

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

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**Tuberculostáticos potenciais: síntese e avaliação biológica preliminar
de fármacos dirigidos de estreptomicina e amicacina para liberação
específica em macrófagos**

Nara Lúcia Ricelli

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2003

17828

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005839

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

Ricelli, Nara Lúcia

R497t Tuberculostáticos potenciais : síntese e avaliação biológica preliminar de fármacos dirigidos de estreptomicina e amicacina para liberação específica em macrófagos / Nara Lúcia Ricelli. -- São Paulo, 2003.
122p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Latenciação : Química farmacêutica 2. Polímeros : Química farmacêutica I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Nara Lúcia Ricelli

Tuberculostáticos potenciais: Síntese e avaliação biológica preliminar
de fármacos dirigidos de estreptomicina e amicacina para liberação
específica em macrófagos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

1º examinador – Profa. Dra. Clarice Q. Fujimura Leite

2º examinador – Profa. Dra. Márcia da Silva

São Paulo, 8 de dezembro de 2003.

Dedico este trabalho

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

*Aos meus pais, Victor e Izete
Por terem me permitido escolher, sempre*

Ao meu irmão Caio,

Ao meu avô Jairo

*À querida tia Sônia, e
em memória de minha avó Eugênia, onde quer que esteja
agora...com saudades sem fim.
Sem elas, talvez não tivesse chegado até aqui.*

*Ao meu marido,
José Alberto Fracassi da Silva*

*Companheiro mui amado,
exemplo de caráter, exemplo de pesquisador...*

*Meu amigo inseparável,
Meu amor,
Meu tudo*

*À mestra e amiga, Profa. Dra. Elizabeth
Igne Ferreira, pelo carinho e
compreensão com que sempre me
recebeu, em momentos alegres e
difíceis da minha vida, pela preciosa e
segura orientação .*

Agradecimentos

✘ A Deus, pois é Ele quem "...põe caminhos no deserto e rios no ermo" (Is 43:20).

✘ À Dra. Daisy Nakamura Sato (Instituto Adolfo Lutz - RP), pela realização dos ensaios biológicos para este trabalho, pela simpatia e presteza com que sempre me auxiliou.

✘ Ao Dr. Paulo Batista de Carvalho, meu "professor" de laboratório de síntese, pelo seu apoio e pela amizade imortal, não importa a distância.

✘ Ao amigo querido Eric Kors Vidsiunas, ombro amigo em todas as ocasiões e companheiro de muitas lutas.

✘ Aos meus amigos de percurso (antigos e novos), que guardarei para sempre em meu coração – em ordem alfabética, para não causar briga – Alexandre, Ana Cláudia, Bianca, Camila, Daniela, Fernando, Hélio, Juliana, Kátia Solange, Keila, Marina, Remo, Rosiane e Wagner, pelos momentos que passamos juntos.

✘ Ao Charles, pela amizade e confiança, por sempre poder contar com sua ajuda.

✘ Aos colegas de trabalho Kátia, Michelle, Vanesca, Guilherme, Gustavo e Roberto.

✘ Aos professores Veni Maria Andres Felli, Maria Amélia Barata da Silveira, Michael Simon Nothemberg, Carlos Alberto Brandt, Maria Inês de Almeida

Gonçalves, Elfriede Marianne Bacchi, Dominique Corinne Hermine Fischer, Primavera Borelli, Elvira Maria Guerra-Shinohara, Antônio Altair Magalhães de Oliveira e Marina Baquerizo Martinez, pela amizade, conselhos e ajuda sempre presentes.

✘ À Luzanira Alves Maciel – figura ímpar – mesmo longe daqui... por sempre "dar um jeito" para tudo, pelo carinho e amizade, queixas à parte...

✘ Aos funcionários Beth, Suzy, Celi, Jorge, Benê, Elaine (FCF), Nancy e Adriana (Central Analítica – IQ), por seus serviços e ajuda sempre disponíveis.

✘ Ao CNPq, pela bolsa concedida.

✘ Às indústrias FURP e EMS S/A, pela gentileza em fornecer os fármacos utilizados neste trabalho.

ABSTRACT

Targeted drugs of streptomycin and amikacin were synthesized by linking the drugs via spacer groups (succinyl and carboxymethyl) onto a polysaccharide carrier – yeast mannan – to achieve specific delivery to human mononuclear phagocytes infected by Mycobacterium tuberculosis. It is well known that macrophages have mannose receptors in their membrane. So, mannan (polymer of mannose) was used as selective carrier. In a first step, mannan was extracted from baker's yeast. After the polymer purification, its derivatization was carried out with succinic anhydride and monochloroacetic acid to obtain the succinyl and carboxymethyl derivatives, respectively. In order to link streptomycin to the derivatives, dicyclohexylcarbodiimide (DCC) was used as coupling agent. To obtain the targeted drugs of amikacin by the same synthetic pathway, the employed coupling agent was ethyldiaminopropylcarbodiimide (EDC). The products were characterized by FTIR, NMR ^1H and ^{13}C , and elemental analysis. The biological evaluation (MIC) was investigated against M. tuberculosis H37Rv-ATCC27294 virulent strain, M. avium and M. bovis. The intracellular activity of the compounds was evaluated by means of the Luciferase Reporter Phages technique, employing the recombinant M. tuberculosis strain Erdman ATCC35801. The obtained products were found with the same activity compared to streptomycin, but further studies on the targeted drugs cellular uptake profile are necessary.

ÍNDICE

1 – RESUMO

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Aspectos clínicos da tuberculose (TB).....	2
2.2. Diagnóstico da TB.....	6
2.2.1. Exames Bacteriológicos.....	6
2.2.2. Cultura do Bacilo.....	6
2.2.3. Exame Radiológico de Tórax.....	7
2.2.4. Prova Tuberculínica.....	7
2.2.5. Exame anátomo-patológico (histológico e citológico).....	8
2.2.6. Exame Bioquímico.....	8
2.2.7. Exame Sorológico e de Biologia Molecular.....	8
2.3. Epidemiologia da tuberculose.....	8
2.4. Quimioterapia.....	10
2.4.1. Fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	16
2.4.1.1. Isoniazida.....	16
2.4.1.2. Rifampicina.....	18
2.4.1.3. Pirazinamida.....	20
2.4.1.4. Etambutol.....	21
2.4.1.5. Etionamida.....	22
2.4.1.6. Ácido <i>para</i> -aminossalicílico.....	23
2.4.1.7. Ciclosserina.....	24
2.4.1.8. Capreomicina.....	25
2.4.1.9. Aminoglicosídeos.....	26
2.4.1.9.1. Estreptomina.....	31
2.4.1.9.2. Amicacina.....	33
2.5. Introdução de novos fármacos na terapêutica.....	35

2.6. Transporte de fármacos para o sistema respiratório.....	37
2.7. Manana.....	39
2.8. Receptores manosídicos na superfície de macrófagos.....	42
2.9. Tendências no tratamento da TB – Vacina Gênica.....	42
	41
3 - OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	44
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1. Material.....	46
4.1.1. Reagentes e Solventes.....	46
4.2. Métodos.....	48
4.2.1. Obtenção dos transportadores seletivos para macrófagos.....	48
4.2.1.1. Extração da manana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.2.1.2. Preparação do derivado succinoilado de manana (DSM).....	49
4.2.1.3. Preparação do derivado carboximetilado de manana (DCM).....	50

PARTE I

4.2.2. Obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM.....	50
4.2.2.1. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM.....	51
4.2.2.2. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DSM.....	52

PARTE II

4.2.3. Obtenção de amicacina base.....	53
4.2.4. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina (Rota 1).....	53
4.2.4.1. Síntese de fármacos dirigidos de amicacina com DSM.....	53
4.2.5. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina (Rota 2).....	54
4.2.5.1. Preparação da succinamida de amicacina.....	54
4.2.5.2. Síntese do fármaco dirigido - Acoplamento da succinamida de amicacina	

com manana.....	55
4.2.6. Análises.....	55
4.2.6.1. Espectroscopia no infravermelho.....	55
4.2.6.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	56
4.2.6.3. Determinação do grau de substituição dos polímeros derivatizados.	56
4.2.6.4. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	56
4.2.6.5. Determinação da faixa de fusão dos compostos obtidos.....	56
4.2.6.6. Determinação quantitativa do acoplamento dos fármacos aos polímeros derivatizados.....	57
4.2.7. Avaliação Biológica Preliminar I.....	57
4.2.7.1. Meios de cultura e reagentes.....	57
4.2.7.2. Amostras.....	57
4.2.7.3. Determinação da CIM.....	58
4.2.8. Determinação da atividade intracelular (Avaliação biológica preliminar II).....	59
4.2.8.1. Meios de cultura e reagentes.....	59
4.2.8.2. Amostras.....	59
4.2.8.3. Culturas de células.....	60
4.2.8.4. Padronização da técnica da luciferase.....	60
4.2.8.5. Determinação da porcentagem de inibição de crescimento bacteriano em macrófagos.....	62
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1. Obtenção dos transportadores seletivos para macrófagos.....	63
5.1.1. Extração da manana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
5.1.2. Preparação do derivado succinilado de manana (DSM).....	64

5.1.3. Preparação do derivado carboximetilado de manana (DCM).....	64
<u>PARTE I</u>	
5.1.4. Obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM.....	65
5.1.4.1. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM.....	65
<u>PARTE II</u>	
5.1.5. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina (ROTA 1).....	70
5.1.5.1. Síntese de fármacos dirigidos de amicacina com DCM e DSM.....	70
5.1.6. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina com DSM (ROTA 2).....	
5.1.6.1. Preparação da succinamida de amicacina.....	73
5.1.6.2. Acoplamento da succinamida de amicacina à manana.....	73
5.1.7. Determinação das faixas de decomposição.....	74
5.1.8. Avaliação Biológica Preliminar.....	75
5.1.8.1. Valores de Concentração inibitória Mínima para os Fármacos Dirigidos de Estreptomicina com DCM e DSM.....	75
5.1.8.2. Valores de Concentração inibitória Mínima para os Fármacos Dirigidos de Amicacina com DSM.....	76
5.1.8.3. Atividade Intracelular dos fármacos dirigidos de estreptomicina....	77
6 – ESPECTROS DOS PRODUTOS OBTIDOS.....	82
6.1. Obtenção do polímero derivatizado.....	
6.1.1 Manana extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
RMN ¹ H.....	83

Infravermelho.....	84
6.1.2. Derivado succinilado de manana (DSM)	
RMN ¹ H.....	86
Infravermelho.....	87
6.1.3. Derivado carboximetilado de manana (DCM)	
RMN ¹ H.....	89
Infravermelho.....	90
6.2. Fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM	
RMN ¹ H.....	92
Infravermelho.....	93
6.3. Fármacos dirigidos de estreptomicina com DSM	
RMN ¹ H.....	95
Infravermelho.....	96
RMN ¹³ C.....	97
6.4. Fármacos dirigidos de amicacina com DSM	
RMN ¹ H.....	99
Infravermelho.....	100
6.5. Succinamida de amicacina (Infravermelho).....	102
6.6. Acoplamento succinamida-manana (fármaco dirigido).....	103
7 – CONCLUSÕES PARCIAIS.....	104
8 – PERSPECTIVAS.....	106
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1 – RESUMO

A tuberculose (TB), doença infecciosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por microrganismos que se multiplicam intracelularmente, é a segunda causa de mortalidade de adultos jovens em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada com o *M. tuberculosis* (WHO, 2003).

O principal problema associado a esta doença é a multi-resistência. Esta forma específica de TB deve-se a bacilos resistentes pelo menos à isoniazida e rifampicina, os dois fármacos mais potentes existentes contra a doença. A resistência decorre do mau uso dos quimioterápicos nos casos de TB suscetível, incluindo-se, aí, administração incorreta, abandono do tratamento devido à sua longa duração e falta de observação aos pacientes.

Para o controle desta forma de TB, a OMS sugere o uso de agentes de segunda escolha, como estreptomicina e amicacina, que, a despeito de sua alta atividade tuberculostática, apresentam alguns problemas, principalmente em regimes prolongados de tratamento requeridos por infecções crônicas, uma vez que possuem alta toxicidade e baixa biodisponibilidade.

Em 1974, De Duve e colaboradores sugeriram a administração de estreptomicina em forma lisossomotrópica, a fim de aumentar sua eficácia. Uma vez que macromoléculas conjugadas a fármacos não são capazes de difundirem-se através das membranas celulares, a penetração dos mesmos nas células se daria restritamente por endocitose, a qual pode ocorrer randomicamente ou mediada por receptores. Após internalização, os conjugados seriam transportados ao compartimento lisossomal, e os fármacos liberados no meio intracelular sob condições ácidas e ação de enzimas.

Considerando o conceito de pró-fármaco com o objetivo de conseguir seletividade e otimizar a captura do fármaco pelas células, reduzindo sua toxicidade, foram planejados fármacos dirigidos de estreptomicina e amicacina

utilizando transportador polimérico seletivo para macrófagos. Com este propósito, a manana – polímero de manose – foi utilizada, uma vez que macrófagos humanos expressam receptores de membrana com alta afinidade por este polissacarídeo.

Neste trabalho, a manana foi extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e derivatizada com espaçantes carboximetil e succinil, a fim de fornecer grupos ligantes para os antibióticos já mencionados.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos clínicos da TB (TB)

Esta moléstia infecto-contagiosa de caráter crônico tem como agente etiológico o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, englobando as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, constituídas por bacilos aeróbios álcool-ácido resistentes (BAAR), somente visíveis em material biológico pela coloração de Ziehl-Nielsen, que cora os ácidos micólicos da parede dos bacilos (FIGURA 1). Para o diagnóstico diferencial, devem ser feitas cultura e identificação dos microrganismos em laboratórios de referência (FUNASA, 2003).

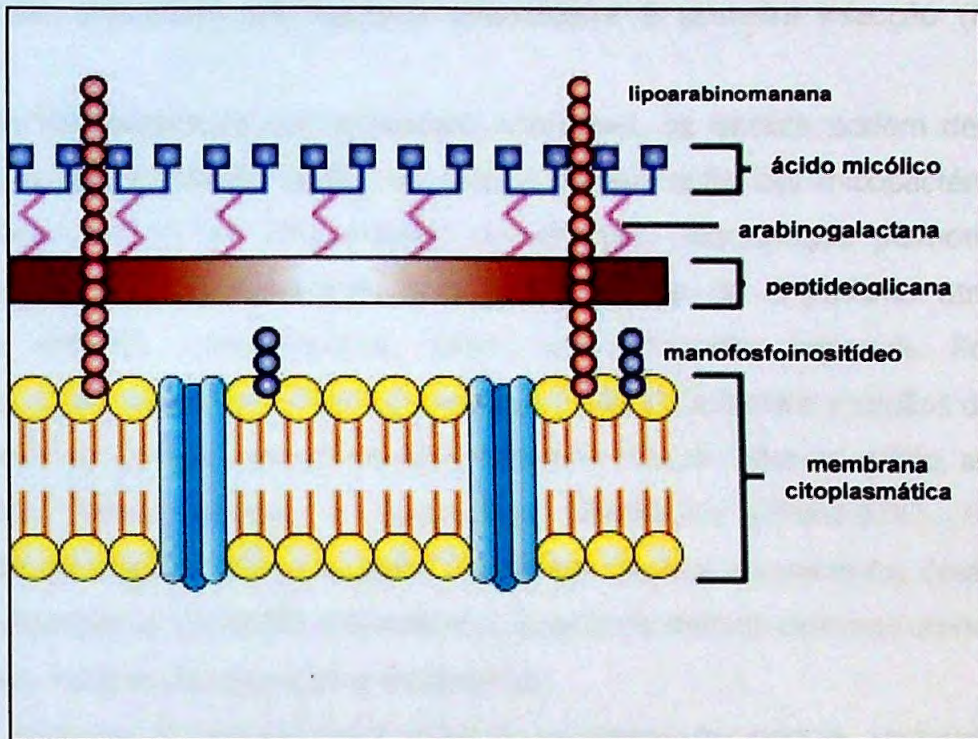


FIGURA 1 – Representação esquemática da parede micobacteriana.

Os bacilos permanecem suspensos no ar ao serem expelidos em gotículas de saliva durante a tosse, espirro ou fala em voz alta de portador de TB pulmonar ou laríngea ativa, que não estiver sob tratamento (BROGLIO, LIMA-FILHO, 1993; FUNASA, 2003). A instalação da doença se dá por meio da inalação de tais partículas infecciosas, suficientemente pequenas, cujos microrganismos sobrevivem à primeira linha de defesa das vias aéreas superiores, alcançando os alvéolos e estabelecendo, assim, a infecção (BROGLIO, LIMA-FILHO, 1993; SILVA, FERREIRA, 1999).

O período de incubação é de 4 a 12 semanas, ao fim do qual é possível a detecção de lesões primárias. A manifestação da doença depende de vários fatores, entre eles o tipo de infecção (primo ou reinfeção). Na primeira, a probabilidade do indivíduo adoecer está ligada à virulência do bacilo, fonte infectante e características genéticas do indivíduo infectado. Na segunda, a

resistência dependerá da resposta imunológica à primeira infecção (FUNASA, 2003).

Uma vez instalados em organismo suscetível, os bacilos podem determinar evoluções clínicas diferenciadas, ou seja, a multiplicação das micobactérias pode tanto ficar restrita ao sítio original de infecção (macrófagos pulmonares ou alvéolos) quanto se disseminar para outras partes do organismo através do sistema linfático, conduzindo-os, assim, aos linfonodos regionais. Pode ser, também, disseminada por meio do sangue, chegando a tecidos e órgãos distantes, resultando em caráter diverso de manifestações clínicas. Têm-se, então, as formas pulmonar, extra-pulmonar e meningítica (BROGLIO, LIMA-FILHO, 1993). A evolução da doença depende tanto de fatores ligados ao paciente, como idade, estado nutricional, condição imunológica, quanto de fatores externos como a carga bacilífera, estágio de detecção e tratamento.

No início da 3ª semana após infecção, o organismo normal, reconhecendo a presença de elemento estranho, é capaz de mobilizar seu sistema de defesa imunológico específico, acontecendo a "luta" hospedeiro-invasor, visando a destruição ou inativação do agente agressor. Passa a haver, então, no pulmão, no local da inoculação inicial, um foco pequeno, arredondado, de 1 a 2 mm, esbranquiçado, de consistência amolecida e constituído principalmente por material caseoso.

Tal foco é circundado por afluxo celular de linfócitos, células epitelióides (macrófagos ativados e modificados) e macrófagos (foco primário), localizado principalmente no terço médio, compreendendo, a parte inferior do lobo superior, lobo médio e particularmente o ápice do lobo inferior. Normalmente esse nódulo é único e com as dimensões mencionadas, mas há relatos da existência de múltiplos focos primários e de focos de maiores dimensões. À associação do foco primário aos gânglios satélites da sua região dá-se o nome de Complexo Primário de Ranke. O foco pulmonar regressivo, que pode ser visto nas radiografias, chama-se foco de Gohn. Cerca de 95% da população infectada consegue bloquear o avanço do

processo a partir da formação do complexo primário de Ranke, permanecendo apenas como infectados.

A TB primária, que ocorre durante uma primo-infecção, pode evoluir tanto a partir do foco pulmonar quanto do foco ganglionar ou, então, em consequência da disseminação hematogênica. Isso acontece em 5% dos primo-infectados. A TB pós-primária ocorre no organismo que tem sua imunidade desenvolvida tanto pela infecção natural quanto pelo BCG. Dos primo-infectados, 5% adoecerão tardiamente, em consequência do recrudesimento de algum foco já existente no seu organismo (reativação endógena) ou por receber nova carga bacilar do exterior (reinfecção exógena). O quadro clínico não apresenta nenhum sinal ou sintoma característico. Observa-se, normalmente, comprometimento do estado geral, febre baixa vespertina com sudorese, inapetência e emagrecimento.

Quando a doença atinge os pulmões, o indivíduo pode apresentar dor torácica e tosse produtiva, acompanhada ou não de hemoptise. A tosse produtiva é o sintoma mais freqüente. Nas crianças também é comum o comprometimento ganglionar mediastínico e cervical (forma primária), que se caracteriza por lesões bipolares: parênquima e gânglios. Em cerca de 85% dos casos, a TB atinge os pulmões, podendo, entretanto, se localizar em outras partes do organismo, como rins, ossos e meninges, dentre outras, em função das quais se expressará clinicamente. Uma das formas mais graves é a TB miliar, decorrente de disseminação hematogênica com acometimento sistêmico, quadro tóxico infeccioso importante e grande risco de meningite. Os pulmões se apresentam difusamente ocupados por pequenas lesões. Os demais órgãos também podem ser acometidos por lesões idênticas.

2.2. Diagnóstico da TB (Adaptado de FUNASA, 2003)

O diagnóstico da TB deverá ser fundamentado nos seguintes métodos:

- exame específico (baciloscopia e cultura);
- radiológico;
- prova tuberculínica;
- anátomo-patológico (histológico e citológico), sorológico, bioquímico e de biologia molecular.

2.2.1. Exames Bacteriológicos

A baciloscopia direta do escarro é o método prioritário, porque permite descobrir a fonte mais importante de infecção, que é o doente bacilífero.

Por ser um método simples e seguro, deve ser praticado em todos os serviços de saúde que disponham de laboratório. A baciloscopia direta deverá ser indicada para todos os sintomáticos respiratórios (indivíduo com tosse e expectoração por quatro semanas ou mais). Também é utilizada para acompanhar, mensalmente, a evolução bacteriológica do paciente durante o tratamento. Recomenda-se para o diagnóstico, a coleta de duas amostras de escarro: uma por ocasião da primeira consulta e a segunda na manhã do dia seguinte, ao despertar.

2.2.2. Cultura do Bacilo

A cultura é indicada para suspeitos de TB pulmonar persistentemente negativos ao exame direto, e para o diagnóstico de formas extrapulmonares, como meníngea, renal, pleural, óssea e ganglionar. Também está indicada a solicitação desse exame nos casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, acompanhado do teste de sensibilidade. Nos casos de outras micobactérias que não TB, além da cultura, deverá ser solicitada identificação em espécie do bacilo.

2.2.3. Exame Radiológico de Tórax

Está indicado nas seguintes situações:

- sintomáticos respiratórios negativos à baciloscopia direta;
- suspeitos de TB extra-pulmonar;
- portadores de HIV ou pacientes com AIDS.

2.2.4. Prova Tuberculínica

Indicada como método auxiliar no diagnóstico da TB em pessoas não vacinadas com BCG. A prova tuberculínica positiva, isoladamente, indica apenas infecção e não necessariamente TB doença.

Nas pessoas vacinadas com BCG, pode-se ter dificuldade na sua interpretação, uma vez que a vacina pode torná-la positiva. A tuberculina usada no Brasil é o PPD-Rt23, aplicada por via intradérmica, na dose de 0,1 mL, equivalente a 2UT (unidade tuberculínica), na parte anterior do antebraço esquerdo, com seringa tipo tuberculina, de 1 ml. Deve-se evitar a aplicação quando houver lesões da pele no local de aplicação. A leitura deverá ser realizada de 72 a 96 horas após a aplicação, com régua milimetrada padronizada. O resultado, expresso em milímetros, é interpretado da seguinte maneira:

- 0-4 mm - não reator (não infectados ou analérgicos)
- 5-9 mm - reator fraco (infectados pelo *M. tuberculosis*, por micobactérias atípicas ou vacinados com BCG)
- 10 mm e mais - reator forte (infectados pelo *M. tuberculosis*, doentes ou não, ou vacinados com BCG).

2.2.5. Exame anátomo-patológico (histológico e citológico)

Sempre que possível, nas formas extrapulmonares, deve-se realizar a biópsia. No material colhido será feito o exame direto, a cultura e o exame anátomo-patológico para identificar o *M. tuberculosis* ou o processo inflamatório granulomatoso compatível com a TB.

