISA, 2003; RIBANI, 2004).

Exatidão

A exatidão de um método está relacionada ao grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em estudo e um valor referência. É expressa em percentual de recuperação analítica (valor obtido/valor referência). (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Robustez

A capacidade de um método analítico permanecer inalterado sob pequenas e deliberadas variações de condições de ensaio confere robustez ao método. Entre os fatores investigados na avaliação de robustez de um método estão pequenas mudanças no pH, composição da fase móvel, tipo de coluna cromatográfica, fluxo da fase móvel, temperatura. A ANVISA não determina quanto cada fator investigado pode ser variado, entretanto as variações não devem influenciar significativamente as determinações e quantificações do analito (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

2.8 Determinação quantitativa de fármacos contidos em nanopartículas

A separação da fração livre do fármaco (não contido nas NPs) e associado às nanopartículas pode ser efetuada pela técnica de ultracentrifugação, onde a concentração do fármaco livre é determinada do sobrenadante após a centrifugação e a concentração total do fármaco é determinada após dissolução das nanopartículas em solvente apropriado. A diferença obtida entre as concentrações de fármaco total e livre é a concentração de fármaco associado às nanopartículas. Outra técnica utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, onde a fase aquosa externa da suspensão é separada empregando uma membrana 10 (kDa). A concentração do fármaco livre é determinada no ultrafiltrado e assim como na técnica anterior a concentração do fármaco associado às nanopartículas é calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco total e livre (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

A quantificação das frações livre e total do fármaco é usualmente feita por espectroscopia UV ou HPLC. Quando se utiliza a detecção UV é necessário garantir que a presença do polímero não interfira na absorção de luz pelo fármaco no comprimento de onda selecionado. A quantificação por HPLC tem custo elevado devido ao uso de colunas específicas para cada análise, além do uso de grandes volumes de solventes orgânicos (AURORA-PRADO *et al.*, 2002).

Em um estudo conduzido por Helle *et al.* (2007), a determinação quantitativa de três fármacos encapsulados em nanopartículas de PLA foi efetuada por CZE e MEEKC (Cromatografia Eletrocinética em Microemulsão). Os fármacos estudados foram: sulfato de salbutamol (SS), cromoglicato de sódio (CGS) e dipropionato de beclometasona (DPB). Para a quantificação de SS e CGS (fármacos hidrofílicos) utilizou-se CZE e para DPB (hidrofóbico) a técnica utilizada foi MEEKC. O estudo

demonstrou fracas interações entre o polímero PLA e a sílica no interior dos capilares. O método desenvolvido também possibilitou verificar interações entre os fármacos e o polímero e ainda apresenta a Eletroforese Capilar como uma alternativa para quantificação de fármacos contidos em nanopartículas sem as desvantagens das demais técnicas analíticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo a síntese do éster, pirazinoato de etila, desenvolvimento das nanopartículas contendo o éster e sua quantificação por eletroforese capilar.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Síntese do éster pirazinoato de etila
- 2) Caracterização do pirazinoato de etila
- 3) Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo pirazinoato de etila
- 4) Desenvolvimento e padronização de metodologia por eletroforese capilar para quantificar pirazinoato de etila
- 5) Determinar a eficiência de encapsulação do éster nas formulações de nanopartículas

3.3 Material e métodos

3.3.1 Material

Solventes, reagentes e soluções

- Acetonitrila grau HPLC (MERCK)
- Acetona (MERCK)
- Bicarbonato de sódio
- Brometo de etila
- Clorofórmio (MERCK)
- Dodecil Sulfato de Sódio (MERCK)
- Etanol grau HPLC (MERCK)
- Metanol grau HPLC (MERCK)
- Monoesterato de sorbitan (Span 60)
- Poli(ϵ -caprolactona) (SIGMA)
- Polissorbato (Tween) 80
- Tetraborato de Sódio grau analítico (MERCK)
- Trietilamina –TEA (CRQ)
- Triglicerídes dos ácidos cáprico/caprílico
- Sulfato de magnésio (MERCK)

Equipamentos

- Aparelho para determinação de ponto de fusão M-565 (Büchi, Switzerland)
- Balança analítica Mettler modelo AB204 (Mettler Toledo, USA)

- Chapas de aquecimento e agitação (Fisatom)
- Evaporador rotatório (Büchi Switzerland)
- Placas de cromatografia em camada delgada com revelador de fluorescência a 254 nm (MERCK)
- Equipamento de ressonância magnética nuclear Bruker DPX-300, operando a 300MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C (UK)
- Equipamento Zetasizer® ZS90 Malvern Instruments (Malvern, UK)
- Equipamento Eletroforese Capilar Beckman and Coulter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, que permite a obtenção de espectros UV-VIS em tempo real de cada pico, controlador de temperatura e software 32 Karat® V.8.0 para aquisição e tratamento dos dados.
- Espectrofotômetro UV-vis HP 5483 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).
- Espectrofotômetro IR Affinity-SHIMADZU (USA)
- pHmêtro digital modelo PG1800 (Gehaka, USA)
- Sonicador S-150D (Branson, Canada)

Substâncias ativas

- Ácido Pirazinóico
- Pirazinoato de etila

3.3.2 Método

3.3.2.1 Obtenção do pirazinoato de etila

A síntese do éster do AP foi realizada através da reação de mecanismo SN_2 na presença de base. Reproduziu-se o método descrito por Fernandes *et al.* (2009) otimizando-se a reação de 24 para 6 horas (**Fig.7**). Com o uso da trietilamina (TEA) obteve-se bom rendimento na formação do produto.

Em um balão de 50 mL, equipado com aquecimento, agitação magnética e condensador de refluxo, adicionaram-se AP e TEA na proporção 1:1 (mol:mol) em acetonitrila. A mistura foi mantida em agitação e refluxo até a solubilização, e a partir desse momento deixou-se por 1h em refluxo. Brometo de etila foi utilizado em excesso e a reação foi mantida em refluxo por 6h. A mistura foi resfriada, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspenso em formol ($CHCl_3$), lavado com solução de $NaHCO_3$ a 5% e água destilada. A fase orgânica foi seca com Mg_2SO_4 , por 3 horas e evaporada sob pressão reduzida.

Figura 7: Esquema de síntese do pirazinoato de etila (adaptado de Fernandes *et al.*, 2009)

3.3.2.2 Caracterização do pirazinoato de etila

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A reação foi monitorada por CCD utilizando cromatoplaça de alumínio coberta com sílica GF245 (Merck).

As amostras foram aplicadas na parte inferior da cromatoplaca de sílicagel. Um volume adequado da fase móvel (CHCl_3) colocada dentro da cuba e a cromatoplaca é posicionada na vertical dentro da cuba de corrida que é tampada. Por capilaridade vertical e ascendente, onde os componentes são separados uns dos outros durante o percurso na cromatoplaca. Após revelação, através da lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm) e impregnação com iodo, observam-se manchas, respectivas ao composto que se deslocou na cromatoplaca. A distância percorrida pela mancha (R_f) é então medida e comparada à distância percorrida por um padrão (GIL, 2007).

Faixa de fusão

Para a determinação da faixa de fusão foram feitos três ensaios em aparelho para ponto de fusão capilar, modelo M565 Büchi no Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Com a amostra compactada em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada, colocou-se em equipamento de ponto de fusão. Inicialmente com aquecimento a uma razão de $5^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$. Quando a temperatura do equipamento atingiu 30°C , reduziu-se a velocidade do aquecimento a uma razão de $1^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$. O ponto de fusão foi definido quando a amostra tornou-se completamente líquida. O processo foi monitorado registrando-se a temperatura que não apresentou diferenças entre os três ensaios (USP 34, 2011).

Análise Elementar

A análise elementar foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ^1H e RMN- ^{13}C) foram realizadas em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo.

Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

Para a análise na região do Infravermelho utilizou-se o Espectrofotômetro IR Affinity-SHIMADZU com varredura no intervalo entre 4000 a 400 cm^{-1} para obtenção dos espectros.

Determinação do espectro de absorção do pirazinoato de etila por espectroscopia UV-vis.

Para detectar o comprimento de onda de maior absorção para o pirazinoato de etila (PE) foi utilizado espectrofotômetro UV-vis HP 8453.

Para a análise, pesou-se em balança analítica $6,7 \cdot 10^{-8}$ mmol de PE sendo solubilizado em etanol. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com etanol. Uma alíquota de 1 mL da solução padrão foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com etanol resultando na concentração final de $6,7 \cdot 10^{-9}$ mmol mL^{-1} . Outra alíquota de

0,8 mL da solução padrão foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com etanol resultando na concentração final de $5,36 \cdot 10^{-9}$ mmol mL⁻¹. As leituras das duas concentrações foram feitas entre 200 e 400 nm utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, sendo utilizado etanol como branco.

3.2.2.3 Obtenção de nanocápsulas contendo pirazinoato de etila

Nanocápsulas foram preparadas seguindo o método de Fessi *et al.* (1989) baseado na precipitação interfacial ou nanoprecipitação de polímeros pré-formados. A fase oleosa contendo o fármaco e o polímero é dissolvida em solvente orgânico e depois vertida, sob agitação, sobre a fase aquosa contendo tensoativo e água antes da remoção do solvente sob pressão reduzida em rotoevaporador.

Foram preparadas formulações de nanopartículas contendo pirazinoato de etila (PE) nas concentrações 1,05, 2,10 e 4,00 mg mL⁻¹, denominadas 1, 2 e 3 respectivamente.

Em um béquer foram pesados os componentes da fase orgânica (**Tab.3**) seguindo a fórmula base para obtenção de NPs, alterando somente as concentrações de PE.

Tabela 3: Fórmula base para obtenção de NPs pelo método de nanoprecipitação para volume final de 10 mL.

FASE ORGÂNICA	
Componentes	Pesos(g)
Poli(ϵ -caprolactona)	0,1000
Monoestearato de sorbitan (Span 60)	0,0770
Triglicerides do ác.cáprico/caprílico	0,3333
Acetona P.A. (mL)	27,0
FASE AQUOSA	
Componente	Peso(g)
Polissorbato 80	0,0770
Água purificada (mL)	53,0

Para a formulação na concentração de $1,05 \text{ mg mL}^{-1}$, pesou-se 0,0105 g de PE que foi adicionado a fase orgânica. A mistura foi homogeneizada por agitação magnética a 40°C até completa dissolução do polímero. A fase orgânica foi vertida com funil próprio na fase aquosa, sob agitação magnética a 400 rpm por 10 minutos. O solvente orgânico foi extraído por rotoevaporação sob pressão reduzida até o ajuste do volume da suspensão em 10 mL, sendo a concentração final de $1,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (m/v) de PE. O mesmo procedimento foi efetuado para as demais concentrações de PE (2,10 e $4,00 \text{ mg mL}^{-1}$). Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Para obtenção de nanocápsulas vazias a suspensão foi preparada seguindo a fórmula base, porém sem adição do fármaco.

3.2.2.4 Caracterização físico-química das nanocápsulas

A caracterização de nanopartículas (NPs) foi obtida pelos parâmetros: diâmetro médio, potencial Zeta, polidispersividade, pH, análise por DSC e MEV.

Tamanho médio, potencial Zeta e polidispersividade

O tamanho médio, potencial Zeta e polidispersividade foram determinados por espectroscopia de espalhamento de luz laser com o auxílio do equipamento Zetasizer® ZS90 Malvern Instruments. As suspensões de NPs contendo PE e sem PE foram diluídas (1:200 v/v) em água purificada. Todos os ensaios foram conduzidos em temperatura ambiente. As determinações foram feitas logo após o preparo das suspensões e após 40 dias conservadas a 4 °C.

Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através de potenciômetro previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0. As determinações foram feitas logo após o preparo das suspensões e após 40 dias conservadas a 4 °C.

Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC do pirazinoato de etila, NPs vazias e NPs contendo PE foram obtidas em calorímetro diferencial exploratório Shimadzu DSC-60/60A, em

atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ através do aquecimento das amostras de 25 a $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura foram preparadas dois tipos de amostras. Na primeira, a suspensão de nanopartículas foi liofilizada utilizando-se sacarose como crioprotetor a 10% na concentração final. Na segunda, a suspensão foi depositada em lamínula de silicato e seca em dessecador por 24 h. Posteriormente as amostras foram fixadas sobre suportes de alumínio e recobertas com camada de ouro de 21 nm para avaliação morfológica em microscópio eletrônico de varredura (Nova Nano SEM-FEI 400).

3.4 Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para quantificação do pirazinoato de etila contido em nanopartículas

Para o desenvolvimento do método por eletroforese capilar (CE), diferentes condições experimentais foram testadas para obter as condições analíticas adequadas para a quantificação do pirazinoato de etila em nanopartículas. As condições de trabalho estão na **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições de trabalho para desenvolvimento de método por CE.

Coluna capilar	sílica fundida com 30,5 cm de comprimento (20 cm até det.) e $50 \text{ } \mu\text{m}$ d.i.
Deteção UV	268 nm
Voltagem aplicada	12 a 20 kV
Temperatura interna do capilar	15 a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Condicionalamento do capilar de sílica fundida

Para o condicionalamento do capilar de sílica fundida foi utilizada solução de NaOH 1 Molar por 30 minutos, água Milli-Q por 20 minutos e 30 minutos com o eletrólito de corrida.

Soluções e tampões

Solução tampão tetraborato de sódio (TBS) 100 mmol.L⁻¹ :

Foram pesados 1,907 g de tetraborato de sódio e transferido para balão volumétrico de 50 mL e solubilizado com água Milli-Q.

Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 100 mmol.L⁻¹ :

Foram pesados 1,44 g de duodecil sulfato de sódio e transferido para balão volumétrico de 50 mL e solubilizado com água Milli-Q.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹ :

Foram pesados 2,0 g de hidróxido de sódio e transferido para balão volumétrico de 50 mL e solubilizado com água Milli-Q.

Eletrólitos de trabalho :

CZE : Em um balão volumétrico de 10 mL foram transferidos 2 mL de solução de TBS 100 mmol L⁻¹. A solução foi sonicada por 15 minutos. Após verificação de pH a solução apresentou pH 9,43.

MEKC : Foram transferidos 2 mL de TBS 100 mmol . L⁻¹ para um balão de 10 mL, em seguida completou-se o volume com solução de SDS 100 mmol L⁻¹. A solução foi levada ao sonicator por 15 minutos.

Soluções de amostras :

Solução estoque de pirazinato de etila $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$: 5 mg de pirazinato de etila foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com etanol.

Solução trabalho de pirazinato de etila $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$: 400 μL da solução estoque foram transferidos para eppendorf e adicionados 700 μL de etanol. A solução foi sonicada e filtrada em filtro 0,45 μm .

Validação do método analítico por CE para quantificação do pirazinato de etila

A validação do método por CE seguiu os seguintes parâmetros:

- Coluna capilar de sílica fundida com 30,5 cm de comprimento
- Voltagem aplicada de 13 kV
- Detecção UV a 268 nm
- Temperatura interna do capilar a 15 °C

Linearidade

Para o cálculo da linearidade foram preparadas soluções a partir da solução padrão de pirazinato nas concentrações entre 320 a 480 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram feitas em triplicata. Obteve-se a curva analítica a partir da razão entre as áreas dos picos e as concentrações de pirazinato de etila.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração. Foram efetuadas três leituras para cada concentração.