2.2.6. Exame Bioquímico

Os exames bioquímicos são mais utilizados em casos de TB extra-pulmonar, principalmente no derrame pleural, derrame pericárdico e meningoencefalite tuberculosa.

2.2.7. Exame Sorológico e de Biologia Molecular

Estes novos métodos são úteis para o diagnóstico precoce da TB, contudo, a sensibilidade, especificidade e valores preditivos variáveis, aliados ao alto custo e complexidade, os inviabilizam como exames de rotina, ficando seu uso restrito a alguns centros de pesquisa.

2.3. Epidemiologia da TB

As taxas de incidência e de prevalência de TB, bem como a ausência de recursos para seu controle, continuam constituindo desafio para os sistemas de saúde em nível mundial. Porém, nos países em desenvolvimento, a situação é

agravada, uma vez que a propagação da doença é diretamente influenciada por fatores sócio-econômicos. Após o declínio das taxas de infecção a partir da década de 1950 e a estabilidade até a metade da década de 1980, a TB está de volta, representando a segunda maior causa de morte de adultos dentre as doenças infecto-contagiosas, sendo responsável por 2 milhões de mortes por ano (BARNES, DAVIDSON, 1993; DOLIN, RAVINGLIONE, KOCHI 1994; HARRIES 1998; STOCKERT, MORREL, SCHEINBERG, 1982; WOLFE, MARMOR, MASLANSKY, 1995.)

Com a disseminação da AIDS como fator de risco de expansão da TB, este quadro vem se agravando. Mesmo que os riscos de infecção pelo HIV e pelo *Mycobacterium tuberculosis* sejam independentes, pode ocorrer reativação de infecção latente ou progressão à doença ativa de infecção primária ou reinfeção pelo *M. tuberculosis* em pacientes com AIDS. Ambas as doenças – TB e AIDS – vêm afetando, sobretudo, a população de jovens adultos. Este perfil implica ameaça para o desenvolvimento sócio-econômico de muitos países (BLOOM, ROOK, 1994; BROGLIO, LIMA-FILHO, 1993; ONE, SNIDER, KOCHI, 1995; SBARBARO, 1996).

A Organização Mundial da Saúde tem estimado que um terço da população mundial é portadora do agente causador da doença e que entre 7 e 8,8 milhões de novos casos ocorrem a cada ano, sendo 95% deles em países em desenvolvimento, com 3,3 milhões de casos notificados. Projeções da mesma Agência para o século XXI sugerem que o impacto da TB irá se agravar se não for estabelecido, imediatamente, controle adequado da doença em todos os países, pois mais de 50 milhões de pessoas podem estar infectadas com cepas resistentes aos esquemas usuais de tratamento. As causas do surgimento de resistência são: prescrição incorreta de quimioterápicos, abandono do tratamento, falta de muitos fármacos em alguns países (STOKSKAD, 2000; WHO, 2003)

O retorno da TB com porcentagem alarmante de novos casos anuais pode ser atribuído a fatores como: (1) aumento da migração para áreas da doença endêmica; (2) concepção errônea de que a doença permanece sob controle, com

interrupção dos programas de acompanhamento da mesma; (3) crescimento populacional e mudança na estrutura etária da população; (4) epidemia de infecção pelo vírus HIV; (5) surgimento de cepas multi-resistentes aos fármacos disponíveis; (6) ausência de programas governamentais visando ao controle da doença. Outros fatores, como o empobrecimento da população, ligado à má nutrição, alcoolismo crônico e uso de drogas de abuso, contribuem para favorecer o desenvolvimento e a transmissão da doença (BARNES, DAVIDSON, 1993; BLOOM, ROOK, 1994; SILVA, FERREIRA, 1999; WOLFE, MARMOR, MASLANSKY 1995).

2.4. Quimioterapia

A quimioterapia moderna da TB compreende duas fases: uma de ataque e outra de manutenção, visando à eliminação de bacilos de rápida e lenta multiplicação, respectivamente. A duração do tratamento, comparada a de outras enfermidades infecciosas, é longa, predispondo ao abandono do mesmo pelo paciente. Apesar dos recursos disponíveis na luta contra a TB, estes vêm se mostrando insuficientes, resultando na busca de novas alternativas quimioterapêuticas (SILVA, FERREIRA, 1999).

A mais recente tendência da quimioterapia anti-TB consiste na redução do tempo de duração do tratamento. Isto vem acontecendo de forma gradual, principalmente devido à introdução e combinação de fármacos primários, que já permitem esquemas com duração de 6 meses e oferecem eficácia garantida no tratamento (SILVA, FERREIRA, 1999; WOLFE *et al.*, 1995). A esse respeito, uma das alternativas consiste na aplicação da DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*), que é uma estratégia de tratamento supervisionado e de curta duração e baseia-se, fundamentalmente, em: (a) contato direto do agente de saúde com o paciente; (b) observação contínua – o paciente é observado a cada dose da quimioterapia; (c) o tratamento é completo e monitorado; (d) curta duração, permitida quando se lança mão de doses e combinações racionais de

fármacos. Nos locais onde a DOTS está sendo aplicada, os índices de resistência aos fármacos são baixos ou vêm diminuindo consideravelmente e os índices de cura atingem 95%, considerando-se flexibilidade na aplicação devido a fatores inerentes ao local e à administração correta, mesmo em áreas endêmicas de infecção por HIV (DESVARIEUX *et al.*, 2001; WHO, 2003).

Porém, devido ao uso irracional de antibióticos na quimioterapia de pacientes portadores de TB causada por microrganismos suscetíveis, vem ocorrendo a seleção de cepas de micobactérias multi-resistentes (geralmente à isoniazida e à rifampicina), principalmente em áreas onde não existem programas de controle da doença – podendo constituir, também, reflexo da ausência da DOTS em algumas áreas. O tratamento da TB multi-resistente (TB-MDR) é, conseqüentemente, mais extenso, com maior ocorrência de efeitos adversos e mais caro (cem vezes o tratamento usual, chegando a US\$ 250.000 por paciente) (WOLFE, MARMOR, MASLANSKY, 1995).

A DOTS adotada no controle de TB suscetível não é suficiente para se controlar a TB-MDR. Nesse sentido, está em fase de teste e desenvolvimento a implementação da DOTS-Plus pela Organização Mundial de Saúde. Tal estratégia visa combater a TB-MDR nas áreas onde a mesma vem se tornando epidemia emergente e baseia-se nos mesmos fundamentos da DOTS, utilizando-se de fármacos de segunda escolha, como amicacina e estreptomicina. É absolutamente imprescindível que os planos da DOTS-Plus sejam seguidos rigorosamente, a fim de se reduzir ao mínimo possível a ocorrência de resistência aos fármacos de segunda escolha (WOLFE, MARMOR, MASLANSKY, 1995).

Os esquemas a seguir mostram o tratamento adotado no Brasil para as diferentes formas de TB (FUNASA, 2003).

ESQUEMA I
2RHZ/4RH* - Tratamento de TB pulmonar e extra-pulmonar (exceto meningite)

FASE (meses)	FÁRMACOS	até 20 kg mg/kg/dia	20 - 35 kg mg/dia	36 - 45 kg mg/dia	> de 45 kg mg/dia
1 (dois)	R	10	300	450	600
	H	10	300	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
2 (quatro)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

*2RHZ - 1ª fase (2 meses), 4RH - 2ª fase (4 meses)

R - Rifampicina H - Isoniazida Z – Pirazinamida

Observações: a) No tratamento da TB oftálmica e cutânea, a isoniazida poderá ser mantida por mais seis meses, ao critério médico (2RHZ/4RH/6H).

b) No tratamento da associação TB e portador de HIV ou paciente com AIDS, a 2ª fase terá a duração de 7 meses (2RHZ/7RH).

ESQUEMA IR*

2RHZE/4RHE - Indicado nos Casos de Retratamento em Recidivantes e Retorno Após Abandono do Esquema I**

FASE (meses)	FÁRMACOS	Até 20 kg mg/kg/dia	21-35 kg mg/dia	36-45 kg mg/dia	> de 45 kg mg/dia
1 (dois)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1200
	Z	35	1000	1500	2000
2 (quatro)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1200

* Esquema I reforçado.

* 2RHZE - 1ª fase (2 meses), 4RHE - 2ª fase (4 meses)

R - Rifampicina H - Isoniazida Z - Pirazinamida E – Etambutol

Observações: a) Os recidivantes de esquemas alternativos por toxicidade ao Esquema I devem ser avaliados para prescrição do esquema individualizado.

b) Havendo alteração visual durante o tratamento, o paciente deverá ser encaminhado para um serviço de referência, com o objetivo de avaliar o uso do etambutol.

Esquema II
2RHZ/7RH* - Indicado na Meningite Tuberculosa

FASE (meses)	FÁRMACO	Dose p/ todas as idades (mg/kg/dia)	Dose Máxima (mg)
1 (dois)	R	20	600
	H	20	400
	Z	35	2000
2 (sete)	R	10 a 20	600
	H	10 a 20	400

*2RHZ - 1ª fase (2 meses), 7RH - 2ª fase (7 meses)

R - Rifampicina H - Isoniazida Z – Pirazinamida

Observações: a) Nos casos de concomitância da meningite tuberculosa com qualquer outra localização de TB, usar o Esquema II.

b) Nos casos de meningite tuberculosa, em qualquer idade, recomenda-se o uso de corticosteróides por um prazo de 2 a 4 meses, no início do tratamento.

c) Na criança, a prednisona é administrada na dose de 1 a 2 mg/kg de peso corporal, até a dose máxima de 30 mg/dia. No caso de se utilizar outro corticosteróide aplicar a tabela de equivalência entre eles.

d) A fisioterapia na meningite tuberculosa deverá ser iniciada, com orientação, o mais precocemente possível.

Esquema III
3SETEZ/9EtE* - Indicado nos Casos de Falência do Tratamento com os
 Esquemas I, IR E II

FASE (meses)	FÁRMACOS	Até 20 kg	21-35 kg	36-45 kg	> de 45 kg
		mg/kg/dia			
1 (três)	S	20	500	1000	1000
	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200
	Z	35	1000	1500	2000
2 (nove)	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200

*3SETEZ - 1ª fase (3 meses), 9EtE - 2ª fase (9 meses)

S - Estreptomicina Et - Etionamida Z - Pirazinamida E – Etambutol

Observações: a) Em pessoas maiores de 60 anos, a estreptomicina deve ser administrada na dose de 500 mg/dia.

b) Havendo alteração da visão durante o tratamento, o paciente deverá ser encaminhado para um serviço de referência, com o objetivo de avaliar uso do etambutol.

2.4.1. Fármacos utilizados no tratamento da TB (LEMKE, 2001; SILVA, FERREIRA, 1999)

2.4.1.1. Isoniazida

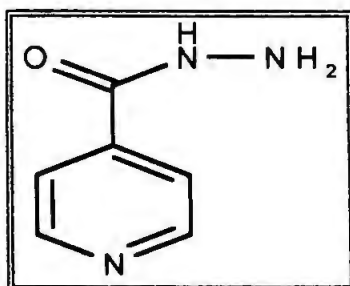


FIGURA 2 – Estrutura da isoniazida.

Agente antibacteriano sintético, apresenta alta atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Foi descoberto na década de 1950, mostrando-se efetivo contra bacilos internalizados ou não em macrófagos. É usado como fármaco de primeira escolha no tratamento de infecções pelo *M. tuberculosis*. Estudos demonstraram que sua ação é bactericida em bacilos em estágio de replicação, porém, em populações dormentes ou semi-dormentes, sua ação é apenas bacteriostática.

As primeiras descobertas acerca de seu mecanismo de ação surgiram quando se observou a perda da resistência à descoloração por ácido quando do tratamento com INH, sugerindo interferência na constituição da parede do *Mycobacterium*. Apesar de inúmeros estudos, o mecanismo de ação da isoniazida continua parcialmente desconhecido até os dias de hoje. Acredita-se que a INH aja como pró-fármaco, ativado através de reação de oxidação catalisada por uma enzima endógena (katG), a qual possui atividade semelhante à das peroxidases, e que converte a isoniazida em espécies acilantes.

Tais espécies seriam capazes de acilar o cofator NADH, essencial para a atividade de enzima inhA, uma enoil redutase responsável pela redução das duplas

ligações durante a fase de alongação das cadeias de ácidos graxos, na biossíntese de ácidos micólicos, que constituem o principal componente da parede das micobactérias.

A isoniazida é metabolizada por mecanismo de acetilação, em metabólitos inativos. Tal metabolização ocorre principalmente na fração citossólica do fígado, pela enzima *N*-acetiltransferase, cuja expressão possui variações individuais. Sendo assim, a dose de INH administrada necessita ser ajustada, para indivíduos acetiladores rápidos e lentos.

Os principais metabólitos são acetilisoniazida, ácido isonicotínico e acetilhidrazina. Esta última tem sido associada à ocorrência de hepatotoxicidade durante a terapia com INH em indivíduos acetiladores lentos, uma vez que a acetilhidrazina quando metabolizada pelo citocromo P-450 gera intermediários reativos, capazes de acetilar proteínas hepáticas, levando à necrose tecidual. Porém, se for realizado monitoramento clínico dos pacientes, as taxas de hepatotoxicidade são quase nulas.

Algumas modificações moleculares foram feitas no sentido de se avaliarem as relações entre estrutura química e atividade biológica na isoniazida, porém, nenhuma das alterações produzidas melhorou a atividade do protótipo.

A isoniazida é administrada por via oral, e bem distribuída pelos tecidos, inclusive infectados. Alguns alimentos podem interferir em sua absorção, sendo, portanto, recomendado que o fármaco seja administrado com o estômago vazio.

2.4.1.2. Rifampicina

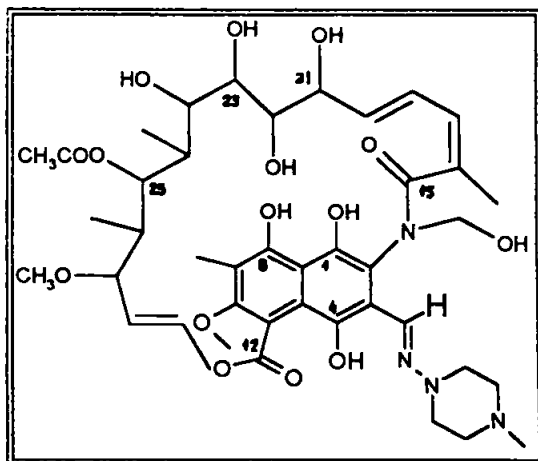


FIGURA 3 – Estrutura da rifampicina.

Derivado semi-sintético das rifamicinas isoladas de *Streptomyces mediterranei*, é membro da classe das ansamicinas. Esta classe é caracterizada por uma cadeia alifática formando uma ponte entre duas posições não adjacentes de um grupamento aromático.

É eficaz contra uma grande variedade de microrganismos Gram-positivos, inclusive no tratamento de TB, por via oral. Devido às suas propriedades estruturais, tem penetração deficiente pela parede celular de Gram-negativos, não sendo, portanto, muito utilizado em infecções causadas por estes microrganismos.

Seu mecanismo de ação consiste em inibir a RNA polimerase DNA-dependente (RPDD), ligando-se à subunidade β da enzima. Por esta razão, é bastante ativa contra bacilos extra e intracelulares em processo de divisão. Várias proposições são feitas com o objetivo de se explicar como ocorre a inibição da RPDD: (1) as ligações π dos anéis naftaleno presentes na estrutura da rifampicina interagiriam com anéis de aminoácidos aromáticos no sítio catalítico da RPDD; (2) a RPDD é uma metaloenzima contendo dois átomos de zinco – sugere-se que os oxigênios ligados aos carbonos 1 e 8 da rifampicina quelariam os átomos

metálicos, aumentando a força da ligação do fármaco à RPDD; (3) formação de fortes ligações de hidrogênio entre a RPDD e os oxigênios em C-21 e C-23.

Pode ser desenvolvida resistência, quando da ocorrência de mutação no gene responsável pela transcrição da subunidade β da RNA polimerase (gene *rpoB*), resultando em inabilidade do fármaco em se ligar à enzima.

As relações entre estrutura química e atividade biológica para a rifampicina foram definidas após preparação de vários derivados. Desse modo, tem-se que: (1) as hidroxilas em C-1, 8, 21 e 23 devem estar livres; (2) tais hidroxilas devem estar no mesmo plano; (3) a redução das duplas ligações leva ao decréscimo da atividade; (4) a abertura do anel principal gera composto inativo, uma vez que influi na conformação da estrutura; (5) substituições em 3 e /ou 4 influenciam na capacidade da rifampicina em atravessar a parede celular bacteriana.

A rifampicina, assim como a isoniazida, deve ser administrada com o estômago vazio, uma vez que os alimentos interferem na absorção do fármaco. É rapidamente absorvida quando da administração oral, tendo alta taxa de ligação com as proteínas plasmáticas (97,7%), e meia-vida de 13,2 horas em voluntários homens normais. Mais de 70% é eliminada nas fezes. Seu principal metabólito, produto da desacetilação na posição 25, desacetilrifampicina, mantém a atividade antibacteriana. Este composto é, então, conjugado com ácido glicurônico e eliminado na urina. Outro metabólito, secundário, 3-formilrifampicina, é produzido no intestino após reação de hidrólise catalisada por ácido, possuindo também atividade antibacteriana.

O fármaco é potencialmente hepatotóxico, podendo também acarretar distúrbios gastrintestinais, *rash* cutâneo e púrpura trombocitopênica. A rifampicina induz as isoformas CYP3A4 e CYP2C do CYP450, podendo reduzir a eficácia de anticoncepcionais orais, corticóides, warfarina, quinidina, zidovudina, antifúngicos azólicos. A terapia com rifampicina deve ser evitada em pacientes com AIDS em terapia com inibidores de protease análogos e não análogos de nucleosídeo, uma vez que o fármaco reduz ainda mais a biodisponibilidade destes agentes.

2.4.1.3. Pirazinamida

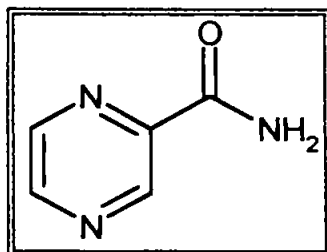


FIGURA 4 – Estrutura da pirazinamida.

É um isómero da nicotinamida, com atividade contra *M. tuberculosis*. Apesar do rápido desenvolvimento de resistência, é um agente antimicobacteriano muito empregado. Porém, a terapia combinada constitui método bastante eficaz para reduzir o surgimento de cepas resistentes. A atividade da pirazinamida é pH dependente, apresentando atividade ótima em pH 5,5.

Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, porém, estudos recentes sugerem que a PZA age como pró-fármaco, onde microrganismos susceptíveis produzem pirazinamidase, enzima responsável pela hidrólise do fármaco em ácido pirazinóico, intracelularmente. A resistência ocorreria quando o gene que expressa pirazinamidase (*pnca*) é mutado. Esta biotransformação em ácido pirazinóico agiria reduzindo o pH próximo aos bacilos, tornando o ambiente inóspito para estes. Outra possível hipótese para explicar o mecanismo de ação da PZA seria sua similaridade com a nicotinamida, o que sugere que o ácido pirazinóico agiria como antimetabólito da mesma, interferindo, dessa maneira, com a biossíntese de NAD.

Estudos de relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSAR) definiram os requisitos básicos para a obtenção de análogos com atividade melhorada, entre eles: (1) hidrofiliabilidade suficiente para se obterem concentrações plasmáticas que permitam distribuição para os sítios de infecção; (2) lipofiliabilidade ideal para permear a parede celular dos bacilos e, (3) susceptibilidade tal à

hidrólise, que permita ao fármaco resistência às enzimas extracelulares e pronta hidrólise após penetração nas bactérias. Os derivados *t*-butil-5-cloropirazinamida e 2-(2'-metildecil)-5-cloropirazinamida, sintetizados após tais estudos, parecem ter se encaixado em tais critérios.

A pirazinamida é prontamente absorvida por via oral, sendo que pequena parte da molécula é excretada intacta. O fármaco é metabolizado pela pirazinamidase microsomal, oxidado a ácido 5-hidroxipirazinóico, o qual é excretado na urina na forma livre ou conjugada com glicina.

Seu principal efeito adverso é a hepatotoxicidade, dependente da dose administrada e da extensão do tratamento. A ingestão concomitante de alimentos e outros fármacos não interfere na sua absorção, com a exceção de antiácidos à base de alumínio e magnésio.

2.4.1.4. Etambutol

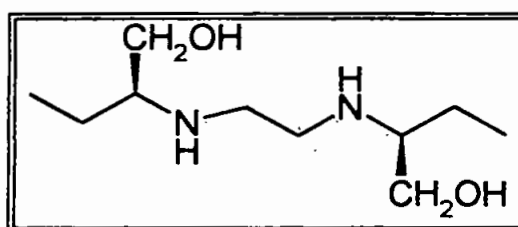


FIGURA 5 – Estrutura do etambutol.

Administrado como enantiômero (+), o qual é 200 a 500 vezes mais ativo que o enantiômero (-), sugerindo a existência de um receptor específico. Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas existem fortes evidências de que o EMB afeta a biossíntese da parede celular do *M. tuberculosis*, via inibição da enzima arabinosil transferase.

O *Mycobacterium* possui, além da porção peptidoglicana, um envelope externo constituído de arabinofuranose e galactose (AG), o qual está ligado covalentemente a lipoarabinomanana (LAM). A porção AG da parede celular, sendo bastante ramificada, contém diversos segmentos de galactana e arabinana, onde (na posição C5') se ligam os ácidos micólicos. A ação da arabinosil transferase seria catalisar a reação onde é gerada a porção AG. O etambutol, por sua vez, mimetiza a molécula de arabinana, resultando na síntese errônea do precursor D-arabinofuranosil-1-monofosforildecaprenol, bloqueando, assim, a biossíntese de AG e LAM, não permitindo o ancoramento dos ácidos micólicos.

O mecanismo de resistência consiste na super expressão de arabinosil transferase, controlada pelo gene *embAB*.

O etambutol atua sinergicamente com fármacos que atuam intracelularmente, como por exemplo, rifampicina. Uma vez que o dano causado à parede promovido pelo EMB facilita a entrada dos outros fármacos, o resultado é uma atividade biológica aumentada.

2.4.1.5. Etionamida

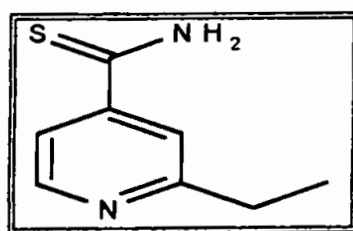


Figura 6 – Estrutura da etionamida.

É também um análogo da isonicotinamida, com atividade contra o *M. tuberculosis*.

Alguns estudos sugerem que seu mecanismo de ação é similar ao da isoniazida. Como esta última, é também considerada pró-fármaco, uma vez que é

convertida a sulfóxido (forma acilante) via oxidação pela catalase-peroxidase. O sulfóxido de etionamida, por sua vez, acila a enzima inhA enoil redutase, no aminoácido Cys 243.

A etionamida é administrada por via oral, sendo melhor tolerada com ingestão concomitante de alimentos.

Seus principais efeitos colaterais são hepatite e hipersensibilidade.

2.4.1.6. Ácido *para*-aminossalicílico

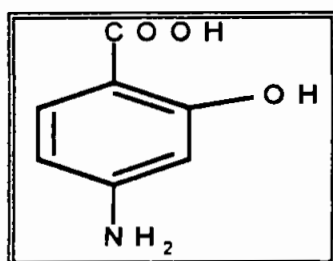


FIGURA 7 – Estrutura do PAS.

Agente outrora muito utilizado na terapia da TB, é, hoje em dia, fármaco de segunda escolha, devido ao desenvolvimento de resistência e aos seus efeitos adversos indesejáveis.

Atua como antimetabólito, uma vez que interfere na incorporação do ácido *para*-aminobenzóico na biossíntese de ácido fólico. O PAS é, geralmente, administrado concomitantemente à isoniazida, pois o primeiro age reduzindo o processo de acetilação da segunda, aumentando os níveis séricos do fármaco – o que constitui recurso útil no caso de pacientes acetiladores rápidos.

O PAS é metabolizado por acetilação do grupo amino e conseguinte conjugação com ácido glicurônico e glicina na porção carboxila. Seu uso é mais freqüente em casos de resistência e/ou intolerância a outros agentes.

2.4.1.7. Ciclosserina

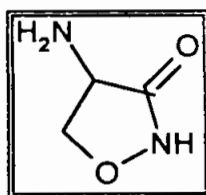


FIGURA 8 – Estrutura da ciclosserina.

É um produto natural, obtido de *Streptomyces orchidaceus*, como enantiômero D (+).

A *D*-ciclosserina (DCS) atua inibindo duas enzimas chaves – *D*-alanina racemase e *D*-alanina ligase, fundamentais na biossíntese da porção peptidoglicana da parede do *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência a este fármaco está associada à super expressão de *D*-alanina racemase.

É administrada por via oral, e amplamente distribuída, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, afetando a síntese e o metabolismo do ácido γ -aminobutírico (GABA). Dessa maneira, acarreta uma série de efeitos centrais, fazendo com que o fármaco seja utilizado somente em casos de reincidência e/ou resistência, sempre em combinação com outros agentes.

2.4.1.8. Capreomicina

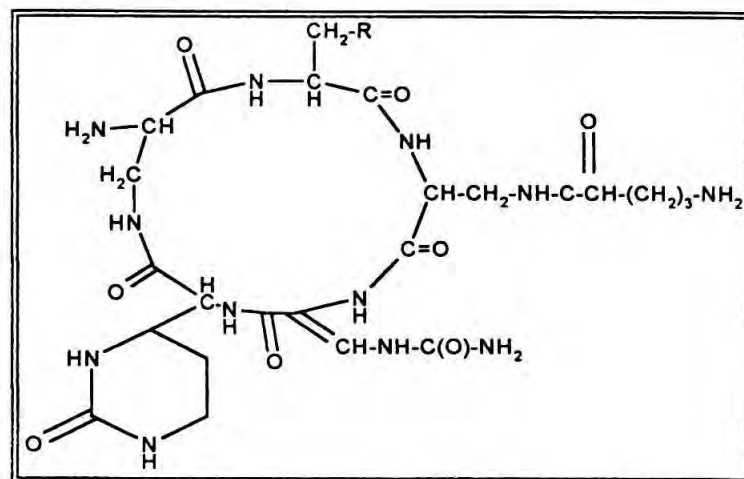


FIGURA 9 – Estrutura da capreomicina.

A capreomicina consiste em mistura de quatro polipeptídeos cíclicos, biossintetizada por *Streptomyces capreolus*. Seu mecanismo de ação ainda é praticamente desconhecido, porém, sua similaridade química e farmacológica com a viomicina leva à suposição que sua ação também seria similar. A viomicina é um potente inibidor de síntese protéica, pois atua no RNA mensageiro, ao nível da subunidade ribossômica 70S, bloqueando a elongação da cadeia polipeptídica.

Por ser um fármaco polipeptídico, sua administração é parenteral, preferencialmente intramuscular. Também é usada em casos de resistência e/ou reincidência, sendo geralmente associada com isoniazida ou etambutol. Seus efeitos tóxicos incluem danos hepático e renal, perda de audição e reações de hipersensibilidade.

2.4.1.9. *Aminoglicosídeos*

São agentes antibacterianos, de origem natural ou semi-sintética, constituídos, geralmente, de três anéis, sendo um ciclitol (anéis saturados de 6 carbonos) e açúcares (pentose ou hexose) ligados através de ligações glicosídicas, com massa molecular entre 300 e 600 Daltons. Podem ser também classificados como aminociclítóis, devido à unidade de álcool cíclico aminado (FORGE, SCHACHT, 2000).

Os grupamentos amínico e hidroxila conferem a esta classe de antibióticos alta hidrossolubilidade e caráter básico (pKa 13,6) (WILLIAMS, 2002) - características que ditam as regras no perfil farmacocinético destes fármacos, como por exemplo, baixa absorção oral (apenas 1% de uma dose atinge a corrente sanguínea por via gastrintestinal). Conseqüentemente, os aminoglicosídeos são administrados parenteralmente – principalmente por injeção intramuscular ou intravenosa; e topicamente, na forma de gotas auriculares ou soluções para lavagem peritoneal (CHAMBERS, 2001a).

Os aminoglicosídeos agem inibindo a síntese protéica bacteriana, por se ligarem à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos (processo dependente de energia). Desse modo, ocorrem alterações nos códons, resultando em leitura errônea do RNA mensageiro e gerando, assim, síntese protéica defeituosa. Uma vez que atravessam a membrana celular, por transporte ativo oxigênio-dependente, em sistema transportador de poliaminas, são também capazes de desestabilizar a integridade das membranas de microrganismos Gram-negativos, por deslocar cátions divalentes, que funcionariam como "pontes" entre moléculas de lipopolissacarídeos. O efeito dos aminoglicosídeos é bactericida e pode ser potencializado por agentes que interferem na síntese de parede celular (HEGDE, JAVID-MAJD, BLANCHARD, 2001; RANG, RITTER, DALE, 1997).

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo o mais importante deles a inativação por enzimas microbianas,

transportadas por genes plasmídicos. Tais enzimas catalisam a modificação covalente de grupamentos amínicos e hidroxilas, levando a estruturas modificadas, que se ligam deficientemente aos ribossomos, inativas, portanto. As principais enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são: *N*-acetiltransferases (AAC), que, acetilam os grupos amínicos via acetilcoenzima A; *O*-nucleotidil transferases (ANT) e *O*-fosfotransferase (APH), que usam ATP como doador de grupos fosfato, alterando as funções hidroxila (MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999). A **Figura 10**, a seguir, mostra os diversos sítios de ataque das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos na canamicina B.

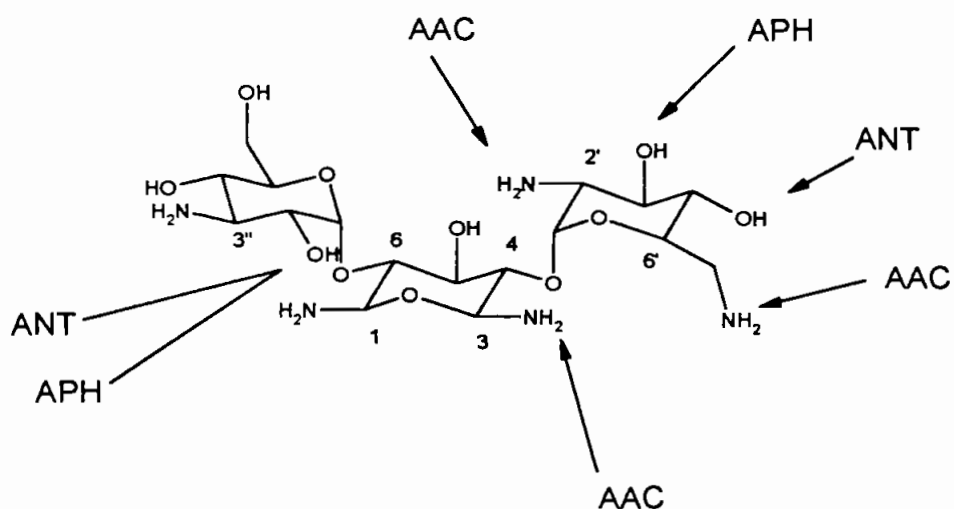


Figura 10 – Sítios de inativação por AAC, ANT e APH na canamicina B.

As principais modificações moleculares que têm sido feitas no sentido de tornar os aminoglicosídeos resistentes à inativação são:

(a) *Acilação ou alquilação na posição 1* – A base desta estratégia reside no fato de que as butirosinas de ocorrência natural, possuindo um grupo aminoacil na posição *N*-1, são altamente resistentes às enzimas inativadoras, sem perder a atividade intrínseca contra cepas suscetíveis. Tal observação levou ao desenvolvimento de aminoglicosídeos semi-sintéticos, como amicacina, isepamicina e arbecacina (as duas últimas não utilizadas na clínica). Estes compostos também oferecem

proteção à posição 2" por impedimento estérico. A alquilação na posição N-1 também oferece proteção dos grupos nas posições 2" e 3, apresentando maior atividade que os derivados aminoacil (TSUKIURA *et al.*, 1973; WOO *et al.*, 1971).

(b) *Inversão de quiralidade* – Invertendo-se a quiralidade dos substituintes de um carbono no qual está ligado um grupo funcional alvo para enzimas inativadoras pode tornar tal grupo resistente à inativação. Estudos mostraram que, ao se mudar a orientação do grupo 5-OH, de equatorial para axial, ocorrerá resistência à inativação pelas enzimas ANT(2"), AAC(2') e AAC(3) (ALBERT *et al.*, 1985, TSUCHYIA *et al.*, 1993).

(c) *Substituição no C1* – Na busca por alternativas às substituições em N-1, foi experimentada a ligação direta de várias cadeias laterais ao carbono 1 da 2-desoxi-estreptamina. A hidroximetilação nesta posição da gentamicina C2 ofereceu atividade e resistência à inativação nas posições 2", 3, 2', e 6'. Esta substituição, no entanto, foi ineficaz na canamicina (VAN SCHEPDAEL *et al.*, 1991).

(d) *Halogenação* – Esta estratégia permite não só evitar inativação enzimática na função derivatizada, como também proteger as funções da vizinhança graças à eletronegatividade dos halogênios. No entanto, os derivados halogenados apresentam atividade insatisfatória, desencorajando maiores investimentos nestes compostos (SHITARA *et al.*, 1992).

(e) *Outras modificações* – Para proteger a canamicina da inativação por AAC(6'), foi proposta a substituição do C-3' endocíclico por um átomo de oxigênio em um anel dioxano, causando, assim, mudança na conformação e decréscimo de polaridade pela remoção do grupo 3'-OH. A baixa atividade apresentada por estes compostos requer maiores investigações acerca deste tipo de modificação molecular (KUWAHARA, TSUCHYIA, 1996).

Mutações que afetam tanto os sítios de ligação no RNA ribossômico das bactérias, quanto a membrana celular podem, também, conferir resistência marcante e rápida à sua atividade (KAWAGUCHI *et al.*, 1972; RANG, RITTER, DALE, 1997; CHAMBERS, 2001a).

A ineficácia da benzilpenicilina no tratamento de processos infecciosos provocados por microrganismos Gram-negativos foi o principal estímulo para a busca de agentes antimicrobianos eficientes contra estas bactérias. No período de 1939 a 1943, foram estudados vários actinomicetos presentes no solo, bem como a biossíntese de potenciais agentes antimicrobianos por estes microrganismos. O primeiro relato público, feito por Schatz e colaboradores, em 1944 (SCHATZ, BUGIE, WAKSMAN, 1944), compreendia a descoberta de uma potente substância antimicrobiana capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como bacilos da TB – a estreptomicina. Sendo assim, dispõe-se, hoje, do uso de aminoglicosídeos contra microrganismos entéricos Gram-negativos e em casos de sepse. São administrados juntamente com penicilina ou cefalosporina nas infecções causadas por *Listeria* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Nestes casos, os compostos de escolha são gentamicina e tobramicina. No caso de resistência a estes dois últimos, utiliza-se netilmicina e amicacina, que possui o mais amplo espectro dentre os aminoglicosídeos. A indicação original contra *M. tuberculosis* continua até os dias atuais, uma vez que estreptomicina e amicacina (esta última não usada no Brasil) são fármacos de escolha nos regimes contra a emergência de TB resistente a múltiplos fármacos (EDSON, TERREL, 1999; FORGE, SCHACHT, 2000; RANG, RITTER, DALE, 1997).

Como já descrito anteriormente, os aminoglicosídeos são altamente polares, por serem policátions. Sendo assim, praticamente não são absorvidos por via oral e sua ligação com as proteínas plasmáticas é mínima. Atingem altas concentrações apenas nos líquidos articular e pleural, e são capazes de atravessar a placenta. Para o tratamento de meningite causada por bacilos Gram-negativos, se fazem necessárias administrações intratecal ou ventricular, uma vez que as concentrações líquóricas são ainda mais baixas que as plasmáticas. Sua meia-vida

plasmática é de 2 a 3 horas, e a eliminação se dá por filtração glomerular. Aproximadamente 50 a 60% de uma dose parenteral são excretados sem sofrer alterações no prazo de 24 horas. Durante tratamentos prolongados, as concentrações teciduais podem atingir níveis tóxicos e, quando a função renal se acha comprometida, ocorre acúmulo ainda mais rápido do fármaco, potencializando seus efeitos tóxicos, como nefro e ototoxicidade (CHAMBERS, 2001b; RANG, RITTER, DALE, 1997).

Por muito tempo, acreditou-se que o número de grupos amino presentes na estrutura dos aminoglicosídeos estava relacionado com o grau de ototoxicidade. Porém, estudos recentes mostraram não ser este o fator determinante e a relação estrutura-toxicidade permanece desconhecida (FORGE, SCHACHT, 2000).

Os aminoglicosídeos apresentam efeitos colaterais agudos descritos desde a década de 1950, por Vital-Brazil e Corrado. Tais efeitos consistem em bloqueio dos canais de cálcio nos neurônios tipo N, P e Q, similar ao produzido pelo curare, e reversível na presença de íons cálcio (PICHLER *et al.*, 1996). Esta habilidade em deslocar cálcio causa distúrbios em outros mecanismos dependentes deste íon, como o potencial microfônico nas células da cóclea, sendo também reversível com a supressão da medicação, constituindo, assim, efeito agudo (DULON *et al.*, 1989).

A toxicidade crônica está diretamente ligada à administração parenteral de aminoglicosídeos por longos períodos e é caracterizada por danos renais, auditivos e vestibulares, não necessariamente manifestados em conjunto (FORGE, SCHACHT, 2000). A toxicidade renal (SWAN, 1997) ocorre por lesões nas células dos túbulos proximais e é acentuada quando a função dos rins está prejudicada, devido ao fármaco acumulado, como já descrito.

A ototoxicidade está diretamente relacionada à destruição das fibras nervosas do oitavo par craniano, decorrente da morte das células ciliadas no órgão de Corti, conduzindo à surdez permanente e/ou disfunções vestibulares, uma vez que os epitélios sensoriais do ouvido interno são substituídos por epitélio escamoso não especializado. O potencial tóxico varia entre os aminoglicosídeos, sendo

neomicina o mais tóxico; canamicina e tobramicina, de toxicidade intermediária, e amicacina e netilmicina, os menos tóxicos (BLAKLEY, 1997).

A extensão das lesões está diretamente relacionada ao grau do dano epitelial, aos estados nutricional e imunológico do paciente, bem como a sua função renal. Considerando-se os fatores anteriormente mencionados, tais lesões podem vir a ser reversíveis, se as fibras nervosas não chegarem a ser comprometidas (FORGE, SCHACHT, 2000).

2.4.1.9.1. Estreptomicina

Descoberta em 1944, como substância ativa contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *M. tuberculosis*, a estreptomicina é biossintetizada pelo actinomiceto *Streptomyces griseus*, extraído do solo. Foi produzida em larga escala nos anos 1950 e muito usada na clínica nessa época. Devido a seus efeitos tóxicos e ao rápido surgimento de resistência bacteriana, seu uso foi diminuindo, enquanto se desenvolviam novas alternativas terapêuticas. Apesar das desvantagens já descritas, a estreptomicina continua sendo empregada em algumas infecções, como brucelose, endocardite bacteriana e peste, em sinergia com agentes inibidores da biossíntese de parede. Seu uso no tratamento da TB multi-resistente emergente vem sendo recomendado por diversos órgãos competentes (FORGE, SCHACHT, 2000; MOSSA *et al.*, 1987; CHAMBERS, 2001b).

Além dos efeitos tóxicos já descritos no item 1.3.1.9 (nefrotoxicidade e ototoxicidade), foram relatados, também, casos de hipersensibilidade, discrasias sangüíneas e neurite periférica no local de aplicação. A estreptomicina está disponível em forma de sulfato, em solução injetável (KOROLKOVAS, 2002; CHAMBERS, 2001b).

Estrutura opticamente ativa, possuindo três anéis, este antibiótico consiste em uma base triácídica, contendo um grupamento aldeído ligado a um de seus anéis. Sua estrutura é formada por unidades estreptidina (1), estreptose (2) e *N*-

metil-L-glicosamina (3), unidas por ligações glicosídicas (Figura 11) (MOSSA *et al.*, 1987).

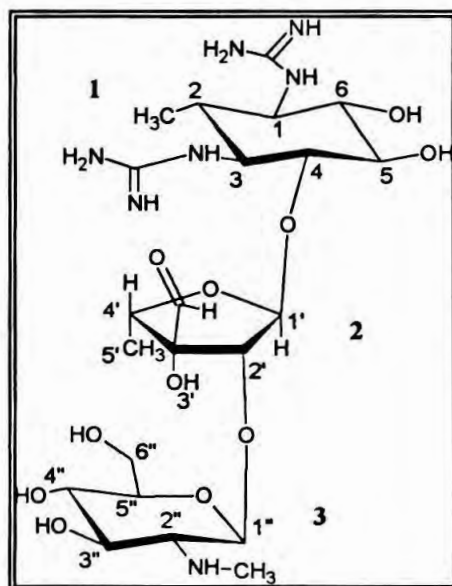


Figura 11- Estrutura da estreptomicina A : *O*-2-Desoxi-2-(metilamino)-α-L-glicopiranosil-(1→2)-*O*-5-desoxi-3-*C*-formil-α-L-lixofuranosil-(1→4)-*N,N'*-bis(aminoiminometil)-D-estreptamina.

Para se obterem derivados menos tóxicos, mais ativos e não suscetíveis à inativação por enzimas microbianas, modificações estruturais na porção α-estreptose do antibiótico foram amplamente estudadas (MITSCHER, 1995), como, por exemplo, redução do grupo 3-*C*-formil. A primeira, resultando em diidroestreptomicina, mostrou atividade similar ao protótipo, porém, maior potencial para causar surdez. A conversão aldeído-base de Schiff e derivados (oxima, semicarbazona e fenil-hidrazona) resulta em análogos inativos. A oxidação da metila na posição 5 a álcool não fornece vantagens em relação ao protótipo.

As modificações no grupo aminometil da porção glicosamina por desmetilação ou substituição por grupos alquílicos volumosos levam à redução da atividade, bem como a remoção dos grupos guanidínicos da porção estreptidina.

2.4.1.9.2. Amicacina

Aminoglicosídeo semi-sintético, derivado hidroxibutírico da canamicina A. Foi estrategicamente planejado, para tornar o aminoglicosídeo resistente à inativação, como já descrito no item 2.4.1.9.

Em 1976, foi aprovado pelo FDA o uso da amicacina. Desde então, é bastante usada na clínica em infecções causadas por microrganismos Gram-negativos, e também como fármaco de segunda escolha no tratamento de TB. Porém, a emergência de TB multi-resistente fez da amicacina alternativa para esta forma da doença, a despeito de sua toxicidade (MONTELEONE *et al.*, 1983).

A amicacina foi preparada e avaliada por Kawaguchi *et al.*, em 1972, sendo originalmente chamada de BB-K8. É obtida por acilação da canamicina A, no grupamento amino da posição C-1 da porção 2-desoxiestreptamina, com o grupo L(-)-4-amino-2-hidroxibutiril. Como a estreptomicina, também está disponível na forma de sulfato, em solução injetável.

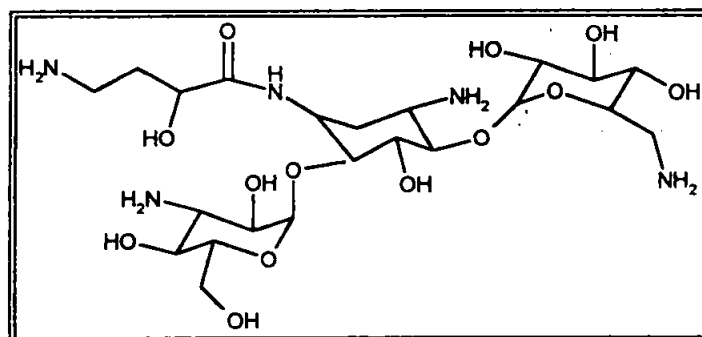


Figura 12 - Estrutura da amicacina: O-3-amino-3-desoxi- α -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)- α -[6-amino-6-desoxi- α -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 6)]-N-(4-amino-L-2-hidroxibutiril)-2-desoxi-L-estreptamina.

São, então, resumidas na tabela I, algumas características dos principais fármacos utilizados na terapia da TB.

TABELA I – Principais características de tuberculostáticos

	ANO*	ATIV.	ALVO	TX.MUT.**	ADM.	TOX.	CUSTO
Primeira Escolha							
ISONIAZIDA	1952	++++	Ác .micólicos	10^{-8}	oral	baixa	baixo
RIFAMPICINA	1965	++++	RNApolimerase	10^{-10}	oral	baixa	médio
PIRAZINAMIDA	1970	+++	?	10^{-3}	oral	baixa	médio
ESTREPTOMICINA	1944	+++	Prot. ribossômica	10^{-8}	i.m.	média	alto
ETAMBUTOL	1968	++	Bioss. Parede	10^{-7}	oral	baixa	médio
Segunda Escolha							
ETIONAMIDA	1966	+++	?	10^{-3}	oral	alta	médio
AMICACINA	1957	+++	Prot. ribossômica	10^{-6}	i.m.	média	alto
CICLOSSERINA	1955	++	Bioss. parede	10^{-10}	oral	alta	alto
CAPREOMICINA	1967	++	?	10^{-3}	i.m.	média	alto
PAS***	1946	+	Bioss. folatos	10^{-8}	oral	média	baixo

*ano de introdução na terapêutica; **taxa de mutação; ***ácido *para*-aminossalicílico.

Fonte: Adaptado de Johns Hopkins Center for Tuberculosis Research, 2003.

2.5. Introdução de novos fármacos na terapêutica

A introdução de novos fármacos na terapêutica, principalmente quimioterápicos, tem se tornado cada vez mais necessária, frente à ocorrência de resistência dos agentes patogênicos aos fármacos disponíveis no arsenal terapêutico. Os métodos de modificação molecular são os mais utilizados (WERMUTH, 1996a), considerando-se as dificuldades envolvidas na descoberta de substâncias farmacologicamente ativas de estruturas completamente novas. Desse modo, a introdução, retirada ou modificação de grupos químicos a partir de um protótipo conhecidamente ativo, a fim de melhorar suas propriedades terapêuticas, é recurso prático e útil.

Dentre os métodos de modificação molecular mais empregados, tem-se a latenciação (STELLA, HIMMELSTEIN, 1985; BUNDGAARD, 1991; FRIIS, BUNDGAARD, 1996; TESTA, CALDWELL, 1996; CHUNG, FERREIRA, 1999), que consiste na transformação química de um fármaco em forma inativa de transporte, a qual pode ser convertida, química ou enzimaticamente, ao fármaco de origem, no interior do organismo, podendo, assim, exercer seu efeito terapêutico. Vários fatores justificam a preparação de formas latentes de compostos biologicamente ativos (KOROLKOVAS, 1988): toxicidade, instabilidade química, baixa solubilidade, propriedades organolépticas indesejáveis, baixa biodisponibilidade, entre outros. Apesar de se tratar de processo que emprega metodologia simples, a latenciação permite a reintrodução, na terapêutica, de fármacos antes descartados por suas propriedades indesejáveis, sendo que tais fármacos poderiam ser a melhor alternativa para o tratamento de determinadas doenças. Em suma, a latenciação visa a diversos objetivos (STELLA, HIMMELSTEIN, 1985; BUNDGAARD, 1991; FRIIS, BUNDGAARD, 1996; CHUNG, FERREIRA, 1999), dentre eles:

- (1) Aumento da biodisponibilidade;
- (2) Prolongamento de ação;
- (3) Redução na toxicidade;
- (4) Seletividade de ação;
- (5) Resolução de problemas de formulação.