O cálculo para a LD e LQ foi realizado pelas equações a seguir:

$$LD = \frac{DP}{I} \times 3$$

$$LQ = \frac{DP}{I} \times 10$$

Equação(1): Limite de detecção

Equação(2): Limite de quantificação

Precisão/Repetibilidade

A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) (**Eq. 3**). Uma solução de pirazinato de etila ($300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi injetada por 9 vezes consecutivas a fim de avaliar a repetibilidade no sistema.

$$DPR(\%) = \frac{DP}{CM} \times 100$$

Equação(3): cálculo do coeficiente de variação

Dados: DPR: Desvio Padrão Relativo

DP: Desvio padrão

CM: Concentração média

Para a precisão intermediária, foram feitas seis determinações, utilizando o mesmo equipamento, nas mesmas concentrações e condições de trabalho do ensaio de repetibilidade, entretanto em dias diferentes.

Especificidade

Para a especificidade foi verificada a ausência de interferências pelos excipientes que fazem parte das nanopartículas (polímero e óleos). Nanopartículas sem o éster foram preparadas e analisadas nas mesmas condições das amostras contendo éster.

Exatidão

Para o parâmetro exatidão, alíquotas da solução estoque de PE foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL contendo 5,0 mg de placebo (componentes das NPs) e fortificadas com alíquotas da solução estoque de PE. Foram preparadas 9 soluções com as respectivas concentrações 80, 100 e 120%. O volume foi completado com etanol grau HPLC. O cálculo da exatidão foi verificado pela equação:

$$Exatidão = \frac{CME}{CT} \times 100$$

Equação(4): cálculo da exatidão

Dados: CME: Concentração Média Encontrada

CT: Concentração teórica

Robustez

A robustez foi avaliada através da análise da amostra modificando-se os seguintes parâmetros: tempo de injeção da amostra e voltagem (**Tab.5**).

Tabela 5: Parâmetros eletroforéticos alterados para o ensaio de robustez.

Parâmetro	Nominal	Variação
Tempo de injeção (segundos)	3	5
Voltagem aplicada (kV)	13	14
Temperatura (°C)	15	17

3.5 Determinação da eficiência de encapsulação

Para a determinação da concentração do éster contido nas NPs procedeu-se a técnica da ultrafiltração/centrifugação, em que o éster livre (não encapsulado) foi determinado no ultrafiltrado, e a concentração total do éster contido na formulação foi verificada após dissolução das NPs na suspensão. Os procedimentos foram efetuados em triplicata.

Para obter o ultrafiltrado, alíquotas de 0,4 mL das suspensões de NPs foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 15 minutos sob temperatura de 4 °C em unidades de ultrafiltração com membrana de 10 kDa (Amicon®-MerckMillipore). O ultrafiltrado foi diluído em etanol grau HPLC na proporção 1:5 (v/v) para análise no equipamento de eletroforese capilar.

Para obter a concentração total do éster na suspensão de NPs, 1 mL de acetonitrila foi adicionado a 1 mL da suspensão de NPs e deixado em repouso durante 4 horas para dissolução das NPs. Seguiu-se a filtração em membrana 0,22 µm (Millipore®) a fim de reter eventuais resíduos do polímero. O filtrado total

da dissolução de NPs foi diluído em etanol grau HPLC na proporção 1:5 (v/v) e injetado no equipamento de eletroforese capilar.

As concentrações do éster no ultrafiltrado e total contido na suspensão foram determinadas por CE em método previamente validado.

A eficiência de encapsulação (EE) foi verificada de acordo com a equação:

$$EE(\%) = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100$$

Equação(5): cálculo da eficiência de encapsulação

Dados:

C_t = Concentração total do éster contido na suspensão de NPs após dissolução

C_f = Concentração do éster livre contido no ultrafiltrado.

Os cálculos das concentrações do ultrafiltrado e total foram efetuados a partir da equação da reta da curva analítica do éster.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização do éster do ácido pirazinóico

A etapa da síntese do éster do ácido pirazinóico, pirazinoato de etila foi concluída. A reação por substituição nucleofílica na presença de TEA (base), utilizando-se brometo de etila, possibilitou a obtenção do éster em uma única etapa com bom rendimento. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD). A formação do produto foi evidenciada por CCD em triplicata e em três diluições do eluente, empregando-se clorofórmio: metanol (3:1) média R_f = 0,83; (1:1) média R_f = 0,85 e (9:1) média R_f = 0,85. Obteve-se um sólido amarelo cristalino. O éster teve sua estrutura confirmada através das análises de

espectroscopia IV, RMN H^1 e C^{13} e sua pureza foi avaliada pela faixa de fusão e DSC. A **Figura 4** representa a estrutura molecular do éster obtido.

Faixa de fusão: 44- 45 °C

Rendimento: 78%

Figura 8: Pirazinoato de etila

Análise elementar

A análise elementar determina os elementos que compõem a amostra e a proporção de cada elemento na amostra. A análise elementar é uma análise qualitativa e quantitativa principalmente de carbono(C), hidrogênio(H) e nitrogênio(N), que associada a RMN de 1H e ^{13}C , permite obter informações importantes sobre a estrutura molecular da amostra (HASSAN *et al.*, 1983). Na caracterização e avaliação do grau de pureza da molécula é aceitável um desvio de até 0,5% entre o valor experimental e o teórico.

Quadro 2: Análise elementar teórica e experimental do PE

Amostra	% C	% H	% N
teórico	55,26	5,3	18,41
experimental	55,13	5,24	18,31

Ressonância Magnética Nuclear

Observa-se na **figura 9** o espectro de RMN ^1H com as atribuições dos sinais na molécula confirmando a obtenção do éster. Os sinais do anel aromático encontram-se entre 9,32 e 8,74 ppm referente aos hidrogênios dos carbonos 7, 4 e 5 respectivamente. Em 4,56 ppm observa-se um multipeto do CH_2 ligado ao oxigênio. Finalmente, encontra-se um triplete em 1,49 ppm referente aos hidrogênios ligados ao carbono 2' da cadeia lateral.

^1H -RMN (300MHz, CDCl_3 , TMS) : 9,32ppm (d, H7, $J=1,30$ HZ, 1 H); 8,78ppm (d, H4, $J=2,40$ HZ, 1H); 8,74ppm (dd, H5, $J=2,38$ HZ, 1H); 7,32ppm (s, CDCl_3); 4,56ppm (m, H1', $J=7,14$ HZ, 2H); 1,49ppm (t, H2', $J=7,14$ HZ, 3H).

Figura 9: Espectro de ^1H -RMN do Pirazinoato de Etila indicando os sinais para identificação do éster.

A **Figura 10** representa o espectro RMN de Carbono (C) com as atribuições dos sinais em ppm. O éster possui 7 carbonos sendo quatro aromáticos (C2,C4,C5 e C7), um carbono carbonílico (C1) e dois carbonos na cadeia lateral (C1' e C2'). No espectro é possível observar os sinais do carbono carbonílico (C1) em 163,95 ppm, os carbonos na região dos aromáticos (C2,C4,C5 e C7) entre 147,63 e 143,66 ppm, e a região alquílica da cadeia lateral entre 62,38 ppm (C1') e em campo mais alto 14,28 ppm (C2').

Figura 10: Espectro de ¹³C-RMN do Pirazinoato de Etila indicando os sinais para identificação do éster.

Espectroscopia no IV do pirazinoato de etila

A **figura 11** apresenta as bandas de absorção na região do IV dos grupos C=O, C-H, N-H e C-O do éster. O espectro apresenta uma banda intensa de estiramento da ligação C=O tipicamente de ésteres em 1740 cm^{-1} . Os valores referenciais das atribuições das bandas aos grupos estão na **Tabela 6** (PAVIA *et al.*, 2012).