Wermuth, em 1984, subdividiu as formas latentes da seguinte maneira:

- **Pró-fármacos** { Pró-fármacos clássicos
Bioprecursores
- **Fármacos dirigidos**

Pró-fármacos clássicos (STELLA, CHARMAN, NARINGEKAR, 1985; BUNDGAARD, 1991; WERMUTH, GAIGNAULT, MARCHANDEAU, 1996), são formas de transporte inativas, que, por meio de ligações exclusivamente hidrolisáveis, liberam a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Em alguns casos, o transportador usado também pode apresentar ação farmacológica, originando pró-fármacos recíprocos (SINGH, SHARMA, 1994).

Bioprecursores (WERMUTH, 1996a) são formas latentes biotransformadas por via quase que exclusivamente enzimática, ou por sistemas celulares de oxidação-redução, ou seja, devem ser transformados em metabólitos ativos.

Fármacos dirigidos (SCHACHT, 1996), por sua vez, são formas de transporte inativas em que a substância ativa é unida a um transportador de característica peculiar, dependendo da seletividade por determinado grupo celular, tecido ou órgão. Receptores na superfície das células reconheceriam e se ligariam ao transportador, permitindo, por endocitose, que o conjugado fármaco-transportador fosse levado ao interior da célula e ali dissociado, sendo o fármaco liberado

mediante ação de enzimas lisossômicas para agir no alvo específico. Seu principal objetivo é minimizar os efeitos colaterais que ocorrem quando a substância ativa interage com estruturas que não são seu alvo de ação. Segundo um conceito de Ehrlich, devem ser encontradas substâncias que tenham especial afinidade por certos órgãos e utilizá-las como transportadores de fármacos. Estruturas macromoleculares como glicoproteínas e polissacarídeos (STOCKERT *et al.*, 1982; TAKAKURA, HASHIDA, 1995) possuem propriedades físico-químicas e funções biológicas variadas, possibilitando a sua utilização em processos de latenciação de fármacos.

2.6. Transporte de fármacos para o sistema respiratório

Compostos pequenos, passíveis de serem nebulizados ou administrados na forma de aerossóis têm sido bastante estudados como transportadores de fármacos para o sistema respiratório, para se obterem altas concentrações do agente terapêutico no local de ação, evitando metabolização e efeitos sistêmicos.

Para tanto, os lipossomas constituem uma das classes mais pesquisadas e utilizadas, por serem bastante versáteis, pois podem ser associados tanto a fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. Seu tamanho também é bastante controlável, permitindo a obtenção de estruturas suficientemente pequenas. São usados para o transporte de agentes citotóxicos (JULIANO, McCULLOUGH, 1980), broncodilatadores, como aminas simpatomiméticas (KAMAREL *et al.*, 1989) e agentes antiasma, incluindo-se aí profiláticos como cromoglicato de sódio, aumentando a biodisponibilidade destes fármacos (TAYLOR *et al.*, 1989). Também foram descritos agentes antibacterianos associados a lipossomas que tiveram sua atividade aumentada em infecções intracelulares (COUVREUR, FATTAL, ANDREMONT, 1991), devido à rápida captura por macrófagos (GONZALES-ROTHI *et al.*, 1991). A literatura também descreve a administração de insulina por via pulmonar, utilizando lipossomas (CLOTHORPE *et al.*, 1992).

As microesferas biodegradáveis também têm sido relatadas como transportadores de fármacos para o trato respiratório. Tais estruturas são produzidas com compostos naturais, como albumina (GUPTA *et al.*, 1989; TODISCO *et al.*, 1990), ou sintéticos, como ácido poli(láctico-co-glicólico) (TICE, MASON, GILLEY, 1989).

O emprego de conjugados macromoleculares como transportadores de fármacos para o trato respiratório é, sem dúvida, abordagem bastante atraente, principalmente em se tratando de administração intravenosa (ZENG, MARTIN, MARRIOTT, 1995).

No caso de fármacos hidrofílicos, como aminoglicosídeos, a massa molecular é fator fundamental, uma vez que suas características não permitem absorção através do epitélio das vias aéreas. Moléculas grandes permitem seu transporte até o local de ação, liberando o fármaco no sítio de infecção (SCHANKER *et al.*, 1986). Sabendo-se, também, que a atividade das esterases pulmonares é bastante alta, a conjugação dos fármacos às macromoléculas via ligações éster ou amida poderá também ser fator determinante para retenção do fármaco no local de ação. Polímeros bastante hidrofílicos como dextrano, polietilenoglicóis (PEGs) e poli(2-hidroxi)etil)aspartamida (PHEA), são bastante descritos como transportadores, pois possuem grupos hidroxila bastante reativos, ligações bastante estáveis, baixas imunogenicidade e toxicidade (ZENG, MARTIN, MARRIOTT, 1995). As ciclodextrinas também têm sido estudadas com essa finalidade, fazendo complexos de inclusão ou ligações covalentes com os fármacos a serem transportados (UEKAMA, OTAGIRI, 1987).

Recentemente, os transportadores mais explorados são micelas poliméricas constituídas de polietilenoglicol-fosfatidil etanolamina (PEG-PE) e ácido poli(L-láctico), pois, além de possuírem tamanho na ordem de nanômetros, são muito úteis como transportadores de fármacos com problemas de solubilidade, como m-porfirinas, tamoxifeno, paclitaxel e doxorubicina (GAO *et al.*, 2002; YOO, LEE, PARK, 2002).

Micropartículas de ácido poliláctico-co-glicólico também foram utilizadas com sucesso no transporte de isoniazida (DUTT, KHULLER, 2001). Os sistemas dendríticos, por sua vez, constituem outra abordagem bastante discutida por permitir grande flexibilidade e versatilidade em relação a sistemas lineares e/ou hiper-ramificados no transporte de fármacos (FRECHET, 1994; IHRE *et al.*, 2002).

2.7. Manana

Polímero de origem natural constituído de unidades α -D-manosídicas, é um dos três principais polissacarídeos da parede celular de diversos gêneros de leveduras, sendo os outros dois glicogênio e glicana. Muito estudada nas décadas de 1940-50-60, por ser mais abundante, a manana extraída de *Saccharomyces cerevisiae* teve sua estrutura elucidada após muitos anos de pesquisas e muitas controvérsias.

A manana constitui aproximadamente 14% do peso seco do lêvedo de cerveja (TREVELYAN, HARRISON, 1952). Sua estrutura foi inicialmente estudada através de metilação e hidrólise, onde os componentes metilados e não metilados (2,3,4,6-tetra-, 2,3,4-tri- e 3,4-di-*O*-metilmanose) foram encontrados em proporções molares aproximadamente iguais (HAWORTH, HIRST, ISHERWOOD, 1937). Análises subseqüentes demonstraram que a fração tri-*O*-metil continha somente 10% do isômero 2,4,6; e os 90% restantes consistiam de proporções equimolares de 2,4,6- e 3,4,6-tri-*O*-metilmanose. Desse modo, concluiu-se que, a manana contém, em sua estrutura, ligações 1,6, 1,2 e 1,3 nas proporções 2:3:1, onde as ligações 1,2 constituiriam a cadeia principal com resíduos ligados em 1,6, na configuração α (HAWORTH, HEATH, PEAT, 1941).

A figura 13 mostra, esquematicamente, a estrutura da manana.

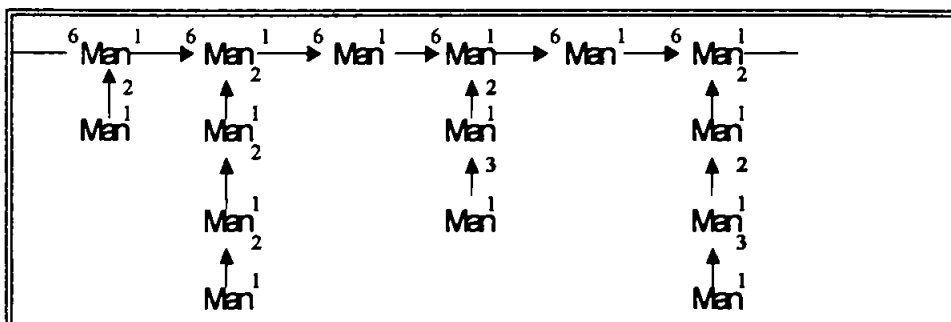


Figura 13 – Representação esquemática da estrutura da manana (Man = unidade manosídica).

Outros trabalhos conduzidos por Peat e colaboradores (1961) demonstraram, após processos de metilação, hidrólise ácida e fragmentação por acetólise, com separação em carvão altamente ativado e análise por cromatografia em papel e eletroforese, predominância de 6-*O*- α -d-manopiranosil-d-manose, bem como resíduos 1,2. Praticamente não foram detectadas ligações 1,3. Não se chegou a nenhuma conclusão definitiva acerca da estrutura da manana, somente a evidências de que a cadeia principal é constituída de ligações α -1,6, com grande número de ramificações.

Estudos visando explicar a especificidade de diferentes preparações do polissacarídeo, através de mananas extraídas de diversas fontes pela técnica de acetólise, demonstraram que a estrutura do polissacarídeo varia consideravelmente, dependendo da cepa pesquisada (GORIN, SPENCER, 1970). Em 1965, Lee e Ballou sugeriram que a estrutura da manana é mais complexa do que proposto anteriormente. Visando isolar oligossacarídeos de manose, utilizando-se acetólise para a quebra do polissacarídeo e cromatografia gasosa dos derivados metil e trimetilsililados de manose para sua análise, demonstrou-se que, a estrutura básica da manana extraída de *S. cerevisiae* é mesmo constituída de ligações 1,6, 1,3 e 1,2, mas não necessariamente obedecendo a um padrão, ou

seja, heterogeneamente distribuídas, confirmando que a estrutura estaria, de fato, relacionada com a cepa de levedura estudada.

Utilizando as técnicas de metilação e acetólise controlada em manana de *Saccharomyces cerevisiae*, Stewart *et al.* (1968) obtiveram, por separação em coluna Sephadex, penta-, hexa- e hepta- oligossacarídeos que, também clivados, forneceram di-, tri- e tetrassacarídeos com ligações 1,2 e 1,3, sugerindo que estas unidades fossem conectadas através de ligações 1,6, originando assim fragmentos maiores. A comparação com mananas obtidas de cepas diferentes mostrou que os oligossacarídeos pouco variam em proporção de resíduos 1,2 e 1,3, e as ligações 1,6 constituem, de fato, os fragmentos maiores. Deve-se ressaltar, porém, que a variação na razão de resíduos 1,2 e 1,3 é bem maior quando se trata de gêneros diferentes de leveduras.

Em experimentos subseqüentes, Stewart e Ballou (1968) confirmaram a estrutura básica das mananas extraídas de *S. cerevisiae*. Utilizando a enzima bacteriana α -manosidase, removeram-se as ramificações 1,2 e 1,3, deixando intacta a estrutura do polissacarídeo somente com ligações 1,6. Após metilação, os açúcares foram separados por cromatografia líquida em coluna Sephadex e identificados por cromatografia em papel, utilizando reagentes apropriados.

Em 1970, Gorin e Spencer propuseram o uso de ressonância magnética nuclear protônica (RMN ^1H) para identificar diferentes subtipos de mananas e correlacioná-los com a levedura que contém o polissacarídeo em sua parede celular, uma vez que similaridades no espectro sugeririam similaridades na estrutura. Após isolar mananas de 450 espécies de leveduras utilizando extração em meio alcalino e complexação com cobre, foram feitos os respectivos espectros de RMN ^1H dos produtos obtidos.

Estima-se que este polissacarídeo extraído de *S. cerevisiae* possua, em média, 400 unidades manosídicas, tendo, assim, massa molecular média de 72 kDa (HAWORTH, HEATH, PEAT, 1941).

2.8. Receptores manosídicos na superfície de macrófagos

Células monocíticas, as quais se diferenciam em macrófagos, expressam em sua superfície receptores do tipo "scavenger", conhecidos por reconhecerem resíduos de *N*-metilglicosamina, fucose e manose. Os receptores manosídicos isolados de células humanas e murinas consistem em glicoproteínas de membrana com alta massa molecular (~170 kDa) e que requerem, para atividade ótima, pH neutro e íons cálcio (LENNARTZ, SESSIONS-COLE, STAHL, 1989).

A expressão destes receptores possui regulação bastante delicada, ligada a diversos fatores, incluindo alguns fármacos, como dexametasona e vitamina D, que, sabidamente, aumentam sua expressão. Os receptores manosídicos não são encontrados em isolados "frescos" de monócitos do sangue periférico e, tampouco de precursores monocíticos da medula óssea. Porém, a captação de ligantes manosilados pode ser observada em células já diferenciadas após 3 dias de incubação, através de marcação com isótopos radioativos. Após reconhecer macromoléculas carregadas negativamente, internalizar por endocitose e transportá-las para vesículas lisossomais, os receptores "scavenger" são rapidamente reciclados para a membrana celular (STAHL *et al.*, 1980; LENNARTZ, SESSIONS-COLE, STAHL, 1989).

2.9. Tendências no tratamento da TB – Vacina Gênica (LOWRIE *et al.*, 1999)

A vacina gênica contra *Mycobacterium* é constituída do gene codificador da proteína hsp65 (*heat shock protein*), de 65 kDa. Esta proteína é produzida pelas micobactérias em condição de estresse, atuando como antígeno e provocando resposta por parte do sistema imunológico.

O gene codificador de hsp65 é integrado a um plasmídeo e cercado, em primeira instância, por moléculas do glicolípido DMT (dimicolato de trealose) – utilizado como adjuvante por também ser encontrado na parede das micobactérias

e gerar resposta imune. Os plasmídeo encapsulado em DMT está, por sua vez, inserido em microesferas de 3 μ m de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), também contendo DMT na sua superfície.

Os glicolipídeos ativam os macrófagos, que irão fagocitar as microesferas, sem degradá-las. Os glicolipídeos irão, além de ativar os macrófagos, impedir a fusão das microesferas com lisossomos, quando estas forem fagocitadas pelos macrófagos. Ao entrar no vacúolo fagocitário, as microesferas irão entrar em contato com a água, que irá abrir poros pelos quais os plasmídeos sairão. Chegando ao núcleo, o plasmídeo dirigirá a síntese da proteína hsp65 que, associada a outras proteínas, chegará à membrana, sendo então liberada pelas células.

A hsp65 é, então, reconhecida por linfócitos CD4 e CD8 citotóxicos. Estes acionarão a produção de interferona gama e interleucinas 2 e 12 (IFN γ , IL-2, IL-12), que ativarão macrófagos não infectados, preparando-os para eliminar bacilos que porventura os invadam. Os macrófagos assim ativados também acionarão outros linfócitos CD8 que reconheceriam macrófagos infectados com micobactérias, produzindo enzimas para romper as células e destruir os bacilos liberados.

3 - OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Conforme é possível observar, a quimioterapia da tuberculose carece de novas alternativas, considerando-se a disseminação da TB-MDR. Os fármacos de segunda escolha, entre eles, os aminoglicosídeos estreptomicina e amicacina, constituem opções bastante eficazes no combate às cepas resistentes. Porém, a alta toxicidade desses fármacos, como lesão do oitavo par craniano, comprometimento renal, entre outros (KOROLKOVAS, 2002), ligada à extensão do tratamento, dificulta seu uso no combate à tuberculose multi-resistente pela estratégia DOTS-Plus. Como já anteriormente descrito, muitos estudos exploram o uso de macromoléculas como transportadores de fármacos, por serem as primeiras farmacologicamente inertes (NISHIKAWA *et al.*, 1993; TAKAKURA *et al.*, 1987; TAKAKURA *et al.*, 1994; TAKAKURA, HASHIDA, 1995; ZENG *et al.*, 1995, CARVALHO *et al.*, 2003) e, considerando-se os receptores manosídicos do tipo "scavenger" na superfície de macrófagos, podem ser exploradas formas latentes (fármacos dirigidos) dos aminoglicosídeos.

Muito se tem estudado acerca dos conjugados de macromoléculas com fármacos de alta toxicidade, visando transportá-los especificamente ao local de infecção, evitando assim os altos níveis séricos dos mesmos requeridos para efeitos terapêuticos satisfatórios (CHAKRABORTY, BHADURI, DAS, 1989; JUNG *et al.*, 1998; SETT, SARKAR, DAS, 1993; MUKHOPADHYAY, MUKHOPADHYAY, BASU, 1993; MUKHOPADHYAY *et al.*, 1992; GAC *et al.*, 2000; MAJUMDAR, BASU, 1991; MAJUMDAR, BASU, 1995).

Levando-se em conta que a manana se constitui em polimanosídeo, contendo, somente manose em toda sua estrutura, propõe-se a sua utilização como transportador seletivo dos aminoglicosídios mencionados. Com esse objetivo, a manana foi derivatizada, com espaçantes succinil e carboximetil, a fim de fornecer grupos reativos para ligação com os antibióticos.

Espera-se, dessa maneira, diminuir sensivelmente a toxicidade dos aminoglicosídeos a serem utilizados, pois os mesmos estariam em maior concentração no sítio de ação.

Em suma, nossos objetivos são:

- Obtenção da manana, extraída de *Saccharomyces cerevisiae*
- Derivatização da manana com espaçantes succinil e carboximetil
- Síntese de fármacos dirigidos de succinil e carboximetil manana com estreptomicina (**PARTE I**)
- Síntese de fármacos dirigidos de succinil e carboximetil manana com amicacina (**PARTE II**)
- Ensaios biológicos *in vitro* dos produtos obtidos:
 - a) em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* para determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
 - b) em culturas de macrófagos infectados, para determinação de atividade intracelular, tropismo e captação do polímero pelas células.

A figura a seguir esquematiza a estrutura dos fármacos dirigidos propostos

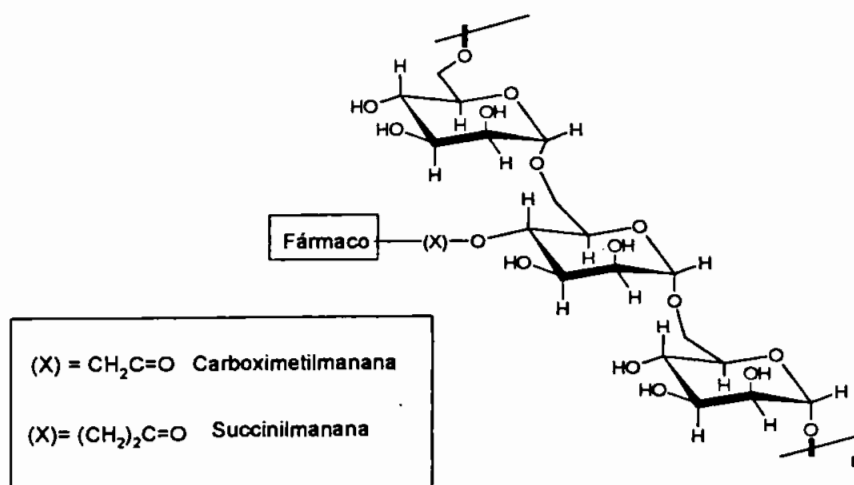


Figura 14 - Estrutura proposta para os compostos sintetizados

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes relacionados foram usados diretamente ou, quando necessário, tratados de acordo com métodos descritos por Perrin e Armarego (1988).

- ácido acético glacial (Merck)
- ácido clorídrico (Merck)
- ácido monocloroacético (Merck)
- ácido sulfúrico (Merck)
- álcool benzílico (Merck)
- álcool etílico comercial
- álcool etílico (Merck)
- álcool metílico (Merck)
- anidrido succínico (GPR)
- bicarbonato de sódio (Synth)
- carvão ativado (Mallinckrodt)
- 1,1'-carbonildiimidazol – CDI (Akros)
- cloreto de lítio (Aldrich)
- dicitcloexilcarbodiimida - DCC (Merck)
- dimetilaminopiridina - DMAP (Aldrich)
- etildiaminopropilcarbodiimida – EDC (Merck)
- hidróxido de bário (Merck)
- hidróxido de sódio (Merck)
- lêvedo de cerveja comercial
- membranas de acetato de celulose para diálise (Sigma)

-
- *N,N*-dimetilformamida - DMF (Merck)
 - ninhidrina (Merck)
 - piridina (Merck)
 - placas de sílica F-254 (Merck)
 - sulfato de amicacina (EMS)
 - sulfato de cobre (Merck)
 - sulfato de estreptomicina (FURP)
 - sulfato de magnésio (CRQ)
 - tartarato de sódio e potássio (Synth)
 - α -naftol (Merck)
 - óxido de deutério (Aldrich)

Equipamentos utilizados na síntese e purificação: chapas de aquecimento e agitação; agitadores mecânico e magnético; liofilizador Christ, modelo Alpha 1-2; centrífuga refrigerada para grandes volumes, Sorvall; bombas de alto vácuo Edwards; rotaevaporadores Büchi.

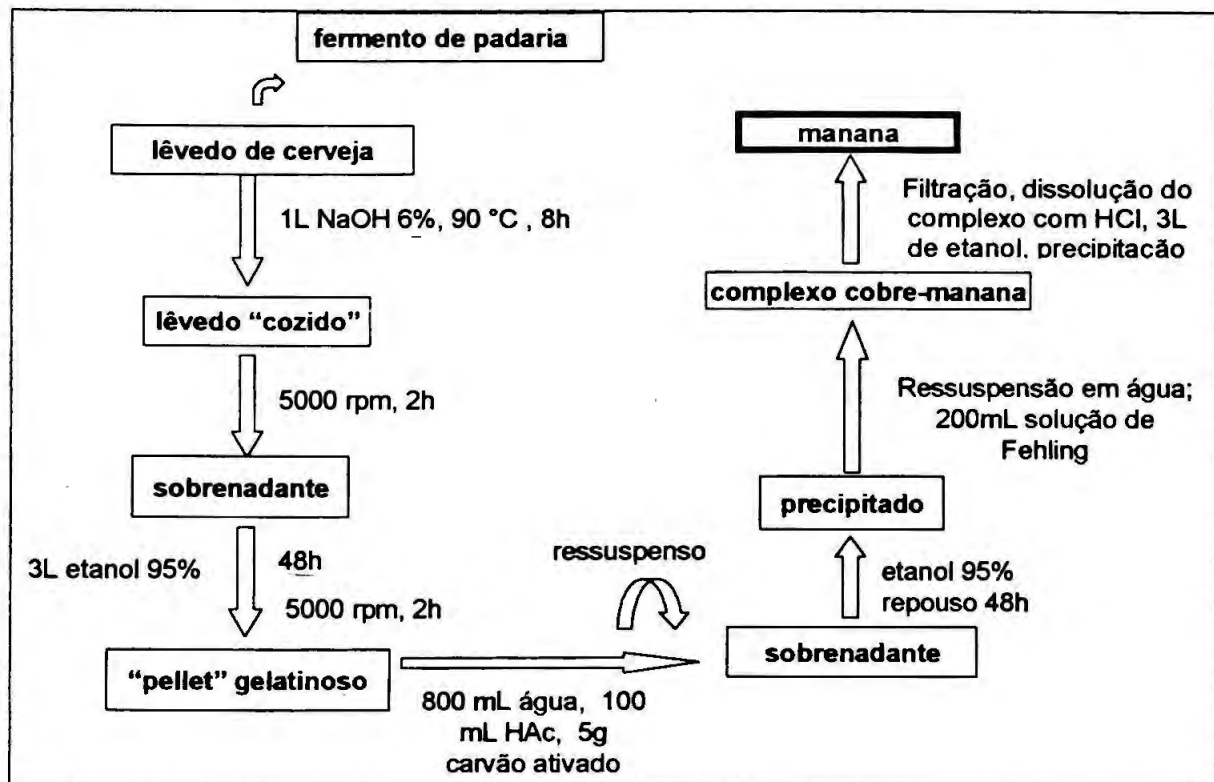
Demais materiais: vidraria comum em laboratórios de síntese, funis diversos, papéis de filtro, banhos de silicone, dessecador, estufas, trompas d'água.

*Observação: Os materiais utilizados nos ensaios biológicos são descritos nos itens referentes aos mesmos.

4.2. MÉTODOS

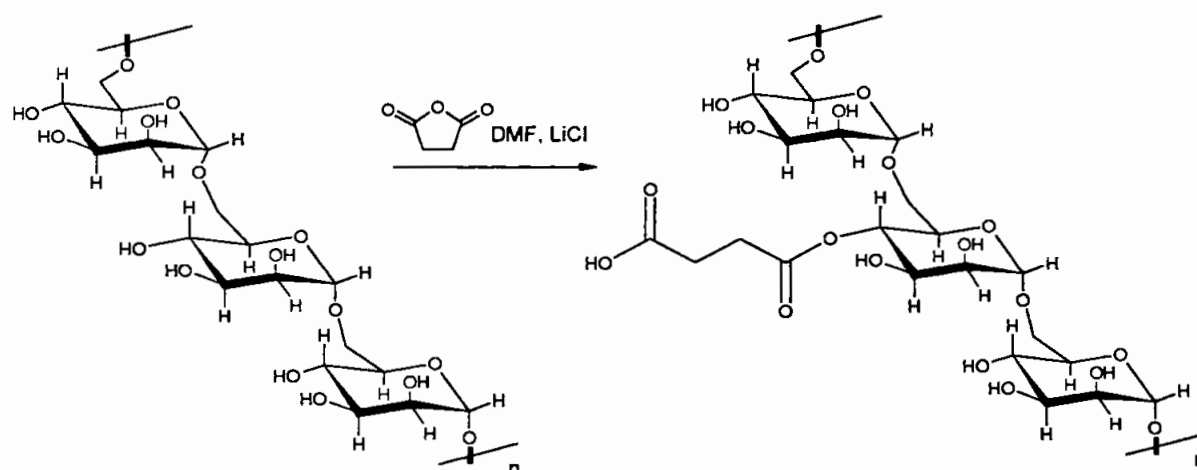
4.2.1. Obtenção dos transportadores seletivos para macrófagos

4.2.1.1. Extração da manana de *Saccharomyces cerevisiae* (HAWORTH, HIRST, ISHERWOOD, 1937)



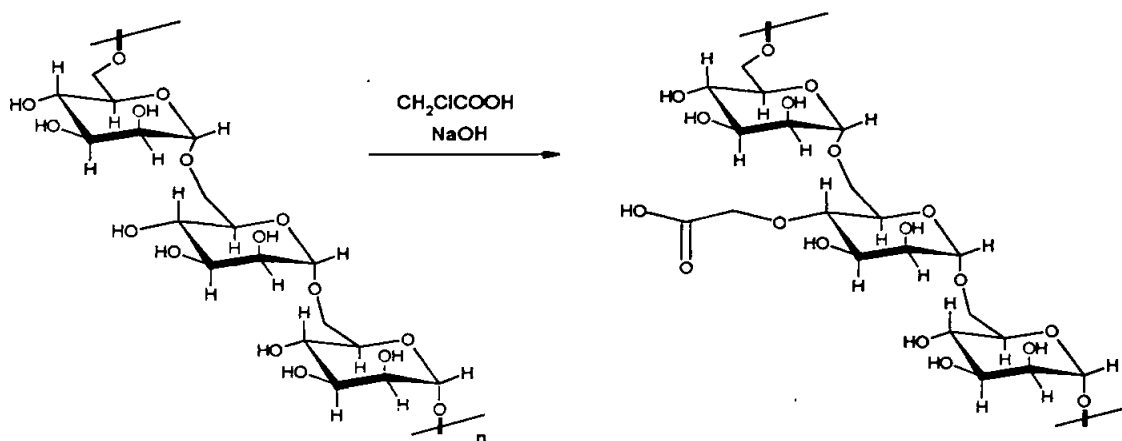
A manana foi extraída do fermento de padaria comercial, partindo-se de 350 g deste para as quantidades de solvente mostradas no esquema acima.

4.2.1.2. Preparação do derivado succinilado de manana (DSM) (adaptado de ARRANZ *et al.*, 1992)



Em balão de fundo redondo contendo 450 mL de DMF tratada e aquecida a 70 °C, adicionaram-se 9,0 g (210 mmol) de cloreto de lítio, sob agitação constante. Após a dissolução do sal, foram adicionados 9,0 g de manana e 8,6 mL (160 mmol) de piridina anidra. Após solubilização completa, acrescentaram-se 16,75 g (170 mmol) de anidrido succínico purificado. A mistura foi mantida a 90 °C por 30 horas, sob agitação constante. Ao término do tempo de reação, a mistura foi dialisada contra água destilada em membrana de *cut off* 12 000-14 000, por 72 horas, com 5 trocas de água. O produto foi, então, liofilizado e caracterizado.

4.2.1.3. Preparação do derivado carboximetilado de manana (DCM) (adaptado de DESVEAUX, PERCHERON, 1973)



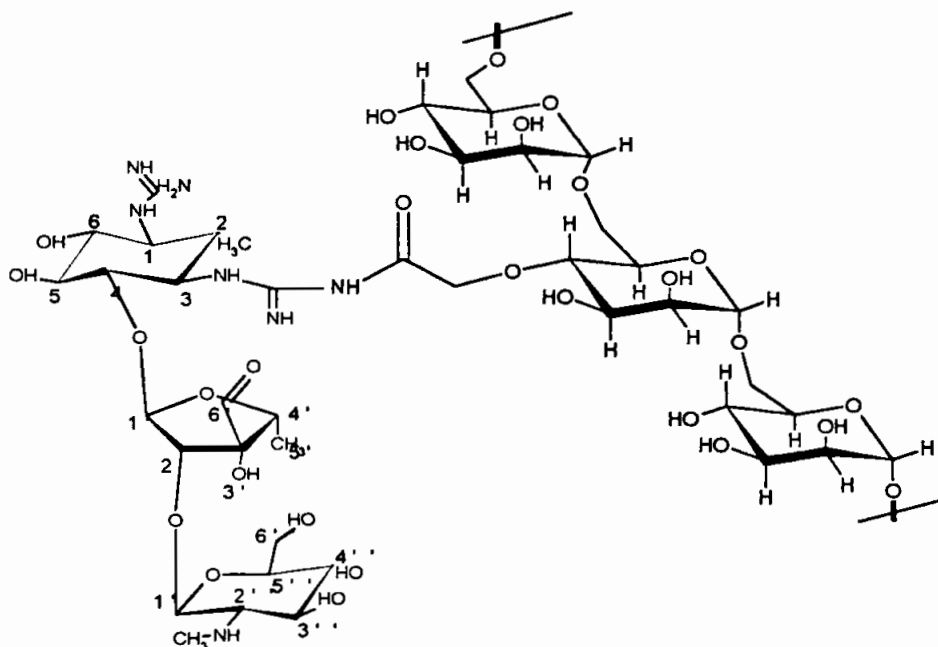
Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 5 g de manana e 100 mL solução de hidróxido de sódio 11,5 M, sendo a mistura aquecida a 70 °C. Após a dissolução, foram adicionados em pequenas porções de 10 g (210 mmol) de ácido monocloroacético, mantendo-se agitação e temperatura a 70 °C, por uma hora. A mistura resultante foi dialisada contra água destilada em membrana de *cut off* 12 000-14 000 por 72 horas, até pH constante. Após diálise, tratou-se o polímero derivatizado com HCl 0,2 M até pH 3,0. O produto final foi, então, liofilizado e caracterizado.

PARTE I

4.2.2. Obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM

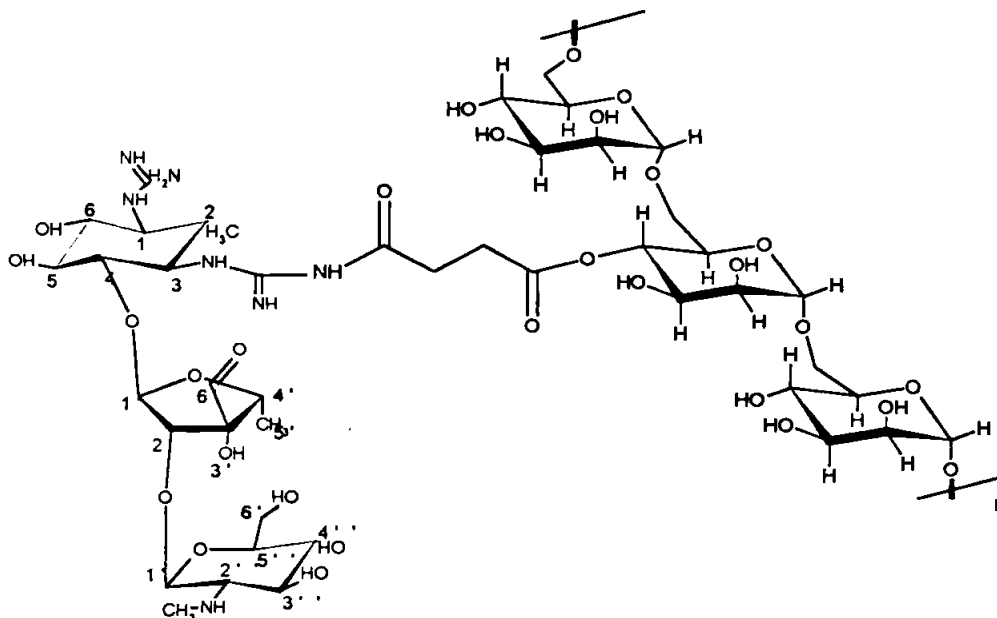
Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, uma vez que a estreptomicina é termossensível (LEMIEUX, WOLFROM, 1948).

4.2.2.1. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM



Solubilizou-se, sob agitação magnética vigorosa, 1,0 g (1,17 mmol de carboxilas livres) de DCM em água destilada qsp. Adicionou-se, então, 1,0 g (5,0 mmol) de DCC, previamente solubilizada em DMF qsp. A mistura foi deixada sob agitação por 20 minutos, ao fim dos quais, adicionou-se 0,47 g (1,64 mmol) de estreptomicina. A mistura reacional foi deixada sob agitação constante, pH 6,0 e temperatura ambiente por 72 horas, ao fim das quais filtrou-se o meio reacional lavando-se diversas vezes com água destilada em funil de Büchner simples, terra diatomácea e funil sinterizado. A fase aquosa foi, então, dialisada contra água destilada em membrana de *cut off* 12 000-14 000, por 48 horas, e liofilizada.

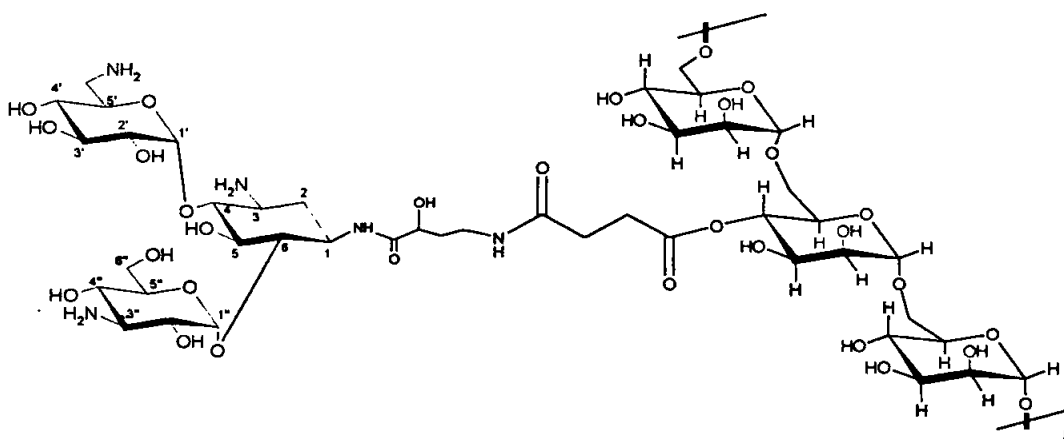
4.2.2.2. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DSM



Solubilizou-se, sob agitação magnética vigorosa, 0,6 g (1,62 mmol de carboxilas livres) de DSM em água destilada qsp. Adicionou-se, então, 1,0 g (5,0 mmol) de DCC, previamente solubilizada em DMF qsp. A mistura foi deixada sob agitação por 30 minutos, ao fim dos quais, adicionou-se 0,6 g (2,1 mmol) de estreptomicina. A mistura reacional foi deixada sob agitação constante, pH 6,0 e temperatura ambiente por 72 horas, ao fim das quais filtrou-se o meio reacional, lavando-se diversas vezes com água destilada em funil de Büchner simples, terra diatomácea e funil sinterizado. A fase aquosa foi, então, dialisada contra água destilada em membrana de *cut off* 12 000-14 000, por 48 horas, e liofilizada.

PARTE II**4.2.3. Obtenção de amicacina base**

Preparou-se uma solução saturada de sulfato de amicacina em água desionizada, procedendo-se à precipitação quantitativa com solução de hidróxido de bário. Após decantação completa do sulfato de bário (24 horas), retirou-se o sobrenadante, que foi concentrado em rotaevaporador (temperatura máxima 50 °C) e recristalizado de mistura isopropanol/metanol 1:1. Os cristais de amicacina base livre foram, finalmente, secados à pressão reduzida.

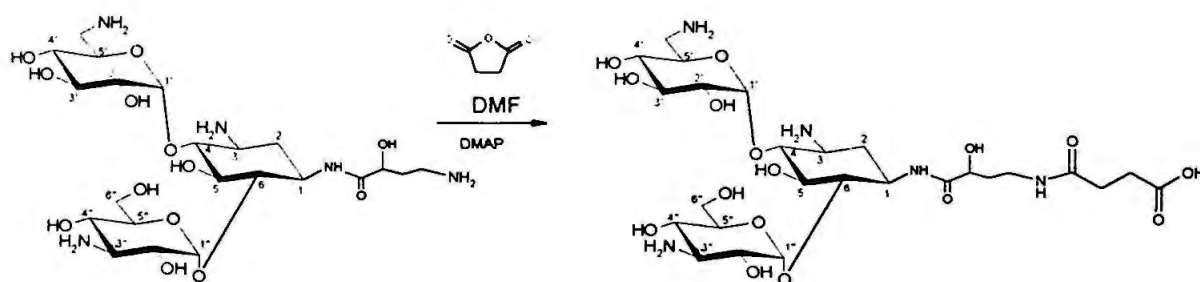
4.2.4. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina utilizando DSM
(Rota 1)**4.2.4.1. Síntese de fármacos dirigidos de amicacina utilizando DSM**

Solubilizou-se 0,30 g (0,81 mmol de carboxilas livres) de DSM em água destilada. Em seguida, adicionou-se 0,38 g (1 mmol) de EDC e a mistura foi

deixada sob agitação magnética constante e vigorosa, à temperatura ambiente, por 1 hora. Adicionou-se, então, 0,62 g (1,32 mmol) de amicacina base. A mistura foi, então, deixada nas mesmas condições por 60 horas. Ao término desse tempo, filtrou-se o meio reacional, obtendo-se um sólido pastoso de cor marrom. O sólido foi lavado com etanol e dialisado contra água destilada em membrana de *cut off* 12 000-14 000, por 72 horas, e, por fim, liofilizado.

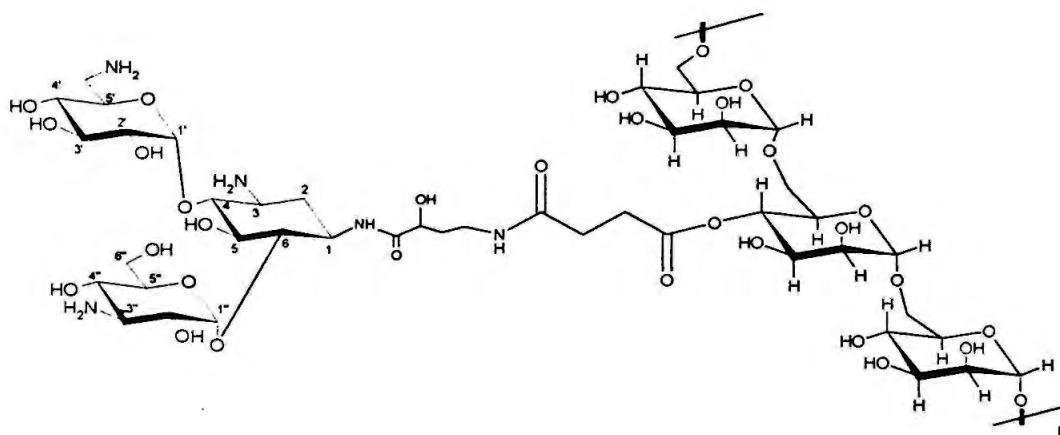
4.2.5. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina utilizando succinamida (Rota 2)

4.2.5.1. Preparação da succinamida de amicacina



Em balão de fundo redondo, acoplado a condensador de refluxo, solubilizou-se 0,1 g (1 mmol) de anidrido succínico purificado em 15 mL de DMF, sob agitação magnética e temperatura de 56 °C. Adicionou-se, então, 0,3 g (0,5 mmol) de amicacina base e, em seguida, 0,06 g (0,5 mmol) de DMAP. A mistura foi mantida sob agitação por 2 h e 30 minutos, filtrando-se à pressão reduzida. A fase líquida, de cor amarela, foi concentrada em rotaevaporador até que se obtivesse um óleo.

4.2.5.2. Acoplamento da succinamida de amicacina com manana (adaptado de Mc LEOD *et al.*, 1993)



Em balão de fundo redondo, acoplado a sistema de atmosfera inerte, solubilizaram-se 30 mg (0,037 mmol) da succinamida de amicacina em quantidade suficiente de DMF anidro. Adicionaram-se, então, 13 mg (0,08 mmol) de CDI e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. A seguir, adicionou-se 1 mL de solução 5% m/v de manana em DMF e 0,14 mL de trietilamina. A mistura reacional foi agitada por mais 21 horas, a 25 °C. Ao término do tempo, adicionou-se mistura de etanol/éter etílico (1:1), precipitando-se um sólido amorfo.

4.2.6. Análises

4.2.6.1. Espectroscopia no infravermelho

As análises de espectrofotometria no infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro FTIR Bomem, do Departamento de Farmácia da FCF-USP-SP, utilizando-se pastilhas de KBr grau espectrofotométrico, obtidas por compressão (para amostras sólidas) e celas de NaCl para amostras líquidas e pastosas.

4.2.6.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

As análises de RMN foram efetuadas no espectrômetro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 Brüker, modelo Advance DPX₅₀₀, operando a 300 MHz, da FCF-USP-SP, utilizando solventes deuterados e tubos adequados.

4.2.6.3. Determinação do grau de substituição dos polímeros derivatizados

A determinação foi feita quantificando-se as carboxilas livres presentes nos derivados de manana, utilizando-se solução padronizada 0,01 M de NaOH e fenolftaleína como indicador.

4.2.6.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A identificação presuntiva dos produtos de síntese foi realizada por determinação qualitativa da presença de grupos amino livres (presentes nos fármacos) pela revelação com ninhidrina sob aquecimento e α -naftol – revelador de carboidratos. As amostras foram eluídas utilizando-se sílica-gel F-254 e mistura de acetato de etila, ácido acético, álcool metílico e água, na proporção 60:15:15:10.

4.2.6.5. Determinação da faixa de fusão dos compostos obtidos

A determinação da faixa de fusão dos produtos foi efetuada no aparelho de ponto de fusão Microquímica, modelo 301.

4.2.6.6. Determinação quantitativa do acoplamento dos fármacos aos polímeros derivatizados

Esta determinação foi feita a partir da análise elementar de C, H e N, na Central Analítica do IQ-USP. Considera-se, aqui, para efeito de quantificação, somente o elemento nitrogênio, uma vez que este somente se encontra na molécula dos fármacos.

4.2.7. Avaliação Biológica Preliminar

4.2.7.1. Meios de cultura e reagentes

- Meios Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H9
- Enriquecimento OADC para meio 7H9
- Alamar Blue
- Tween 80
- Rifampicina

4.2.7.2. Amostras

Para avaliação dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM, foi utilizada a cepa virulenta padrão de *M. tuberculosis*, H37RvATCC 27294. Para o fármaco dirigido de amicacina com DSM, utilizaram-se cepas de *M. tuberculosis*, H37RvATCC 27294, *M. avium* e *M. kansasii*. Além da amicacina base, foi também utilizada rifampicina como controle.

4.2.7.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação biológica preliminar - determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - foi realizada por meio da técnica de microdiluição em placas, utilizando *Alamar Blue* como revelador (SATO, 1998).

A microplaca estéril de 96 orifícios é preparada de modo a receber 100 µL de suspensão de micobactérias, obtida a partir de crescimento em meio 7H9 por 10 dias em estufa a 37 °C, e cuja turvação foi comparada à escala McFarland nº.1. A seguir, a suspensão é diluída a 1:25, obtendo-se volume final de 200 µL em cada orifício, com as concentrações finais dos fármacos dirigidos de estreptomicina e amicacina com os derivados de manana e os devidos controles (succinilmanana, carboximetilmanana, estreptomicina, amicacina base e rifampicina) de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312 e 0,0156 µg/mL.

Homogeneizaram-se todos os orifícios para, em seguida, selar as placas com Parafilm e incubá-las a 37 °C. Após cinco dias de incubação adicionaram-se 25 µL de mistura recentemente preparada na proporção de 1:1 de *Alamar Blue* e solução de Tween 80 a 10% a um dos orifícios da coluna 10 (positivo). As placas foram reincubadas a 37 °C, por 24 horas. Caso a preparação contida neste orifício se torne rósea, a mistura de *Alamar Blue* e Tween 80 é adicionada aos demais orifícios e novamente incubada por 24 horas a 37 °C.

A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de coloração rósea, como presença de crescimento bacteriano. As placas que apresentaram orifícios violeta foram reincubadas por mais 24 horas e, havendo mudança para róseo, interpretou-se como crescimento bacteriano. Caso persista a cor inicial, assume-se que não houve crescimento. A CIM é, então, definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor azul para rósea.

4.2.8. Avaliação Biológica Preliminar II - Determinação da atividade intracelular dos compostos sintetizados

Neste trabalho, utilizou-se a técnica da luciferase, proteína presente nos vaga-lumes, e responsável pela emissão de luz (Firefly luciferase-luciferin) (JACOBS *et al.*, 1993; COOKSEY *et al.*, 1993).

4.2.8.1. Meios de cultura e reagentes

- Meios de cultura Middlebrook 7H10, RPMI 1640, ágar 7H10
- Microplacas estéreis
- Solução tamponada de Hank
- Triton 0,1%
- n-decanal
- álcool metílico

4.2.8.2. Amostras

A cepa padrão recombinante de *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1 foi utilizada para padronizar a técnica da determinação da atividade biológica intracelular dos compostos. Para tal, as células de macrófagos da linhagem J774 foram infectadas com a micobactéria anteriormente mencionada. A cultura bacilar foi mantida em meio de Middlebrook 7H10 contendo 50 µg/mL de higromicina até o momento do uso.