Figura 11: Espectro de absorção no IV do PE.

Tabela 6: Valores de absorção no Infravermelho

$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Atribuição
3350 – 3380	Deformação axial do N-H
3000 – 3050	Deformação axial da ligação C-H aromáticos
1750 – 1735	Deformação axial éster C=O
1275 – 1020	Deformação éster aromático O-CO

Os dados obtidos através da análise dos espectros no IV do PE permitem verificar a presença de bandas características de éster em regiões distintas do espectro.

Espectroscopia no UV-Vis do pirazinoato de etila

Os espectros de absorção no UV (**Fig.12**) apresentaram um máximo de absorção em 268 nm.

Figura 12: Espectro de absorção UV do PE: $6,7 \cdot 10^{-9} \text{ mmol mL}^{-1}$ e $5,36 \cdot 10^{-9} \text{ mmol mL}^{-1}$

4.2 Obtenção e caracterização físico-química de nanopartículas contendo pirazinoato de etila

Nanopartículas (NPs) contendo pirazinoato de etila foram preparadas pelo método de nanoprecipitação utilizando acetona na fase orgânica para solubilizar o fármaco e o polímero, sendo facilmente extraída por rotoevaporação. Foram preparadas suspensões de nanocápsulas com e sem pirazinoato de etila. A fim de acompanhar o comportamento das NPs nas preparações, foram determinados os valores de pH das suspensões, o diâmetro médio, polidispersividade, potencial Zeta, DSC e MEV. Após o preparo, as suspensões apresentaram aspecto leitoso e homogêneo (**Fig13**). Foi possível observar um reflexo azulado semelhante ao

descrito na literatura para sistemas de nanocápsulas obtidas pelo método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados (SCHAFFAZIK *et al.*, 2006).

Figura 13: Suspensão de NPs contendo pirazinoato de etila

Diâmetro médio e polidispersividade (Pdl)

Os resultados de diâmetro médio e Pdl das nanopartículas demonstraram que a suspensão sem fármaco (A) apresentou uma distribuição unimodal com diâmetro médio de 323 nm e Pdl de 0,117 e as suspensões com fármaco (B) apresentaram uma distribuição unimodal com diâmetros médios entre 338 a 359 nm e Pdl de 0,120 (**Fig.14**). Não foi verificada diferença significativa (**Tab.7**) nos diâmetros médios das NPs das amostras 1, 2 e 3, sugerindo não haver influência da concentração do éster no tamanho das NPs. Os valores são referentes às medidas de triplicatas para cada amostra. As suspensões apresentaram NPs com diâmetros médios compatíveis com os descritos na literatura para sistemas

nanoestruturados preparados por nanoprecipitação com polímero PCL. As NPs apresentaram valores médios de Pdl entre 0,12 e 0,16 indicando homogeneidade das suspensões (MULLER *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

Potencial Zeta

Os polímeros constituintes das nanopartículas podem influenciar o potencial Zeta. A literatura descreve que os poliésteres como a PCL fornecem um potencial negativo à interface (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os resultados de potencial Zeta (**Fig. 15 e Tab. 2**) para as suspensões de NPs apresentaram-se negativos para NPs sem fármaco (A) e com fármaco (B).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,1	Peak 1: -34,1	100,0	4,84
Zeta Deviation (mV): 4,84	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00415	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

A

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,9	Peak 1: -33,9	100,0	3,91
Zeta Deviation (mV): 3,91	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00188	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

B

Figura 15: Representação gráfica do potencial Zeta das NPs: sem fármaco (A) e com fármaco (B)

As suspensões com e sem pirazinato de etila apresentaram médias de potencial Zeta negativos devido a grupamentos éster do polímero PCL e de acordo com valores descritos na literatura para formulações que utilizam este polímero, bem como a presença de polissorbato 80 nas formulações que também tem influência sobre o potencial de superfície (KÜLKAMP *et al.*, 2009; MULLER *et al.*, 2011).

Determinação do pH

As determinações dos valores de pH das suspensões de NPs (**Tab.7**) foram realizadas logo após o preparo. As suspensões apresentaram um pH ácido característico de preparações com PCL (CRUZ *et al.*, 2006). Em relação à estabilidade das suspensões os valores de pH obtidos nas preparações com fármaco e sem fármaco não sofreram alterações significativas após 40 dias de armazenamento a 4 °C.

Tabela 7: Características físico-químicas das suspensões de nanopartículas logo após o preparo (DP: desvio padrão referente à triplicata do lote).

	Diâmetro (nm ± DP)	Potencial Zeta (mV ± DP)	Pdl	pH
NPs vazias	323,4 ± 98	-34,1 ± 4,84	0,12	5,60
NPs com PE (1)	359,2 ± 105	-33,9 ± 3,91	0,12	5,57
NPs com PE (2)	338,2 ± 99	-28,8 ± 6,48	0,13	5,50
NPs com PE (3)	343,3 ± 101	-32,9 ± 4,91	0,16	5,10

Os resultados indicaram não haver diferença significativa do potencial Zeta entre as NPs contendo PE e NPs vazias, entretanto observou-se um pequeno aumento no diâmetro médio nas NPs contendo PE.

Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC do pirazinoato de etila (PE), NPs vazias e NPs contendo PE estão representadas na **Figura 16**.

Figura 16: Curva DSC: A) pirazinoato de etila, B) NPs vazias e C) NPs com pirazinoato de etila (razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL min⁻¹)

A curva DSC do pirazinoato de etila (A) representado por um pico endotérmico bem definido e simétrico, característico de transição de fase da fusão próximo de 45 °C e decomposição em 230,7 °C. A curva DSC das nanopartículas vazias(B) apresentou um pico endotérmico em 50,1 °C valor relatado na literatura para o polímero utilizado. A curva DSC das nanopartículas contendo pirazinoato de etila(C) apresenta apenas um pico endotérmico em 50,5 °C e não se observa o pico de decomposição presente na DSC do fármaco puro, evidenciando ausência de mudança de fase e comprovando uma mudança no comportamento térmico do fármaco contido nas NPs (GUO; GROENINCKX, 2001).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a morfologia e tamanho das nanopartículas que se apresentaram esféricas e com diâmetros variando entre 248 nm e 374 nm.

As preparações contendo sacarose a 10% e submetidas a liofilização apresentaram as nanopartículas aglomeradas em meio a uma matriz amorfa do crioprotetor reduzindo a visualização individualizada das nanopartículas (**Fig.17**). As preparações submetidas ao dessecador apresentaram nanopartículas dispersas com morfologia preservada (**Fig.18**).

Figura 17: Micrografia por MEV de nanopartículas de PCL contendo PE (A) e sem PE (B) submetidas a liofilização na presença de crioprotetor.

Figura 18: Micrografia por MEV de nanopartículas de PCL contendo PE (A) e sem PE (B) submetidas ao dessecador.

As imagens obtidas por MEV (**Fig.17**) apresentam NPs com diâmetros próximos aos obtidos por espectroscopia de correlação de fótons.

4.3 Desenvolvimento do método por eletroforese capilar para quantificação do pirazinoato de etila

Para desenvolver o método por eletroforese capilar, diversas condições de trabalho foram testadas. Inicialmente trabalhou-se com eletroforese capilar de zona (CZE) por se tratar de uma técnica simples e amplamente utilizada. Experimentalmente foram realizadas análises em CZE utilizando tampão borato com pH 9,4, a tensão aplicada variou de 12 a 25 kV, entretanto o pirazinoato de etila co-migrou com o fluxo eletrosmótico. O pirazinoato de etila foi dissolvido em etanol. A **Figura 19** representa os resultados das análises experimentais por CZE.