4.2.8.3. Culturas de células

A linhagem J774 (macrófagos murinos) foi utilizada para cultura celular. As células J774 foram mantidas a 37 °C, com 5% de CO₂, em garrafas com superfície em torno de 12,5 cm², contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino.

4.2.8.4. Padronização da técnica da luciferase para determinação da atividade intracelular

A padronização da determinação da atividade intracelular dos compostos sintetizados, empregando o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1, foi realizada segundo a técnica proposta por SNEWIN *et al.* (1999). Para aferição das leituras de URL (Unidades Relativas de Luz), os resultados foram, também, avaliados pelo cultivo e determinação de UFC (Unidades Formadoras de Colônias)

Para a preparação da monocamada de macrófago J774 e sua infecção com *M. tuberculosis* contendo o plasmídeo pSMT1, depositaram-se, inicialmente, em cada orifício de uma microplaca estéril, transparente, contendo 24 orifícios, 1000 µL de meio de cultura RPMI. Estes foram semeados com a suspensão de células J774 e a placa incubada a 37 °C com 5% de CO₂, por 48 horas, de maneira a se obter a concentração de 5 x 10⁵ células/mL. A seguir, o meio de cultura RPMI foi retirado e o tapete de células foi lavado com solução tamponada de Hank. Adicionaram-se, então, em todos os orifícios, 1000 µL da suspensão de micobactérias preparada em meio RPMI 1640, de maneira a se obter 1 a 5 micobactérias/célula, e incubou-se a 37 °C com 5% de CO₂ por 2 horas para haver a infecção dos macrófagos. Após este tempo, a suspensão de micobactérias foi retirada e o tapete de células lavado com solução tamponada de Hank para eliminar as micobactérias extracelulares. O número de micobactérias que infectaram as células foi determinado pela lise de 2 orifícios contendo o tapete de

células, com 1000 μL da solução aquosa de Triton a 0,1%. A 180 μL desta suspensão proveniente da lise das células, adicionaram-se 20 μL de *n*-decanal a 1% em metanol e realizada leitura da luminescência no luminômetro SPECTRAfluorPlus. Ao mesmo tempo foi realizado o plaqueamento desta suspensão em placas contendo meio Middlebrook 7H10, dividida em 4 quadrantes, de maneira a se semear 100 μL da suspensão pura e das diluições: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 , por 28 dias, para se realizar a contagem das unidades formadoras de colônias/mL.

Em seguida, em todas as monocamadas infectadas, com exceção de duas, foram adicionados 1000 μL de cada diluição dos compostos, em duplicata em três orifícios da microplaca, respectivamente (**figura a seguir**). As microplacas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO_2 , por 3, 4 e 7 dias, quando se realizou novamente a lavagem do tapete de células com solução tamponada de Hank e as células infectadas submetidas à lise. Células de todos os orifícios (com ou sem as diluições dos compostos) foram lisadas com 1000 μL da solução aquosa de Triton a 0,1%. A 180 μL desta suspensão proveniente da lise das células foram adicionados 20 μL de *n*-decanal a 1% em metanol e realizada leitura da luminescência, sendo os resultados expressos em URL. Diluições decimais seriadas do lisado foram, então, semeadas em ágar 7H10, para determinação subsequente do número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). A contagem de bactérias viáveis foi realizada para a validação das leituras em URL.

Vários ensaios preliminares foram realizados para definir diferentes parâmetros como, quantidade de inóculo, tempo de incubação das placas, tempo de leitura no aparelho e outras medidas de calibração.

ESQUEMA 2 – Configuração esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade inibitória intracelular.

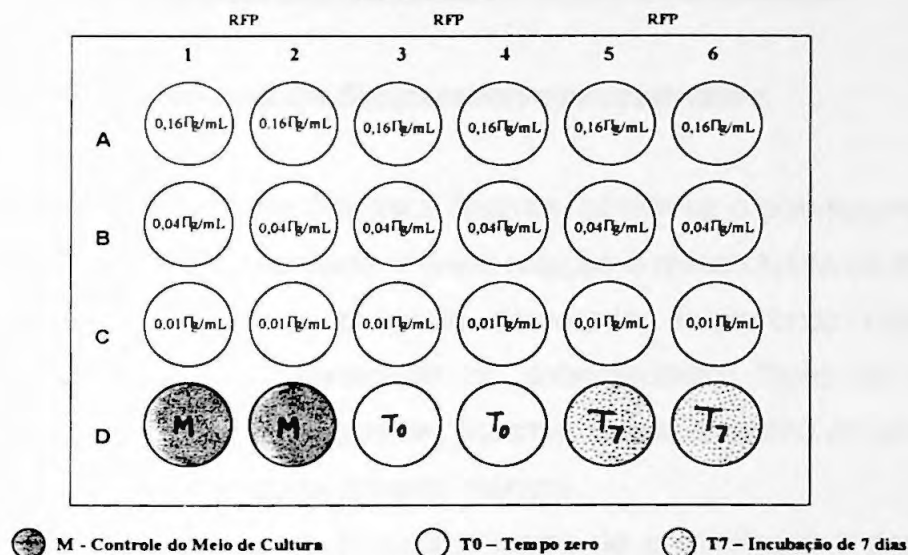


Figura 15 - Configuração esquemática do preparo da microplaca para determinação da inibição de crescimento micobacteriano intracelular

4.2.8.5. Determinação da porcentagem de inibição de crescimento bacteriano em macrófagos

A porcentagem de Inibição de Crescimento Bacteriano foi determinada aplicando a fórmula abaixo, considerando **a** igual à média da leitura em URL (Unidade Relativa de Luz) dos orifícios controle positivo (orifícios sem os compostos) e **b** o resultado em URL de cada orifício com a respectiva diluição do composto.

$$100 - \left(\frac{\mathbf{b} \times 100}{\mathbf{a}} \right) = \% \text{ de Inibição de Crescimento Bacteriano}$$

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos transportadores seletivos para macrófagos

5.1.1. Extração da manana de *Saccharomyces cerevisiae*

Ao se proceder segundo a técnica descrita, obtém-se o polissacarídeo com baixo rendimento (aproximadamente 4% em relação à massa bruta de lêvedo de cerveja utilizado). Trata-se de processo demorado, requerendo cuidado ao centrifugar o produto e na separação do sobrenadante. Deve ser utilizada centrífuga com capacidade para grandes volumes, caso contrário as perdas e o tempo requerido serão consideravelmente maiores.

Foi observado que, se na penúltima etapa de precipitação o produto for ressuspenso e concentrado por, no mínimo, mais duas vezes, obtém-se manana com maior grau de pureza. Talvez, após as etapas de purificação, a única impureza que não é possível remover seja glicose. Porém, esta se encontra em quantidade insignificante (PEAT, WHELAN, EDWARDS, 1961).

Sabendo-se que o polissacarídeo puro não reage com iodo iodetado, como o amido (PEAT, WHELAN, EDWARDS, 1961), pode-se fazer avaliação qualitativa da pureza. Assim sendo, observa-se que, após o processo descrito, a manana produzirá cor marrom em contato com a solução de iodo iodetado, enquanto que produtos menos purificados reagirão de forma análoga ao amido, produzindo cor preta azulada.

A obtenção de manana de *S. cerevisiae* pode ser comprovada através de espectro característico de RMN ^1H (item 6.1, **ESPECTRO 1**) (GORIN, SPENCER, 1970).

Com o objetivo de se confirmar a massa molecular do polissacarídeo, foram iniciados experimentos de espalhamento de luz. Os mesmos, porém, não tiveram êxito devido à falta de informações necessárias para se efetuarem os cálculos. Outras técnicas, como viscosimetria, são viáveis, porém, requerem padronização

dispendiosa e demorada. A massa molecular do polímero é de grande importância, uma vez que influi na solubilidade do complexo, o que irá, por sua vez, afetar diretamente o transporte dos fármacos dirigidos ao local de ação.

5.1.2. Preparação do derivado succinilado de manana (DSM)

Ao se modificar a técnica original, liofilizando o produto, evitou-se perda do mesmo. O **espectro 2** (RMN ^1H) corresponde à succinoilação do polímero, mesmo não sendo possível, devido à má resolução do espectro, visualizar com precisão os sinais referentes a cada hidrogênio. Porém, os sinais em 2,52 ppm e 2,58 ppm referem-se aos hidrogênios dos grupamentos metilênicos do espaçante succinil. O **espectro 3** (IV) mostra forte absorção, com banda intensa em 1732 cm^{-1} , característica do estiramento carbonila de ésteres.

A determinação de carboxilas livres por titulação ácido/base mostrou substituição média (para todas as sínteses realizadas) de 3,3 mmol COOH/g de produto.

5.1.3. Preparação do derivado carboximetilado de manana (DCM)

Modificando-se a técnica original, liofilizando o produto, evitou-se perda do mesmo. O **espectro 4** de RMN ^1H mostra a carboximetilação do polímero, conforme indica um singlete em 3,86 ppm, referente ao grupo metilênico ligado ao oxigênio e à carboxila.

Sinais sobrepostos em 3,62-3,74 ppm e 3,92-4,09 ppm são referentes aos hidrogênios carbinólicos do polissacarídeo. Outros sinais, como multiplete em 3,48-3,55 ppm e tripleto em 1,03-1,07 ppm, não correspondem a grupamento presente no produto, indicando a presença de DSS (dioctilsulfossuccinato de sódio) na água deuterada. A substituição média foi de 1,2 mmol COOH/g de produto.

Deve-se tomar o cuidado de, após dialisar, levar o pH (normalmente igual a 5 após diálise) a 3, para que se tenham grupamentos carboxila ao invés de carboxilato.

PARTE I

***5.1.4. Obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e
DSM***

5.1.4.1. Síntese de fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM e DSM

Para a obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina, foram realizados diversos experimentos, variando-se os diversos parâmetros, como tempo, solvente e pré-tratamento da manana. A tabela a seguir resume as diversas condições para obtenção de melhor rendimento e grau de substituição da estreptomicina nos polímeros derivatizados, bem como algumas características dos produtos.

TABELA II – Condições reacionais empregadas na síntese dos fármacos dirigidos de estreptomicina com DSM e DCM e características dos produtos

Parâmetro Experim.	SM (g)	POL. (g)	SOLV.	DCC (g)	CATAL. (g)	TEMPO (h)	pH	PRÉ T	GS (mmol/g)	REND. (mg)
I.1	0,5	0,5 S	H ₂ O/ DMF	0,45	-	24	4,0	-	0,5	100
I.2	0,25	0,25 S	DMF	0,45	DMAP	24	5,0- 6,0	-	NS	10
I.3	0,25	0,25 S	MeOH/ DMF	0,45	DMAP	24	5,0	piridina	NS	12
I.4	0,25	0,25 C	DMF/THF/ H ₂ O	0,45	-	24	5,0	-	NS	NS
I.4'	0,25	0,25 C	H ₂ O	0,45	-	48	5,0	-	NS	4
I.5	0,25	0,25 C	H ₂ O/ DMF	0,5	DMAP	48	5,0	-	NS	NS
I.6	0,75	0,5 S	H ₂ O/ DMF	2,7	-	48	5,0	LiCl 1%	NS	NS
I.7	1,16	0,5 S	H ₂ O/ DMF	0,45	-	24	5,0	-	0,5	60
I.8	0,5	0,75 C	H ₂ O/ DMF	0,45	-	36	5,0	-	0,6	70
I.9	0,6	0,6 S	H ₂ O/ DMF	1,0	-	24	5,0	-	ND	42
I.10	1,17	0,6 C	H ₂ O/ DMF	1,0	-	48	5,0	-	ND	NS
I.11	0,47	1,0 C	H ₂ O/ DMF	1,0	-	72	6,0	-	0,6	270
I.12	0,6	0,6 S	H ₂ O/ DMF	1,0	-	72	6,0	-	0,6	150

SM = estreptomicina

POL. = polímero derivatizado (S = DSM; C = DCM)

DCC = dicicloexilcarbodiimida

CATAL. = catalisador

PRÉ T = pré-tratamento do polímero derivatizado

GS = grau de substituição

NS = não-suficiente para a determinação

ND = não-determinado

- = ausente

A proporção molar de estreptomicina empregada nas reações foi calculada de acordo com o número de carboxilas livres da manana derivatizada e utilizada com excesso de 30% em alguns experimentos. A quantidade de DCC foi variada, visando otimizar o rendimento, uma vez que o uso deste reagente em fase aquosa não fornece resultados satisfatórios. Porém, ao se fixar a quantidade de 1,0 g (5 mmol) de DCC, observou-se que a ordem e o intervalo de tempo na adição dos reagentes são absolutamente fundamentais para o sucesso da reação.

A adição de DCC deve ser feita após solubilização completa do derivado de manana e 30 minutos antes da adição de estreptomicina. Cabe ressaltar que o aumento do rendimento observado após tempo de ativação de carboxilas maior do que 30 minutos é desprezível.

As etapas de filtração e lavagem também são bastante importantes, uma vez que o produto final é solúvel em água, mas fica impregnado com dicicloexiluréia (DCU – subproduto de DCC), requerendo muitas lavagens seguidas. Para garantir a retirada total da DCU, na última filtração utiliza-se terra diatomácea. Mesmo assim, não se conseguiram rendimentos maiores que 270 mg de produto final.

Dessa maneira, pode-se inferir da tabela II que os experimentos I.11 e I.12 foram os que apresentaram melhores resultados, sendo, portanto, considerados os métodos de escolha para síntese dos fármacos dirigidos de estreptomicina e descritos nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2.

Foi realizada identificação presuntiva de todos os produtos por CCD, utilizando-se ninhidrina como revelador de grupamentos amínicos livres, indicativos da presença dos aminoglicosídeos. A funcionalização da manana provavelmente ocorre nas posições 3 e 4 das unidades manosídicas, por serem estas mais desimpedidas. A ligação da estreptomicina ao polímero funcionalizado ocorre, provavelmente, no grupamento guanidínico mais desimpedido estericamente da molécula e por ser também bastante reativo devido ao caráter fortemente básico (pka 13,6).

A caracterização estrutural no infravermelho mostra absorções características que indicam ligação do fármaco com os polímeros derivatizados - presença de éster ($\nu\text{C}=\text{O}$, 1729 cm^{-1}) e amida ($\nu\text{C}=\text{O}$, 1654 e $\delta\text{NH} \sim 1540\text{ cm}^{-1}$). As bandas referentes às hidroxilas dos carboidratos e ao estiramento NH de amida secundária estão sobrepostas na região de $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Observam-se, também, bandas remanescentes, referentes aos grupos espaçantes livres, indicando que não ocorreu substituição total nos polissacarídeos (FIGURA 14). A análise do produto final por RMN de ^1H e ^{13}C (esta última somente para o fármaco dirigido com derivado succinilado de manana) foi dificultada por se tratar de dois compostos de estruturas complexas. Porém, é possível visualizar sinais referentes aos polímeros derivatizados e à estreptomicina, alguns deles sobrepostos. Melhor resolução poderia, provavelmente, ter sido obtida em aparelho operando a 500 MHz , mais indicado para análise de polímeros.

Quanto ao acoplamento de estreptomicina, não foram observadas diferenças significativas nos resultados, em relação aos derivados utilizados. Em outras palavras, o DCM, mesmo sendo menos substituído que o DSM, mostrou acoplamento de estreptomicina praticamente igual (média de $5,9\%$ de nitrogênio), em tempo de reação duas vezes maior ($24 \times 48\text{ h}$). Após cálculo da massa de fármaco incorporada por meio da análise elementar, obteve-se média de $0,6\text{ mmol}$ de estreptomicina/g do produto, para ambos os derivados. Tais resultados, surpreendentemente, sugerem a reprodutibilidade do método, uma vez que a média de $5,9\%$ para o nitrogênio apresentou variações desprezíveis em 6 experimentos realizados para cada um dos derivados de manana.

A FIGURA 14 mostra as alterações no espectro no infravermelho, decorrentes das ligações na manana e seus respectivos derivados, ou seja, observam-se bandas na região de $1640\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$, indicando que houve formação de ligação amida. Cabe ressaltar que tais bandas têm padrão diferente do observado naquelas decorrentes da absorção dos fármacos não ligados.

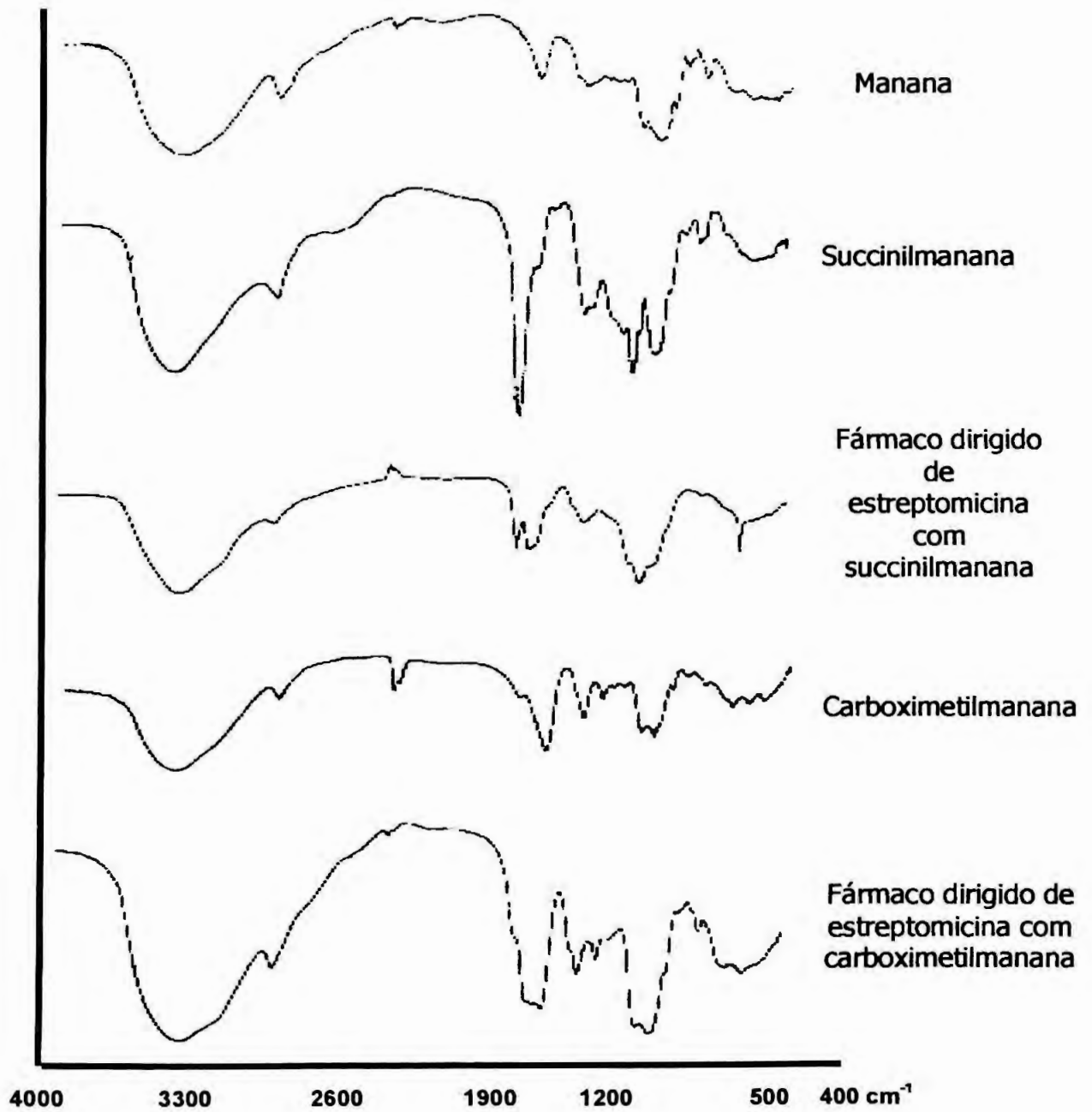


Figura 16 – Esquema comparativo dos espectros obtidos dos diversos produtos.

PARTE II***5.1.5. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina com DCM e DSM***
ROTA 1**5.1.5.1. Síntese de fármacos dirigidos de amicacina com DCM e DSM**

Com este objetivo, foram realizados diversos experimentos, variando-se os parâmetros envolvidos. A TABELA III resume as diversas condições para obtenção de melhor rendimento e grau de substituição da amicacina nos polímeros derivatizados, bem como algumas características dos produtos.

Primeiramente, tentou-se utilizar a metodologia descrita para os fármacos dirigidos de estreptomicina. Porém, foi observado que a amicacina não se comporta da mesma maneira que a estreptomicina, apesar de possuir um grupamento amínico bastante disponível, sem estabilização por ressonância.

A amicacina base livre foi utilizada a partir do experimento II.9, sem, no entanto, apresentar resultados positivos, como pode ser observado na TABELA III. Resultado satisfatório (metodologia descrita no item 4.2.4.1) somente foi obtido quando se substituiu o agente condensante, DCC, por EDC. Tal reagente não foi empregado anteriormente por falta de disponibilidade, pois seria o mais indicado para as reações em meio aquoso. Porém, antes de se empregar o EDC, foi desenvolvida rota sintética alternativa para obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina.

TABELA III – Condições reacionais empregadas na síntese dos fármacos dirigidos de amicacina com DSM e DCM

Parâmetro Experim.	AM (g)	POL. (g)	SOLV.	COND. (g)	CATAL. (g)	TEMPO (h)	pH	GS (mmol/g)	REND. (mg)
II.1	0,75	0,5 S	H ₂ O/ THF 2:1	DCC 0,75	-	20	5,0	-	-
II.2	0,75	0,5 C	H ₂ O/ THF 2:1	DCC 0,75	-	48	5,0	-	-
II.3	1,17	0,5 S	H ₂ O/ DMF2:1	DCC 0,45	-	36	4,0	-	-
II.4	0,35	0,5 C	H ₂ O/ DMF2:1	DCC 0,45	-	36	4,0	-	-
II.5	0,24	0,103 S	H ₂ O/ THF 8:2	DCC 0,084	-	8	4,0	-	-
II.6	0,20	0,106 C	DMF/ H ₂ O 9:1	DCC 0,025	DMAP 0,01	48	4,0	-	-
II.7	0,24	0,100 S	DMF	DCC 0,1	DMAP 0,05	24	4,0	-	-
II.8	1,02	0,5 S	H ₂ O/ THF9:1	DCC 0,62	DMAP 0,06	24	7,0	-	-
II.9	0,40*	0,25 S	H ₂ O/ DMF	DCC 0,75	-	72	7,0	-	-
II.10	0,23*	0,25 C	H ₂ O/ DMF	DCC 0,75	-	168	7,0	-	-
II.11	0,52*	0,25 S	H ₂ O	EDC 0,19	-	60	7,0	0,39	200
II.12	0,52*	0,25 C	H ₂ O	EDC 0,19	-	120	7,0	-	NS

AM = amicacina; *base livre

POL. = polímero derivatizado (S = DSM; C = DCM)

COND. = condensante; DCC = dicicloexilcarbodiimida; EDC = 1-etil-3(3-diaminopropil)carbodiimida

CATAL. = catalisador

PRÉ T = pré-tratamento do polímero derivatizado

GS = grau de substituição

NS = não-suficiente para a determinação

ND = não-determinado

Também, contrariando a metodologia utilizada para estreptomicina, o derivado carboximetilado de manana não reagiu com a amicacina nem se utilizando EDC por tempo prolongado. Tal fato pode ter ocorrido devido a impedimento estérico, uma vez que as cadeias do espaçante carboximetil são mais curtas que as do succinil.

A etapa de isolamento do produto é, também, diferente daquela descrita para os fármacos dirigidos de estreptomicina, consistindo no aproveitamento da fase sólida após filtração e lavagem da mesma com etanol.

O produto foi submetido à CCD, visualizando-se mancha roxa característica de grupo amínico livre, presente na amicacina. O espectro no infravermelho mostra sinais claros da presença de éster ($\nu\text{C}=\text{O}$, 1729 cm^{-1}) e amida ($\nu\text{C}=\text{O}$, 1655 cm^{-1}) e δNH ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) (**ESPECTRO 12**). O espectro por RMN ^1H (**ESPECTRO 11**) foi obtido com baixa resolução, levando à necessidade de se proceder a diversas análises, uma vez que este produto não é totalmente solúvel e acarreta ruído no espectro. Após filtrar a amostra em algodão, é possível identificar alguns sinais característicos da amicacina e do derivado de manana. Porém, estão presentes sinais na faixa de 2,29 ppm a 2,54 ppm, que não pertencem nem ao derivado de manana e nem ao fármaco, podendo ser atribuídos a alguma impureza, apesar da diálise. Não foi possível obter espectro de RMN ^{13}C , devido à característica gelatinosa da amostra.

O acoplamento do fármaco ao derivado succinoilado de manana também se deu em proporção bem menor àquela observada para a estreptomicina (2,72% de nitrogênio, constituindo 0,39 mmol de amicacina/g do produto).

5.1.6. Obtenção dos fármacos dirigidos de amicacina com DSM

ROTA 2

Esta rota alternativa foi desenvolvida antes de se obterem os fármacos dirigidos utilizando EDC, devido às dificuldades inerentes à rota 1.

5.1.6.1. Preparação da succinamida de amicacina

Este experimento não ofereceu grandes dificuldades, salvo na retirada do solvente, que requereu aparelhagem de alto vácuo e controle rigoroso da temperatura para evitar degradação do intermediário. Ainda assim, é possível que grande parte do composto formado tenha se degradado. Tentativas de mudança do solvente na síntese foram feitas sem sucesso. Alíquotas foram retiradas a cada 30 minutos para análise por CCD, fixando-se o tempo de reação em 2 horas. O rendimento obtido também foi bastante baixo (30 mg). A formação do produto pode ser confirmada pela observação de bandas em 1716, 1652 e 1539 cm^{-1} (**ESPECTRO 13**), referentes, respectivamente, a estiramentos carbonila de ácido carboxílico e amida, e deformação NH (amida II). Pode-se afirmar que a reação ocorreu completamente, uma vez que não se observaram absorções em $\sim 1860 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1780 \text{ cm}^{-1}$, características do estiramento carbonila de anidridos. A banda de amida observada não é referente à amicacina sozinha, pois esta absorção é bastante característica em 1638 cm^{-1} (MONTELEONE *et al.*, 1983), e, provavelmente, se encontra superposta.

5.1.6.2. Acoplamento da succinamida de amicacina à manana

Devido à pequena quantidade de succinamida disponível, obteve-se, também, pouco produto, somente suficiente para análise. Se se partir de quantidades maiores, é possível obter este produto com bons rendimentos. Pode-se observar, no **espectro 14**, padrão muito semelhante ao produto formado pela rota 1 (**ESPECTRO 12**), com absorções em 1730 cm^{-1} (estiramento carbonila de éster succínico), 1643 e 1563 cm^{-1} (amida I e II).

5.1.7. Determinação das faixas de decomposição

A TABELA IV mostra os resultados da determinação das faixas de decomposição dos produtos obtidos e dos respectivos materiais de partida.

TABELA IV – Faixas de decomposição dos derivados obtidos

<i>Composto</i>	<i>Decomposição (°C)</i>
estreptomicina.H ₂ SO ₄	200-205
amicacina base livre	220-230
DCM	199-202
DSM	199-204
manana	200-202
FD-SM-DSM*	166-169
FD-SM-DCM**	163-169
FD-AM-DSM***	166-172

*Fármaco dirigido de estreptomicina com derivado succinilado de manana.

** Fármaco dirigido de estreptomicina com derivado carboximetilado de manana.

*** Fármaco dirigido de amicacina com derivado succinilado de manana.

Analisando essa Tabela, pode-se observar que os produtos finais (fármacos dirigidos) são diferentes dos materiais de partida, uma vez que a faixa de decomposição dos primeiros se mostrou consideravelmente menor.

5.1.8. Avaliação Biológica Preliminar

5.1.8.1. Valores de Concentração inibitória Mínima para os Fármacos Dirigidos de Estreptomicina com DCM e DSM

A TABELA V mostra os resultados da determinação de CIM em culturas de *M. tuberculosis*.

TABELA V - Valores de CIM expressos em $\mu\text{g/mL}$, observados contra cepa H37Rv-ATCC27294 de *M. tuberculosis*

<i>Composto</i>	<i>CIM ($\mu\text{g/mL}$)</i>
estreptomicina (SM)	$\leq 0,125$
FD-DCM-SM	$\leq 0,125^*$
FD-DSM-SM	$\leq 0,125^*$
DCM	> 512
DSM	>512

* Baseado na concentração de fármaco

FD = fármaco dirigido; DCM = derivado carboximetilado de manana; DSM = derivado succinilado de manana.

Quanto à avaliação da concentração inibitória mínima, os resultados sugerem que os produtos obtidos apresentam a mesma atividade da estreptomicina.

5.1.8.2. Valores de Concentração Inibitória Mínima para os Fármacos Dirigidos de Amicacina com DSM

Os resultados da avaliação biológica dos derivados de amicacina encontram-se à TABELA VI.

TABELA VI - Valores de CIM expressos em $\mu\text{g/mL}$, observados contra cepa H37Rv-ATCC27294 de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii**

Compostos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
	H37 Rv		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>	
amicacina base	$\leq 1,0$	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
FD-amicacina-DSM	4,0	4,0	16,0	16,0	16,0	16,0
rifampicina	$\leq 0,01$	0,007	0,03	0,06	0,06	0,06
DSM	>512	>512	>512	>512	>512	>512

*Experimentos realizados em duplicata

Conforme é possível observar pela TABELA VI, a CIM do fármaco dirigido de amicacina com DSM é de quatro a oito vezes maior em relação à da amicacina base livre e da ordem de cem vezes maior em relação à rifampicina controle. A baixa atividade demonstrada pelo composto pode ser devida à baixa substituição no polímero funcionalizado (cerca de duas vezes e meia menor do que a substituição da estreptomicina). Deve ser considerada, também, a menor atividade da amicacina em relação à estreptomicina (inibição *in vitro* de micobactérias com, no mínimo, $8 \mu\text{g/mL}$ versus $0,4 \mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) (LEMOS, 2002).

5.1.8.3. Atividade Intracelular dos Fármacos Dirigidos de Estreptomicina com DCM e DSM

Como mencionado em Material e Métodos, neste trabalho, utilizou-se a técnica da luciferase, proteína presente nos vaga-lumes, e responsável pela emissão de luz (Firefly luciferase-luciferin) (JACOBS *et al.*, 1993; COOKSEY *et al.*, 1993).

A bioluminescência tem sido muito utilizada através de diversas técnicas, para determinar o perfil de sensibilidade de cepas bacterianas, inclusive de *M. tuberculosis*, frente a diversos quimioterápicos.

A introdução do plasmídeo pLUC10 pelo processo de eletroporação permite monitorar a atividade antimicobacteriana dos compostos, pois quando o *M. tuberculosis* contendo o gene da luciferase é colocado em contato com um determinado fármaco, se ele é resistente, sobreviverá e em contato com o substrato, a luciferina, irá gerar luz, que é detectada pelo luminômetro. Esta reação, no entanto é do tipo "flash", ou seja, quando colocamos o substrato a leitura deve ser imediata. Esta técnica reduz o tempo, de semanas para dias, que se levaria para obter os resultados de sensibilidade e é válida quando se deseja realizar avaliação de utilidade de novos agentes antibacterianos. No entanto, esta não pode ser utilizada em qualquer cepa de micobactéria isolada, mas somente em cepas recombinantes (HATFULL, JACOBS, 1994).

A bioluminescência pode ser produzida por vagalumes ou por bactérias vivendo em relação de simbiose com outro microrganismo. SNEWIN *et al.* (1999) utilizaram cepa de *M. tuberculosis* recombinante, no qual o gene codificador da enzima luciferase (*lux*) é proveniente da bactéria *Vibrio harveyi*, de tal forma que um sinal luminescente é gerado em presença do substrato (solução etanólica de *n*-decil aldeído a 1%) e do ATP proveniente do bacilo vivo. Comparando os resultados de luminescência de cepas de *M. tuberculosis* contendo diferentes plasmídeos, os autores concluíram ser o pSMT1 o que se mostrou mais estável e

gerou maior quantidade de luz quando estas micobactérias infectam macrófagos de linhagem.

Contudo, para que um novo composto seja considerado ideal como quimioterápico anti-TB, é importante que seja ativo também para as micobactérias que se encontram no interior dos macrófagos. A metodologia mais comumente utilizada é a da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), que consiste em se realizar a contagem de colônias de micobactérias que se desenvolvem no meio sólido Middlebrook 7H10 após lise dos macrófagos que contêm as micobactérias no seu interior.

Em vista do exposto, utilizou-se a técnica descrita para avaliação da atividade antimicobacteriana intracelular de fármacos dirigidos de estreptomicina com derivados de manana.

A TABELA VII apresenta os resultados, expressos em URL, e validados em UFC/mL, da estreptomicina. As TABELAS VIII e IX mostram os resultados obtidos com os fármacos dirigidos de estreptomicina, empregando-se, respectivamente, DSM e DCM como transportadores.

TABELA VII - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações da estreptomicina

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	RESULTADOS		
	URL	% Inibição	UFC/mL
Controle	1227	-	$0,2 \times 10^6$
SM 0,06	1353	0,0	$0,9 \times 10^6$
SM 0,25	1054	14,1	$0,41 \times 10^6$
SM 1,0	908	25,9	$0,4 \times 10^6$

TABELA VIII - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do fármaco dirigido de estreptomicina com DSM

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	RESULTADOS		
	URL	% Inibição	UFC/mL
Controle	2789	-	$0,2 \times 10^7$
FD-SM-DSM 0,03	2837	0,0	$0,1 \times 10^7$
FD-SM-DSM 0,125	2497	10,5	$0,1 \times 10^7$
FD-SM-DSM 0,5	2160	22,5	$0,9 \times 10^6$

* baseado na quantidade de fármaco

TABELA IX - Resultados de URL e UFC/mL obtidos após exposição das micobactérias internalizadas em macrófagos submetidas a diferentes concentrações do fármaco dirigido de estreptomicina com DCM

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	RESULTADOS		
	URL	% Inibição	UFC/mL
Controle	1674	-	$0,1 \times 10^7$
FD-SM-DCM 0,06	1889	0,0	$0,3 \times 10^7$
FD-SM-DCM 0,25	1512	9,7	$0,5 \times 10^6$
FD-SM-DCM 1,0	1373	18,0	$0,3 \times 10^6$

* baseado na quantidade de fármaco

Observando-se os resultados da TABELA VIII poder-se-ia concluir que os fármacos dirigidos sintetizados não apresentaram atividade intracelular satisfatória. Porém, devem-se considerar os resultados observados para a estreptomicina não latenciada. Tendo em vista que a mesma foi utilizada em concentrações duas vezes maiores (TABELA VII) do que aquelas empregadas com os fármacos

dirigidos de SM com DSM, que, nesses últimos, se conseguiu baixa substituição (0,6 mmol de estreptomicina/g do produto) e que o transportador DSM não apresenta atividade (TABELA V), pode-se inferir que houve relativa atividade inibitória, que poderá ser aumentada com o aumento do grau de substituição do fármaco no polímero. A otimização dos métodos de obtenção dos fármacos dirigidos poderá conduzir a derivados com maior massa molar da estreptomicina do transportador. É importante salientar, no entanto, a necessidade de se determinar, em paralelo, a toxicidade do derivado. Mesmo com atividade menor que o fármaco protótipo, se a toxicidade for significativamente diminuída, uma vez que se trata de fármaco dirigido, o índice quimioterápico será aumentado, o que é de alta relevância em se tratando desse antibiótico.

É, portanto, fundamental a caracterização inequívoca dos produtos, bem como a determinação da massa molecular e carga elétrica dos mesmos, a fim de se avaliar seu potencial de captação pelos macrófagos. Também, é importante determinar a internalização dos polímeros empregados como transportadores, uma vez que o planejamento desses fármacos foi efetuado com base na interação de unidade de manose da manana com os receptores específicos a esse carboidrato, existentes na membrana dos macrófagos. Tal perfil de captação pode ser avaliado por diferentes técnicas, como por exemplo fluorescência, marcação com radioisótopos e métodos imunológicos como o sistema avidina-biotina.

Dependendo do perfil de internalização celular observado com os derivados com maior grau de substituição e com a informação acerca da captação celular do polímero transportador pelo macrófago, poder-se-á concluir se a massa de estreptomicina foi ou não o fator determinante da baixa atividade intracelular observada. Para tanto, faz-se necessária também avaliação do perfil de hidrólise da ligação fármaco-receptor, pois este pode constituir elemento importante na atividade dos compostos.

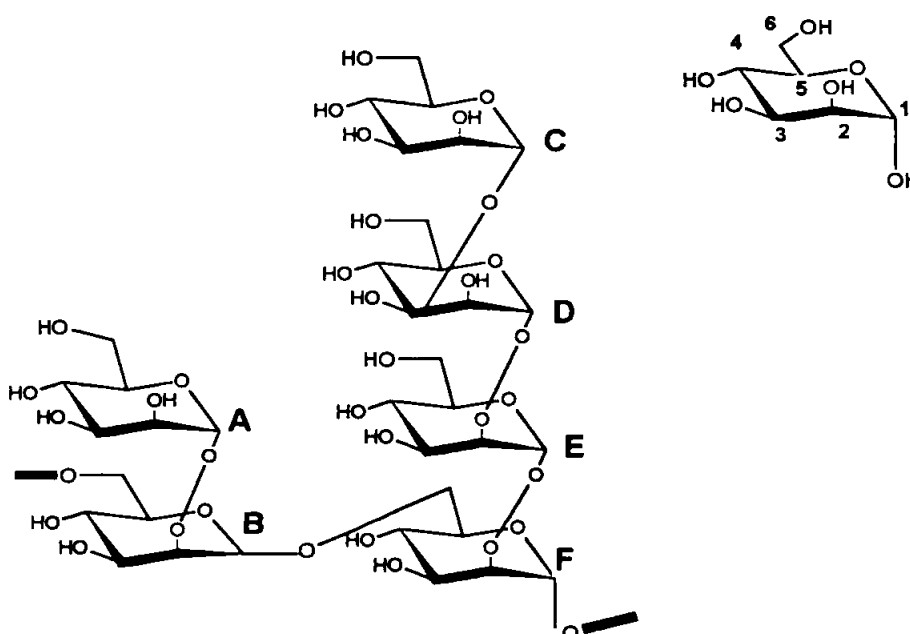
Não foram ensaiados os fármacos dirigidos de amicacina com DSM, uma vez que estes apresentaram CIM insatisfatória (TABELA VI). Embora a amicacina tenha dificuldade de agir intracelularmente, o fato de se ter fármaco dirigido, que conduz

o fármaco internamente, poderá permitir que o antibiótico manifeste essa atividade. Dessa forma, também a otimização da síntese e, conseqüentemente, o aumento do grau de substituição do aminoglicosídeo no polímero, devem ser buscados.

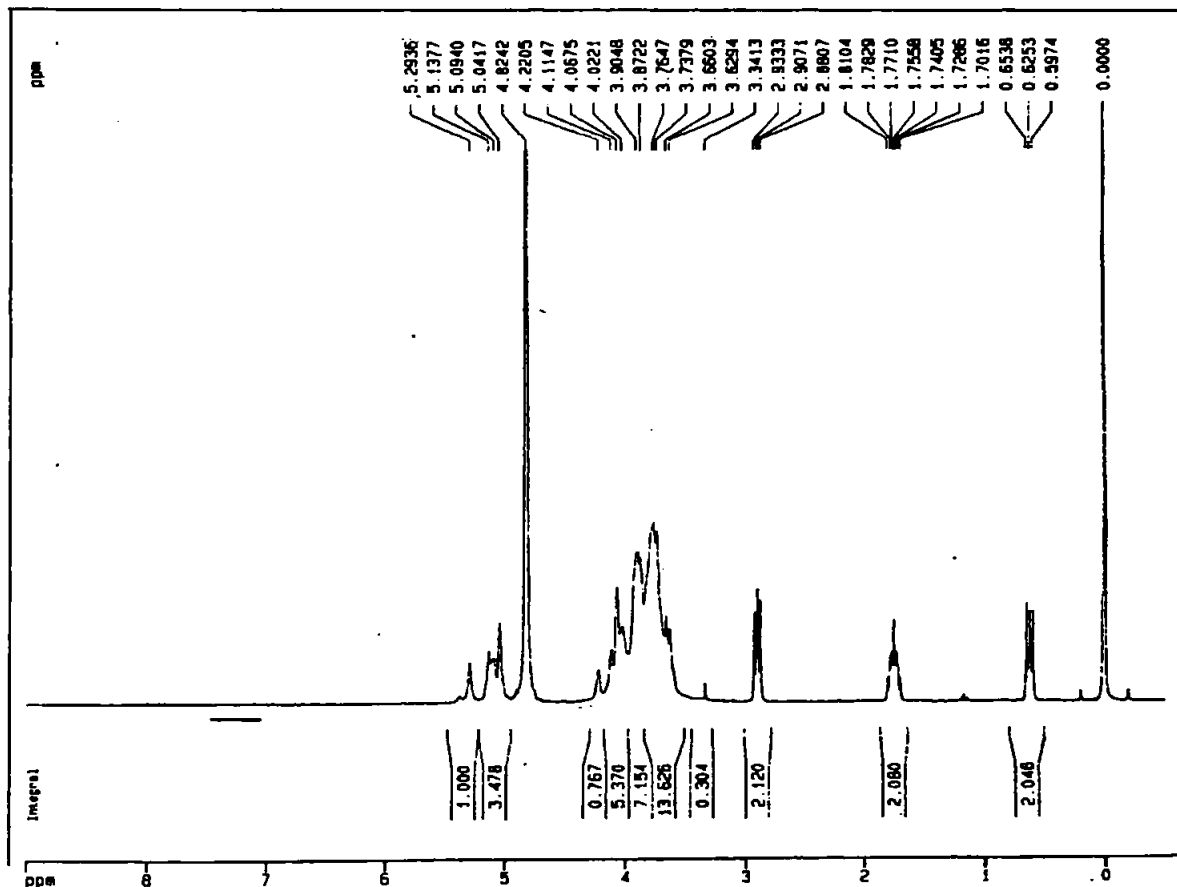
6 – ESPECTROS DOS PRODUTOS OBTIDOS

6.1. Obtenção do polímero derivatizado

6.1.1 Manana extraída de *Saccharomyces cerevisiae*



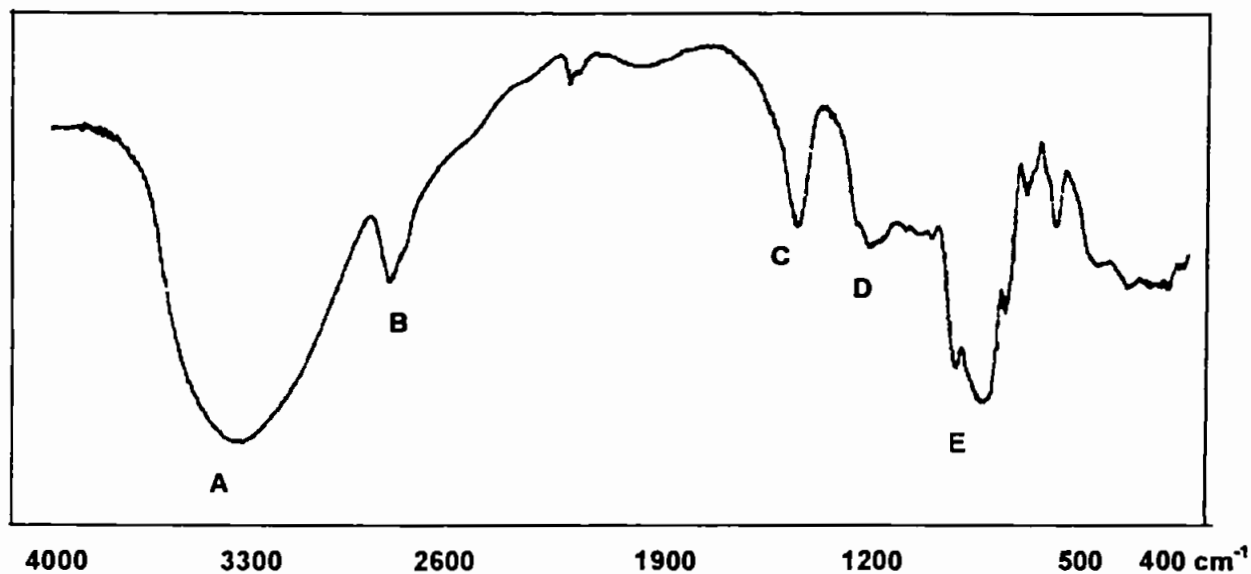
Representação esquemática da estrutura da manana, tendo sua cadeia principal unida por ligações α -1,6 e ramificações α -1,2 e α -1,3. As letras destacadas referem-se aos diversos tipos de hidrogênios na posição 1 dos anéis manosídicos.



ESPECTRO 1 – RMN ^1H da manna extraída de *S. cerevisiae*

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: 3,63-3,87 (m, CH), H5; 3,91-4,02 (m, CH), H4; 4,06-4,22 (m, CH_2), H6; 4,82 (água); 5,04-5,09 (m, CH) prótons D, A, B e F assinalados; 5,13 (próton C); 5,29 (próton E).

Obs: Os sinais em 0,63; 1,7-1,8; 2,9 e 3,34 ppm são devidos a contaminações na água deuterada.



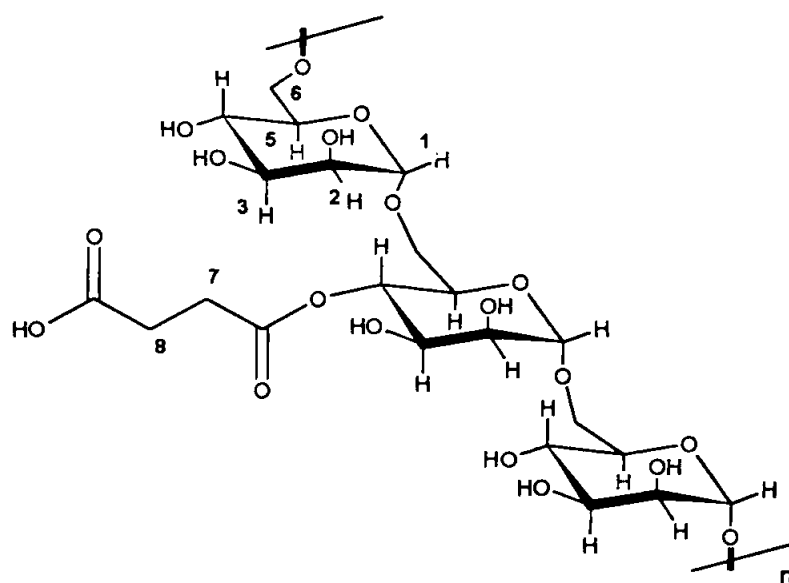
ESPECTRO 2 – Infravermelho em pastilha de KBr da manana extraída de *S. cerevisiae*.