Figura 19: Eletroferograma do pirazinoato de etila ($400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido pirazínico $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: TBS 20 mmol mL^{-1} , pH 9.4, detecção UV em 268 nm, tensão 20kV, injeção hidrodinâmica 0,5 psi/ 3.s, capilar de sílica fundida $30 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m d.i.}$, temperatura 18°C .

O pirazinoato de etila tem um logP igual a 0,084, que confere uma alta lipofilicidade. A **Figura 20** apresenta em uma escala de pH, predominância de espécie neutra.

Figura 20: Ionização do pirazinoato de etila (chemicalize.org)

Para separar o analito do fluxo eletrosmotico foi utilizado o método cromatografia eletrocinetica micelar (MEKC), utilizada para substâncias neutras. Neste estudo foi usado o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) para a formação de micelas. As micelas aniônicas têm mobilidade contrária ao FEO e, portanto velocidade de migração diferente do eletrólito permitindo a separação de picos. Neste estudo a velocidade do fluxo eletrosmótico é alto devido ao pH 9,1 do eletrólito, como resultado as micelas são carregadas na direção do detector. O éster (lipofílico) ligando a porção hidrofílica da micela, migrando em direção ao detector em velocidade diferente do fluxo.

Diferentes condições experimentais em MEKC foram testadas. As concentrações do surfactante foram avaliadas entre 20 a 80 mmol mL⁻¹. Nas concentrações de surfactante entre 20 e 50 mmol mL⁻¹ o pico correspondente ao éster não separou do fluxo. Nas concentrações de 60 e 70 mmol mL⁻¹ foi possível a separação porém, ainda muito próximo ao fluxo. Optou-se pela concentração de 80 mmol mL⁻¹ devido a resolução adequada entre os picos (pirazinoato de etila e ácido pirazinoico (p.i.). A separação de analitos por micelas não sofre influência significativa com o ajuste do pH desde que as mesmas migrem em uma taxa diferente do EOF. Assim o valor de pH 9,1 do eletrólito de corrida foi mantido devido a boa resolução das separações. O valor do potencial aplicado variou de 12 a 20 kV, a escolha de 13 kV permitiu uma separação com boa resolução e menor tempo de migração. Para a escolha do padrão interno foi considerada a boa resolução apresentada experimentalmente pelo ácido pirazinoico. O capilar selecionado tem 50 µm de diâmetro interno e comprimento total de 30 cm.

A **Figura 21** apresenta as condições eletroforéticas do método desenvolvido.

Figura 21: Eletroferograma do pirazinoato de etila (300,0 µg mL⁻¹), ácido pirazinoico (100,0 e 400,0 µg mL⁻¹). Condições: TBS 20 mmol mL⁻¹ + SDS 80 mmol mL⁻¹, pH 9,1, detecção UV em 268 nm, tensão aplicada de 13 kV, injeção hidrodinâmica 0,5 psi/ 3.s, capilar de sílica fundida 30 cm x 50 µm d.i., temperatura 15 °C.

O método desenvolvido por MEKC foi selecionado para validação utilizando o ácido pirazinóico como padrão interno apresentando boa resolução sem aumentar significativamente o tempo de análise.

4.3.1 Validação do método analítico para quantificação do éster por MEKC

Na validação foram usados os seguintes parâmetros:

- Colunas capilares de sílica fundida com 50 μm d.i. e 30 cm de comprimento total (20 cm até detector).
- Temperatura da coluna: 15 $^{\circ}\text{C}$
- Detecção UV: 268 nm
- Voltagem: 13 kV
- Eletrólito de corrida: Tampão Borato de Sódio 20,0 mmol L^{-1} , Dodecil sulfato de sódio 80,0 mmol L^{-1} , pH 9,1.

Especificidade

Observa-se na **Figura 22** que nenhum dos excipientes presentes no placebo apresentam picos nas regiões do analito e padrão interno. Assim pode-se considerar que o método é específico.

Figura 22: Eletroferograma (A) fármaco e padrão interno (PE 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e AP 400, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) placebo. Condições de trabalho por MEKC: TBS 20 mmol L^{-1} + SDS 80 mmol mL^{-1} , pH 9,1, tensão aplicada 13 kV, injeção hidrodinâmica 0.5 psi/ 3s, temperatura 15 °C. Coluna capilar de sílica fundida 20 cm até detector e 50 μm de diâmetro. Detecção UV em 268 nm.

Linearidade e limites de detecção e quantificação

A **Figura 23** apresenta a curva analítica do pirazinoato de etila obtida a 268 nm. O método mostrou-se linear no intervalo entre 80 a 120%. Os valores experimentais obtidos para a curva analítica estão na **Tabela 8**. O coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,998 atendendo as exigências da Anvisa ($>0,99$).

Figura 23: Curva analítica do PE na faixa de concentrações entre 320,0 a 480,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 8: Resultados obtidos por CE para reta analítica do PE. Detecção 268 nm.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão PE/PI das Áreas dos picos (AU)*
320	2181
360	2669
400	3333
440	3858
480	4341
Inclinação (b)	13,7725
Desvio padrão da inclinação	0,05405
Intercepto (a)	-2,2326
Coef. de determinação (r2)	0,9986

*AU: Unidade de absorvância.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são apresentados no **Quadro 3**.

Quadro 3: Resultados relativos ao LD e LQ do PE por MEKC. Detecção 268 nm.

Pirazinoato de etila	
LD	3,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$
LQ	9,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Exatidão

A exatidão do método foi calculada através do ensaio de recuperação analítica do fármaco dada em porcentagem. Foram preparadas soluções (placebo fortificado com solução do éster) nas concentrações de $320,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (80%), $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (100%) e $480,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (120%). As análises foram feitas em triplicata para cada concentração. A **Tabela 9** apresenta os valores de recuperação obtidos em cada concentração.

Tabela 9: Resultados para avaliação da exatidão do método por MEKC.

Concentração Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
320	308	96,2
320	304	95,0
320	316	98,7
	Média	96,6
	DP	1,88
400	400	100
400	393	98,3
400	396	99,1
	Média	99,1
	DP	0,85
480	475	99,0
480	477	99,4
480	476	99,2
	Média	99,2
	DP	0,20

A porcentagem média encontrada foi de 98,3% e estão de acordo com os limites aceitáveis de recuperação (95 a 105%) (ANVISA, 2003)

Precisão/repetibilidade do método

As medições relacionadas à repetibilidade estão apresentadas na **Tabela 10**.

O desvio padrão relativo (DPR), expressado em porcentagem para a razão das áreas dos picos pirazinato de etila/padrão interno (PE/PI) foi de 2,67%, valor abaixo do máximo estabelecido (5%) indicando que o método é preciso.

Tabela 10: Resultados para avaliação da repetibilidade método analítico por CE.

Ensaio	Razão das áreas dos picos PE/PI
1	0,407
2	0,412
3	0,418
4	0,411
5	0,440
6	0,433
7	0,412
8	0,411
9	0,418
Média	0,418
DP	0,0112
%DPR	2,67

Precisão intermediária

Para a precisão intermediária foram usados os mesmos parâmetros e concentrações do ensaio de repetibilidade, mas em dois dias diferentes. Foi calculado o %DPR entre as seis replicatas. Os resultados estão na **Tabela 11**.

Tabela 11: Resultados da precisão intermediária método analítico por CE.

Ensaio	Razão das áreas dos picos PE/PI	Razão das áreas dos picos PE/PI
	Dia 1	Dia 2
1	0,418	0,420
2	0,416	0,416
3	0,413	0,412
4	0,413	0,413
5	0,411	0,417
6	0,418	0,413
Média	0,415	0,415
DP	0,0110	0,0111
%DPR	2,67	2,67

A partir da comparação entre os valores de DPR encontrados nos ensaios foi verificado que não há diferença entre as variâncias das análises em dias diferentes.

Robustez

Para a execução do ensaio de robustez, soluções de trabalho contendo 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram injetadas e analisadas em condições otimizadas (nominal) e variadas do método analítico proposto. Foram avaliados os efeitos das alterações em relação às variáveis do método. A **Tabela 11** apresenta os valores obtidos.

Tabela 12: Resultados para avaliação da robustez do método por CE.

	Amostras (%)			Média	DPR
	1	2	3	(%)	(%)
Parâmetro					
<i>Nominal</i>	100	97,6	97,6	98,3	1,38
Tempo injeção	103	97,3	100	100,1	2,84
Voltagem	97,5	100	97,5	98,3	1,44
Temperatura	100	96,9	100	98,9	1,81

Com base na **Tabela 11** foi possível observar que pequenas variações nas condições eletroforéticas não interferem significativamente nos resultados, assim o método pode ser considerado robusto. Variações no tempo de injeção da amostra evidenciaram um aumento no CV em relação aos demais parâmetros alterados indicando que este parâmetro, se alterado deliberadamente, poderá comprometer a análise.

4.4 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do éster

A quantificação do éster nas formulações foi efetuada por CE previamente validado. As **Figuras 24** e **25** representam respectivamente os eletroferogramas do éster no ultrafiltrado (livre) e após completa dissolução das NPs. As áreas dos picos foram transferidas para a curva analítica do método para o cálculo das concentrações do éster. Os valores das concentrações obtidas foram transferidas para a Equação 5 para o cálculo da EE%.

Figura 24: Eletroferograma de PE em ultrafiltrado de suspensão de NPs. Condições de trabalho por CE: TBS 20 mmol L⁻¹ + SDS 80 mmol mL⁻¹, pH 9,1, tensão aplicada 13 kV, injeção hidrodinâmica 0.5 psi/ 3s, temperatura 15 °C. Coluna capilar de sílica fundida 20 cm até detector e 50 µm de diâmetro. Detecção UV em 268 nm.

Figura 25: Eletroferograma de PE total contido em suspensão de NPs. Condições de trabalho por CE: TBS 20 mmol L⁻¹ + SDS 80 mmol mL⁻¹, pH 9,1, tensão aplicada 13 kV, injeção hidrodinâmica 0.5 psi/ 3s, temperatura 15 °C. Coluna capilar de sílica fundida 20 cm até detector e 50 µm de diâmetro. Detecção UV em 268 nm.

A eficiência da encapsulação das formulações 1, 2 e 3 foram respectivamente 62,6, 71,2 e 72,8%. Os valores de EE% são variáveis na literatura para preparações de NPs de PCL contendo diferentes fármacos. Estudos indicam que a EE é influenciada pela quantidade de fármaco adicionada as formulações que utilizam polímeros como a PCL. Outros fatores podem influenciar a EE como a solubilidade do fármaco na fase orgânica, quanto mais hidrossolúvel o ativo mais facilmente se difunde para a fase aquosa e a EE é diminuída (KÜLKAMP, 2009; SCHAFFAZICK, 2003; SOUTO *et al*, 2011).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O éster do ácido pirazinóico, pirazinoato de etila, foi sintetizado e caracterizado por análise diferencial, faixa de fusão, calorimetria exploratória diferencial, análise espectroscópica por IV e RMN H^1 e C^{13} .
- Foi possível obter nanopartículas contendo éster do ácido pirazinóico através do método de precipitação interfacial. O diâmetro médio e potencial Zeta das nanopartículas estão dentro dos valores relatados na literatura para o polímero utilizado.
- O método desenvolvido por Eletroforese Capilar foi validado e atende as diretrizes da RE 899/2003 e ICH e mostrou-se bastante apropriado para a quantificação do éster contido nas nanopartículas.
- As eficiências de encapsulação do pirazinoato de etila ficaram entre 62,3 e 72,8% e podem ser consideradas satisfatórias comparadas a valores descritos na literatura para NPs do polímero utilizado.
- A nanoestruturação do éster pelo método proposto mostra-se como uma estratégia interessante, viável e promissora para obtenção de nanopartículas contendo ésteres do ácido pirazinóico.
- Este trabalho direcionou as pesquisas a uma alternativa terapêutica no tratamento da tuberculose bem como o desenvolvimento de método analítico por CE rápido, simples, econômico e adequado no ponto de vista ambiental para a determinação do fármaco contido em nanopartículas.

6 REFERÊNCIAS

AGUAYO, M.; RODRIGUEZ, J. C. Hígado e terapia antituberculosa. **Revista Chilena Enfermedades Respiratorias**, v. 27, p.53-57, 2011.

ALMEIDA, M. M.; LIMA, C. R. R.; QUENCA-GUILLEN, J. S.; MOSCARDINI-FILHO, E.; MERCURI, L. P.; SANTORO, M. I. R. M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Stability evaluation of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in isolation and incorporated in cosmetic formulations using thermal analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.1, p. 129-134, 2010.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook**: Principles, operation and applications, v.52, Towota: Human Press, 1996

ANISIMOVA, Y.V. Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Nanoparticle Research**, v.2, n.2, p.165, 2000.

ANVISA, Resolução- RE nº 899, 29 de maio de 2003. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 23 set. 2014.

AURORA-PRADO, M.S.; STEPPE, M.; TAVARES, M.S.M.; KEDOR-HACKMANN, E. R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of diclofenac sodium in pharmaceutical tablet. **Journal of AOAC International**, v.85, n.2, p.333-340, 2002.

BARRIOS, J.G.; FARIAS, G.DA; ROGGIA, I.; PEIXOTO, S.C.; PONS, F.R.; BRUSCHI, M.; RAFFIN, R.P.; ALVES, M.P. Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. **Química Nova**, v.34, n.8, p.1464-1467, 2011.

BENDER, E.A; ADORNE, M.D.; COLOMÉ, L.M.; ABDALLA, D.S.P.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.R. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecitin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Phamaceutics**, v.426, n,1, p.271-279, 2012.

BENVEGNÚ, D.M.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; PASE, C.S.; OURIQUE, A.F.;BECK, R.C.R.; BÜRGER, M.E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,v.77,n.2,p.332-336,2011.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; SASTRE, R.L.; OLMO, R.; MUÑIZ, E.; TEIJÓN, J.M. Preparation of bupivacaine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, n.2, v.55, p.229-236, 2003.

BONATO, S.P.; JABOR, V. A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Tuberculose- guia de vigilância epidemiológica/ elaborado pelo Comitê Técnico-Científico de assessoramento à tuberculose e Comitê Assessor para co-infecção HIV-Tuberculose. – Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

_____, Ministério da Saúde. O controle da tuberculose no Brasil. Boletim epidemiológico, v.44, n.2, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-44--2----Tuberculose.pdf>. Acesso em fevereiro de 2015.

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.- Brasília: Ministério da Saúde, 284p.,2011.

_____, Ministério da Saúde. Tuberculose, população indígena e determinantes sociais. Boletim Epidemiológico, v.45, n.18, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/13/BE-2014-45--18----Tuberculose.pdf>. Acesso em junho de 2015.

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. Boletim Epidemiológico, v.46,n.9,2015.Disponível: [http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose .pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose.pdf). Acesso em junho de 2015.

BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, n. 3, p. 91-97, 2003.

CARVALHO, M.S.; MENDONÇA, M.A.; PINHO, D.M.M.; RESCK, I.S.; SUAREZ, P.A.Z. Chromatographic Analyze of Fatty Acid Methyl Esters by HPLC-UV and GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.4, p.763-769, 2012.

CEInfo - Coordenação de Epidemiologia e Informação da SMS-SP: **Saúde em Dados**, n.13, 2014.

CHA, Y.; PITT, C.G. The biodegradability of polyester blends. **Biomaterials**, v.11, n.2, p.108-112, 1990.

CHASSOT, J.M.; RIBAS, D.; SILVEIRA, E.F.; GRÜNSPAN, L.D.; PIRES, C.C.; FARAGO, P. V.; BRAGANHOL, E.; TASSO, L.; CRUZ, L. Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development,*In Vitro* Cytotoxicity,

and *In Vivo* Evaluation of Acute Lung Injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15,n.1,p.855-864,2015.

CHAVEZ, F.; OLVERA, B. I.; GANEM, A.; QUINTANAR, D. Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 46, n. 4, p. 349-356, 2002.

CHIN, C.M.; FERREIRA, E.I.O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.2, n.1, 1999.

CHO K, WANG X, NIE S, CHEN ZG, SHIN DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.14, n.5, p.1310-1316, 2008.

CHUNG, M-C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.2, n.1, 1999.

CHUNG, M-C; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, abr/jun, 2005.

CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. Zeta Potential Measurement. In: **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**. McNeil, S.E., ed. New York: Humana Press. p.63-70,2011.

COLL, P. Fármacos com actividade frente a *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.21, p.299-308, 2003.

CONTRI, R.V.; KAISER, M.; POLETTO, F.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2398-2406, 2011.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CORRÊA, T.A. **Síntese de amino-álcoois derivados de carboidratos, potenciais agentes antituberculose**. (2009. 161f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

CYNAMON, M.H.; KLEMENS, S.P.; CHOU, T.S.; GIMI, R.H.; WELCH, J.T. Antimicrobial activity of a series of pyrazinoic acid esters. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, n.7, p.1215-1215, 1992.

CYNAMON, M.H.; GIMI, R., GYENES, F.; SHARPE, C.A., BERGMANN, K.E.; HAN, H.J.; GREGOR, L.B.; RAPOLU, R., LUCIANO, G.;WELCH, J.T. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimicrobial activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 3902-3907, 1995.

CRUZ, L.; SCHAFFAZIK, S.R.; DALLA COSTA, T.; SOARES, L.U.; MEZZALIRA, G.; da SILVEIRA, N.P.; SHAPOVAL, E.E.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, n.9, p.3154-3162, 2006.

DAMGE, C.; MICHEL, C.; APRAHAMIAN, M.; COVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.P. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. **Journal of Controlled Release**, v.13, p. 233-239, 1990.

DE ARAÚJO, T.M.; TEIXEIRA, Z.; BARBOSA-SAMPAIO, H.C.; REZENDE, L.F.; BOSCHERO, A. C.; DURÁN, N.; HÖEHR, N.F. Insulin-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles: Efficient, Sustained and Safe Insulin Delivery System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n.6, p. 1098-1106, 2013.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura**: aplicações e preparações de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. EDIPUCRS - Porto Alegre, 2007.

DITTMANN, M.M.; ROZING, G.P.; ROSS, G.; ADAM, T.; UNGER, K.K.; Advances in capillary electrochromatography, **Journal of Capillary Electrophoresis**, 1997, 4, 201-212.

DOMINGUES, G.S.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R. Micropartículas revestidas contendo fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1966-1972, 2008.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY- Science Medicines Health: Human Regulatory- Nanotechnology. Disponível em [http //: www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu). Acesso em maio de 2015.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.-PH.; YGARTUA, P. Poly(ϵ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, n.158, p.19-27, 1997.

ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.10, p.2393-2404, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, v.2, 5ª ed. / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. 546p., 1v/il.

FDA, U.S. Food and Drugs Administration Guidance for Industry Considering Whether an FDA- Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. p. 1-14, June, 2014. Disponível em: www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM401695.pdf. Acesso em dezembro de 2014

FERNANDES, J.P.S.; FELLI, V.M.A. Evaluation of the influence of base and alkyl bromide on synthesis of pyrazinoic acid esters through factorial design. **Química Nova**, v.32, n. 9, p.2464-2466, 2009.

FERREIRA, A.A.; QUEIROZ, K.C.; TORRES, K.P.; FERREIRA, M.A.; ACCIOLY, H.; ALVES, M.S. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.8, n.2, p.142-149, 2005.

FIND- Foundation for Innovative New Diagnostics. Xpert MTB/RIF – Automated nucleic acid amplification test (NAAT). Disponível em http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/automated_naot.html. Acesso em junho de 2015.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A., WREDE, A., BOTTGER, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Molecular Microbiology**, v.9, n.6, p. 1239-1246, 1993.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. Tuberculosis: Latency and Reactivation. **Infection and Immunity**, v.69, n.7, p.4195-4201, 2001.

FORST, M.B; WARNER, A.M. Development and validation of non-aqueous capillary electrophoresis methods to analyze boronic ester and acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.64-65, p.49-55, 2012.

GIL, E.S. **Controle físico químico de qualidade de medicamentos e cosméticos**. 3ª ed. Pharmabooks, São Paulo, 2010.

GRILLO, R.; SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v.231-232, p.1-9, 2012.

GUELPERINA, S.; KISICH, K.; ISEMAN, M.D.; HEIFETS, L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.172, p. 1487-1490, 2005.

GUENTERT, T.W.; ØIE, S.; PAALZOW, L.; FREY, B.M.; BRANDT, R.; AARONS, L.J.; ROWLAND, M. Interaction of mixed micelles formed from glycocholic acid and lecithin with the protein binding of various drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.23, n.5, p.567-577, 1987.

GUINEBRETIERE, S.; BRIAÇON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V.S.; BLANCHIN, M.G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering: C**, v.21, n.1, p.132-142, 2002.

GUO, Q.; GROENINCKX, G. Crystallization kinetics of poly(ϵ -caprolactone) in miscible thermosetting polymer blends of epoxy resin and poly(ϵ -caprolactone). **Polymer**, v.42, p.8647-8655, 2001.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutical**, v.165, n.2, p.129-168, 1998.

GUTERRES, S.S.; MÜLLER, C.R.; MICHALOWSKI, C.B.; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Science**, v.11, n.3, p.229-233, 2001.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Targets Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

HASSAN, M.U.; ALI, M. F.; BUKHARI, A. Structural characterization of Saudi Arabian heavy oil crude by NMR Spectroscopy, **Fuel**, v. 62, p.518-523, 1983.

HELLE, A.; HIRSJARVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J.; WIEDMER, S.K. Quantitative determination of drug encapsulation in poly(lactic acid) nanoparticles by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, n.1178, p.248-255, 2008.

HEYEM, B.; ALZARI, P.M.; HONORE, N.; COLE, S.T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v.15, n.2, p.235-245, 1995.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

JAGER, A.V.; TAVARES, M.F.M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p.363-373, 2001.

JORDAO, L.; BLECK, C.K.E.; MAYORGA, L.; GRIFFITHS, G.; ANES, E. On the killing of mycobacteria by macrophages. **Cellular Microbiology**, v.10, n.2, p.529-548, 2008.

JORGENSEN, J.W.; LUKACS, K.D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298-1302, 1981.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, C.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.423, n.2, p.419-427, 2012.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 39-83.

KRAEMER, H.J., FELTKAMP, U., BREITHAUPT, H., Quantification of pyrazinamide and its metabolites in plasma by ionic-pair high-performance liquid chromatography. Implications for the separation mechanism. **Journal of Chromatography B**, v. 706, 319-328, 1998.

KÜLKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2078-2084, 2009.

LEITE, O.H.M.; KANUFRE, K.A. In: **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes**. FERREIRA, A.W. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 243-253, 2013.

LEMKE, T. L. Antimycobacterial agents In: WILLIAMS, D. A., LEMKE, T. L. Eds. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1337p.,2008.

LEITE, E.A.; VITELA, J.M.C.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SPANGLER-ANDRADE, M. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v.11, n.3, p.48-51, 2005.

LIMA, C.H.S.; BISPO, M.L.F.; de SOUZA, M.V.N. Pirazinamida: um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. **Revista Virtual Química**, v.3, n.3, p. 159-180, 2011.

LOPES, E.; POHLMANN, A.R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S.S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**, v.55,n.7,p.527-530, 2000.

MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCLLERON, H.; NUNN, A.J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v.5, p. 1-10, 2010.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A.M. Liposomes and Nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, n.11, p.592-599, 2009.

MARCATO, P.D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, n.5, p. 1-14, 2008.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.2, p. 1-37, 2009.

MEDINA, S.H.; EL-SAYED, M.E.H. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemoterapeutic Agents, **Chemical Reviews**, v.109, n.7, p.3141-3157, 2009.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; DIAS FILHO, N.L.; PAULA, E.; ARAÚJO, D.R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v.33, n.1, p.65-69, 2010

MESTDAGH, M.; FONTEYNE, P.A.; REALINI, L. ROSSAU, R.; JANNES, G.; MIJS, W.; DE SMET, K.A.L.; PORTAELS, F.; VAN DEN EECKHOUT, E. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the pncA Locus in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.9, p. 2317–2319, 1999.

MÜLLER, C.R.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DE LUCCA, L.F.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v.56, n.11, p.864-867, 2001.

MÜLLER, C.R.; HAAS, S.E.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; PERALBA, M.C.R.; POHLMANN, A.R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v.27, n.4, p. 555-560, 2004.

NECKEL, G.I.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo campotencina a partir do ácido poli(D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli(D,L-lático e polietilenoglicol. **Acta Farma Bonaerense**, v.24, n.4, p.504-511, 2005.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, n.1-2, p.1-4, 2008.

PANDEY, R.; AHMAD Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. **Nanomedicine**, v.7, n.3, p.259-272, 2011.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, 4ª ed., Cengage Learning, São Paulo, 2012.

PIÑERO, M.; BAUZA, R.; ARCE, L. Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1379-1393, 2011.

PINHEIRO, M.; LÚCIO, M.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, S. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. **Nanomedicine**, v.6, n.8, p.1413-1428, 2011.

POLETO, F.S.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. **Nanocosmetics and Nanomedicines**, p.49-68,2011.

POHLMANN, A.R.; FONSECA, F.N.; PAESE, K.; DETONI, C.B.; CORADINI, K.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

QUAGLIA, M.G.; FANALI, S.; BARBATO, F.; DONATI, E. Micellar electrokinetic chromatography for determination of drug partition in phospholipids. **IL FARMACO**, v.60, p.77-83, 2005.

RAFFIN, R.P.; OBACH, E.S. MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.22,n.2, p.163-172, 2003.

RAVI, P.R.; VATS, R.; DALAL, V.; GADEKAR, N.; ADITYA, N. Design, optimization and evaluation of poly- ϵ -caprolactone (PCL) based polymeric nanoparticles for oral delivery of lopinavir. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n.1, p. 131-140, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v,27, n.5, p.771-780, 2004.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.4, p. 525-532, 2002.

SACKS, L.V.; BEHRMAN, R.E. Developing new drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a regulatory perspective. **Tuberculosis**, v.88, p. 93-100, 2008.

SAMUELSON, J. Doenças Infecciosas In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Eds. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*, 6^a. ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2000, p.298-360.

SCHAFFFAZIK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHAFFFAZIK, S.R.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.3, p.562-569, 2006.

SCHAFFFAZIK, S.R.; SIQUEIRA, I.R.; BADEJO, A.S.; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; NETTO, C.A.; GUTERRES, S.S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69,n.1,p.64-71, 2008.

SCORPIO A.; ZHANG, Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. **Natural Medicine**, v. 2, n.6, p.662, 1996.

SEITZ, L.E.; SULING, W.J.; REYNOLDS, R.C. Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazine and quinoxaline derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.45, n.25, p.5604-5606, 2002.

SHEGOKAR, R.; LOAYE, A.S.; KHALIL, M. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.14, n.1, p.100-116, 2011.

SIDDIQUI, I.A.; ADHAMI, V.M.; CHAMCHEU, J.C.; MUKTAR, H. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.591-605, 2012.

SILVA, J.A.F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.26, n.1, p.56-64, 2003.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30, n.3, p.740-744. 2007.

SILVEIRA, E.F.; CHASSOT, J.M.; TEIXEIRA, F.C.; AZAMBUJA, J.H.; DEBOM, G.; BEIRA, .F.T.; DEL PINO, F.A.B.; LOURENÇO, A.; HORN, A.P.; CRUZ,

L.; SPANEVELLO, R.M.; BRAGANHOL, E. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, v.31,n.6,p.1424-1435,2013.

SIMÕES, M.F. **Estudo de pro-fármacos derivados da pirazinamida e da sua combinação com anti-inflamatórios não esteroides para o tratamento de micobacterioses**. (2008). 90f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) – Faculdade de Medicina de Lisboa, 2008.

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*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, p. 257–26, 2009.

SOLOMONS, I.A.; SPOERRI, P.E. Esters of pyrazinoic and pyrazine-2,3-dicarboxylic acids. **Journal of the American Chemical Society**., v. 75, p. 679-681, 1953.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros. **Polímeros**, v.22, n.1, p. 96-100, 2012.

SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

SUN, Z.; ZHANG, Y. Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of *Mycobacterium kansasii* to the antituberculosis drug pyrazinamide. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.43, n.3, p.537-542, 1999.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química nova**. v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TELENT, A.; WOLFGANG, J.P.; SREEVATSAN, S.; BERNASCONI, C.; STOCHBAUER, K.E.; WIELES, B.; MUSSER, J.M.; JACOBS JR, W.R. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nature Medicine**, n.3, p.567-570, 1997.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 111-113, 1984.

TERABE, S.; CHEN, N.; OTSUKA, K. Micellar electrokinetic chromatography. **Advanced Electrophoresis**, v. 7, p. 87-153, 1994.

TORCHILIN, V.P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v.24, n.1, 2007.

TÔRRES, A.C.B. **Cromatografia líquida de alta eficiência: revisão de literatura**. (2009) Seminário (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás, 2009.

TRA, V.N; DUBE, D.H. Glycans in pathogenic bacteria – potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents. **Chemical Communications**, v.50, n.36, p.4659-4673, 2014.

USP-THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 34 ed. National Formulary: NF 29. Rockville, Md: United States Pharmacopeia Convention, 2011.

VEUTHEY, J.L. Capillary eletroforesis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.381, n.1, p. 93-95, 2005.

WERMUTH, C.G.; Designing Prodrugs and Bioprecursors. In: WERMUTH, C.G., (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**, Academic Press, Londres, p. 697-716, 2003.

WILLIAMS, D.L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K.; CRAEFORD, J.T.; PORTAELS, F.; SALFINGER, M.; NOLAN, C.M.; ABE, C.; STCHIT-GROH, V.; GILLIS, T.P. Characterization of rifampin-resistence in pathogenic mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.10, p.2380-2386, 1994.

WHO- World Health Organization. **Guidelines for programatic management of drug-resistente tuberculosis- emergency update, 2008**. Disponível em <http://www.who.int/tb/en>. Acesso em de janeiro de 2014

WHO- World Health Organization. **WHO Reports-Global tuberculosis control, 2013**. Disponível em <http://www.who.int/tb/en>. Acesso em novembro de 2014.

ZHANG, Y.; SUE, Z.; GUO, M. *Mycobacterium smegmatis* has two pyrazinamidase enzymes, PncA and PzaA. **Journal of bacteriology**, v.182, n.13, p.3881-3884, 2000.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.7, n.1, p.6-21, 2003.