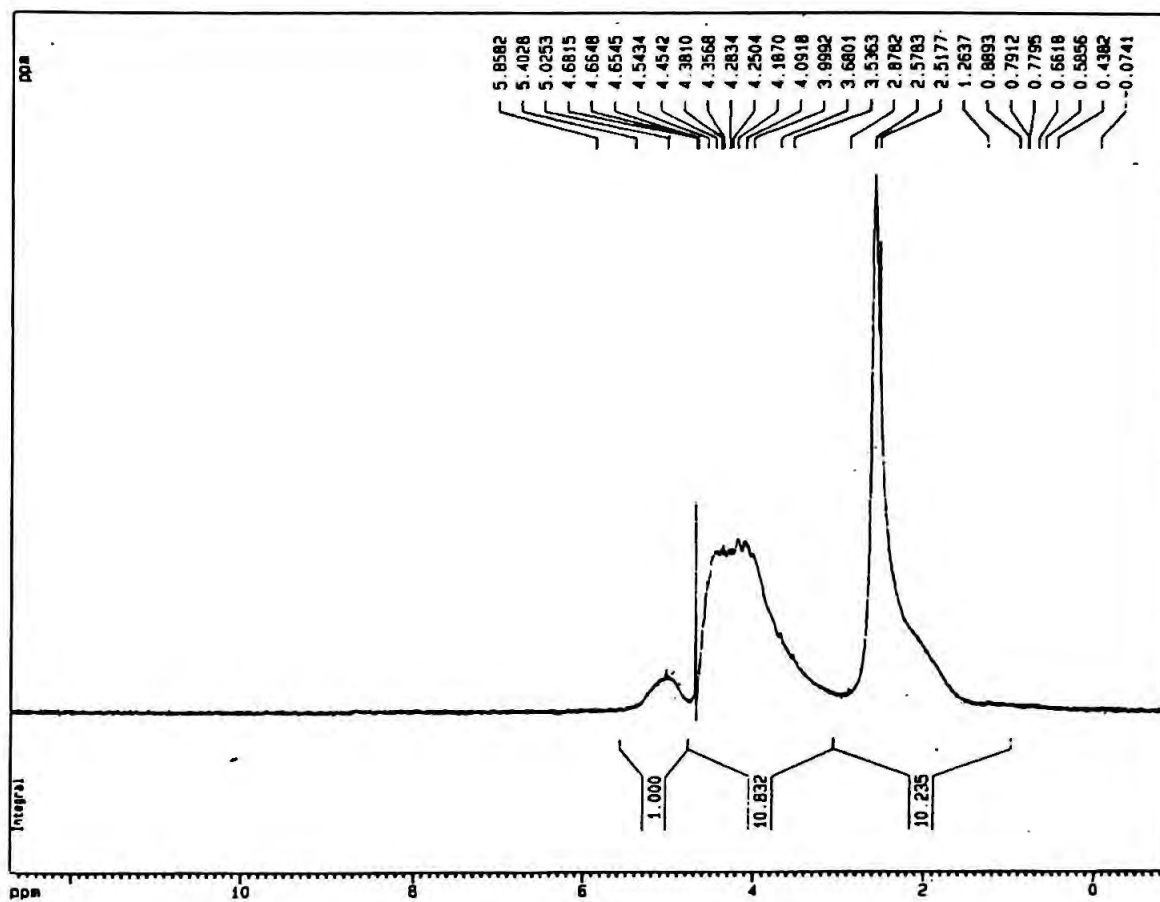
Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3000-3450 (ν OH)
B	2920-2980 (ν CH, CH ₂)
C	1642 (água de hidratação)*
D	~1400 (δ CH)
E	1230-1100-1080 (ν C-O, C-O-C, C-OH)

*SPEDDING, 1960.

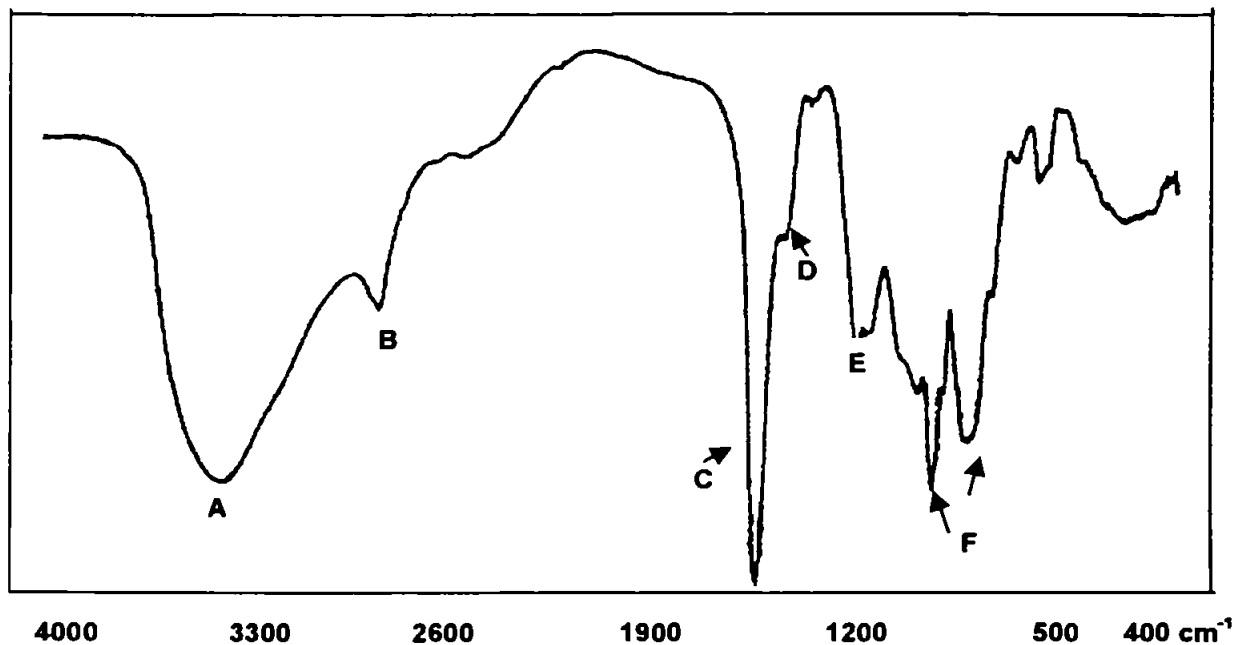
6.1.2. Derivado succinilado de manana (DSM)





ESPECTRO 3 – RMN ^1H do derivado succinilado de manana

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 2,52\text{-}2,58$ (d, H7, H8); $\delta = 3,54\text{-}4,35$ (m, H2-6, 6H); $\delta = 5,025$ (m, H1, 1H).

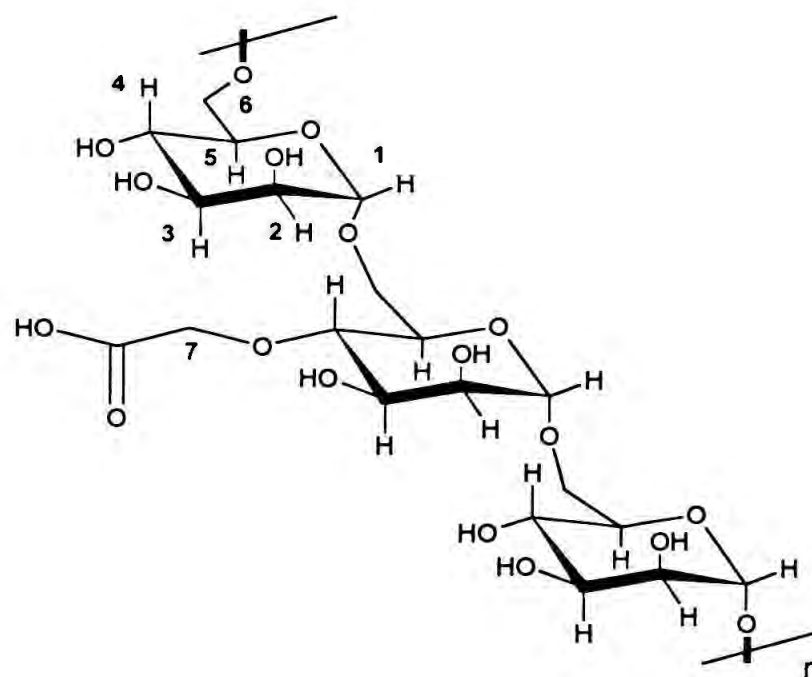


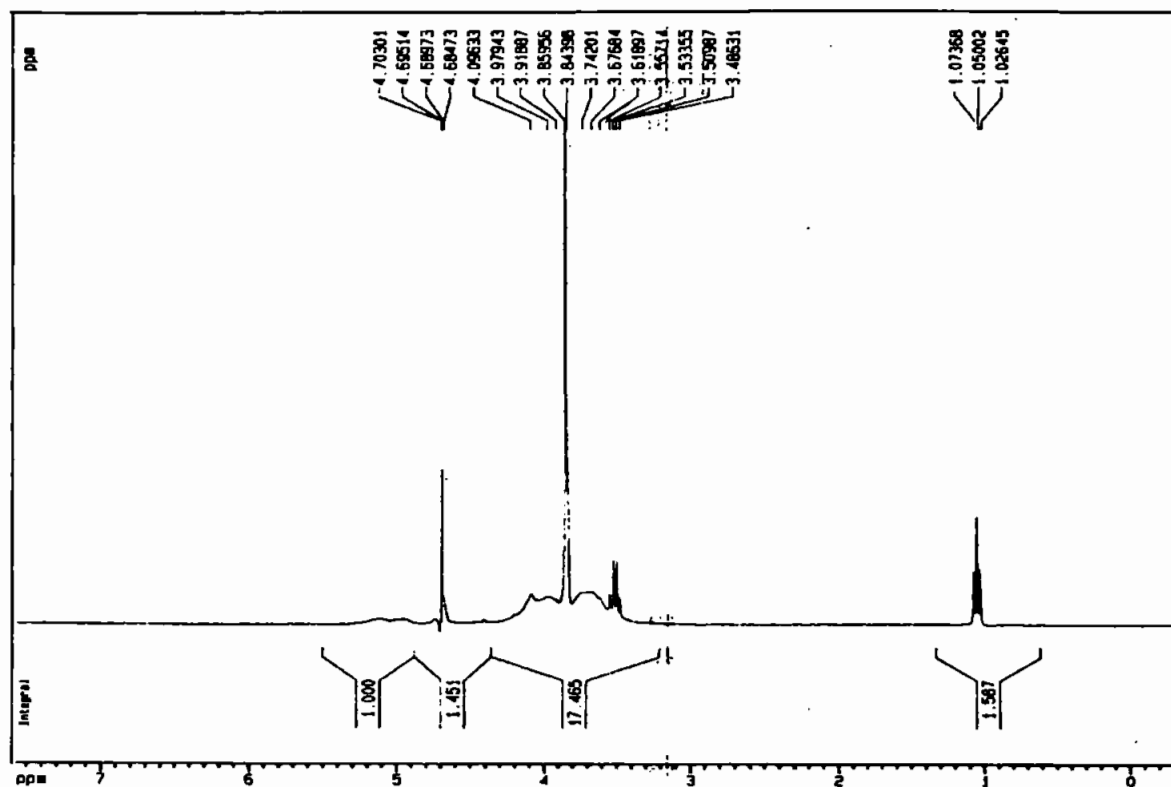
ESPECTRO 4 – Infravermelho em pastilha de KBr do derivado succinoilado de manana

Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3300-3450 (ν OH)
B	2890-2980 (ν CH, CH ₂)
C	1729 (ν C=O, éster)
D	1714 (ν C=O, ácido)
E	1410 (δ CH)
F	1100-1080 (ν C-O, C-O-C, C-OH)

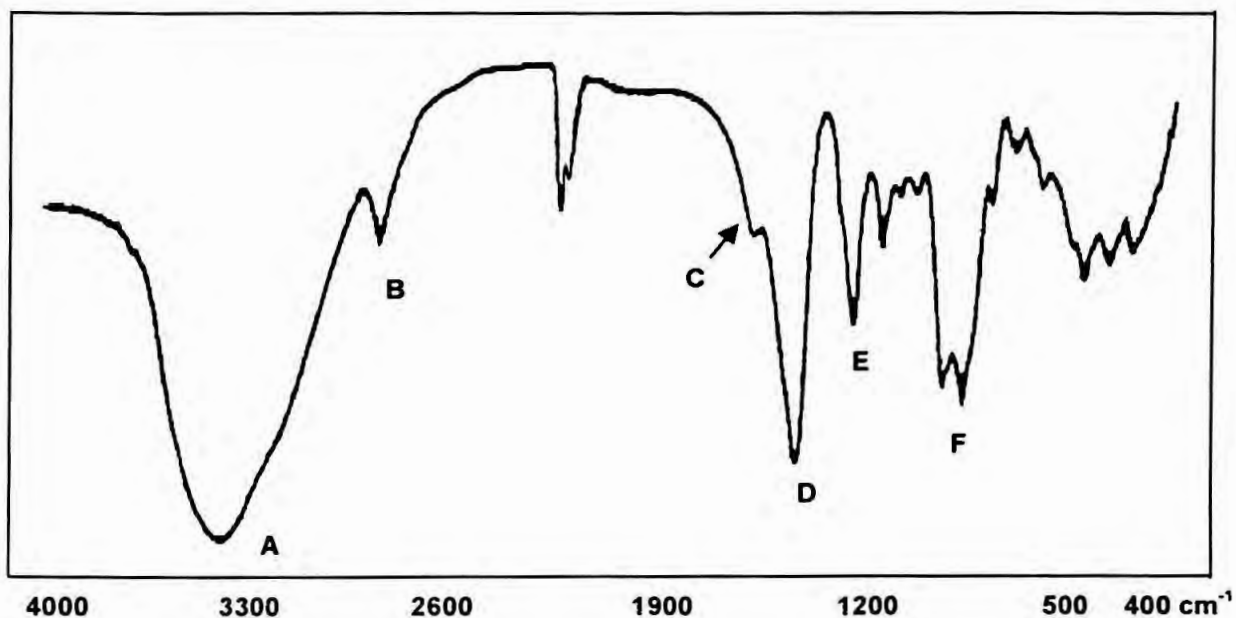
6.1.3. Derivado carboximetilado de manana (DCM)





ESPECTRO 4 – RMN ^1H do derivado carboximetilado de manana

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 3,85$ (s, H7, 2H); $\delta = 3,62\text{-}3,74$ (m, H2,3,4, 1H); $\delta = 3,92\text{-}3,97$ (m, H6, 2H); 4,09 (s, H1, 1H).



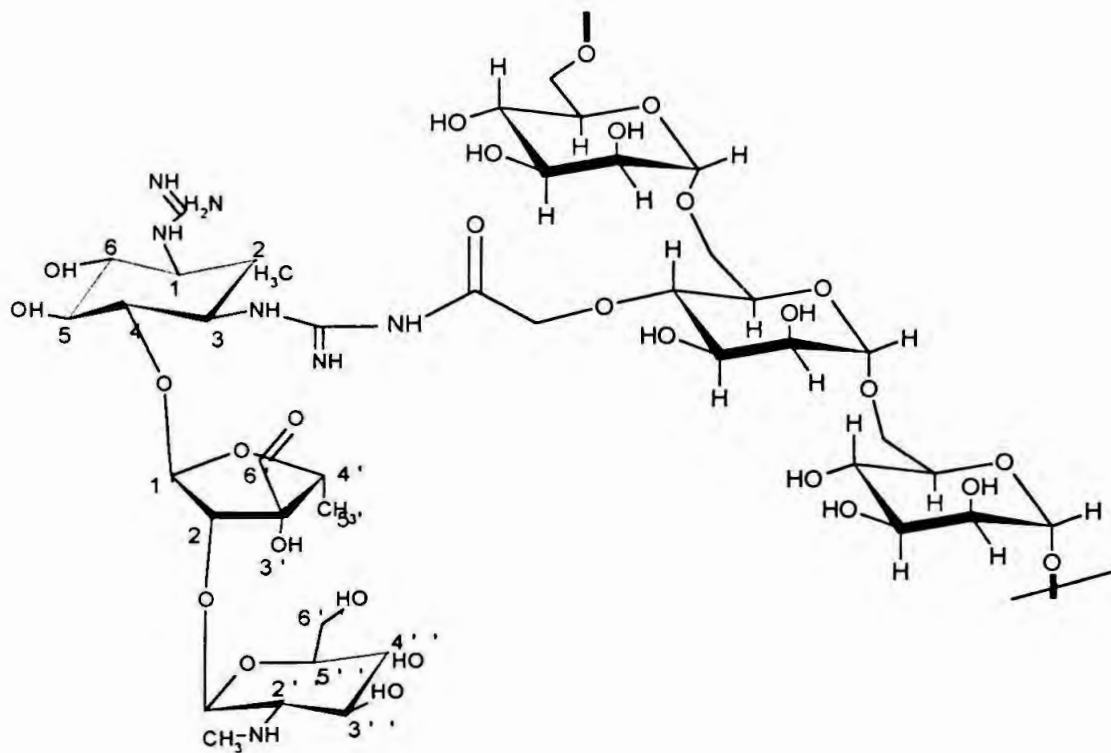
ESPECTRO 6 – Infravermelho em pastilha de KBr do derivado carboximetilado de manana

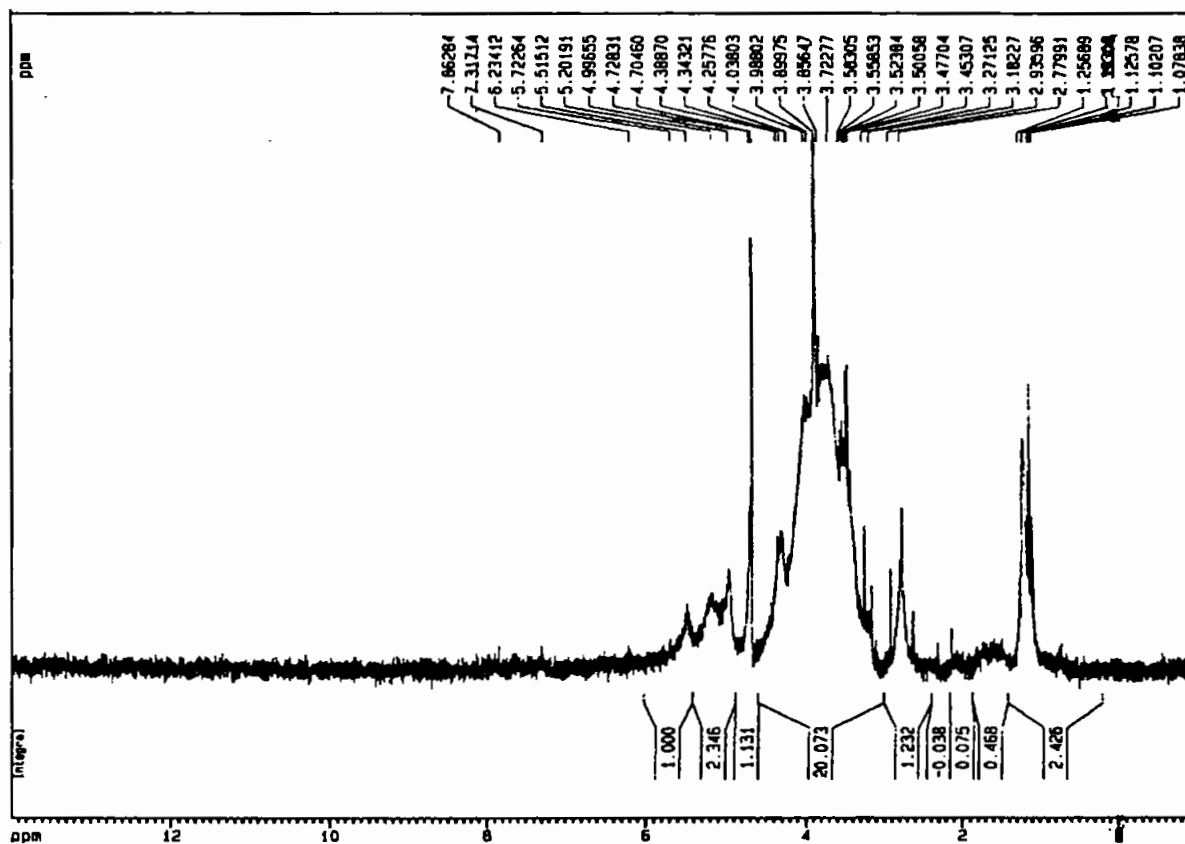
Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3300-3450 (ν OH)
B	2890-2980 (ν CH, CH ₂)
C	1717 (ν C=O, ácido)
D	1689 (ν C=O, carboxilato)
E	1403 (δ CH)
F	1100-1080 (ν C-O, C-O-C, C-OH)

PARTE I – Obtenção dos Fármacos Dirigidos de Estreptomicina com Derivados de Manana

6.2. Fármacos dirigidos de estreptomicina com DCM



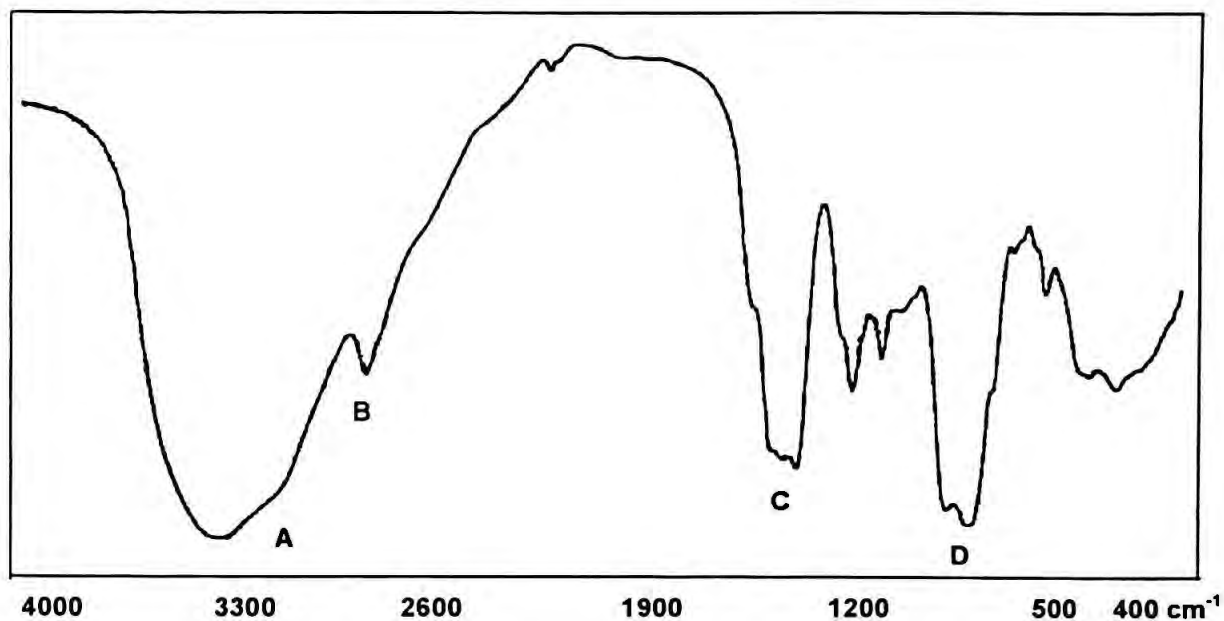


ESPECTRO 7 – RMN ^1H do fármaco dirigido de estreptomicina com DCM

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 1,10$ (s, 3H), (7'') *N*-metilglicosamina; $\delta = 2,77$ (s, 2H), metileno do espaçante carboximetil; $\delta = 2,93$ (s, 3H), (5') *sec*-metila da formil estreptose; $\delta = 3,27$ - $3,98$ (sinal largo, cadeia principal da manana)*; $\delta = 4,73$ (s, 1H), (1') formil estreptose**; $\delta = 5,20$ (s, 2H), (6'') metileno na glicosamina**; $\delta = 5,51$ (s, 1H), NH glicosamina.

* Estes sinais estão sobrepostos aos sinais referentes aos prótons 2'e 4' da formil estreptose

**Sinais sobrepostos aos sinais referentes aos prótons H1 da manana (GORIN & SPENCER, 1970)

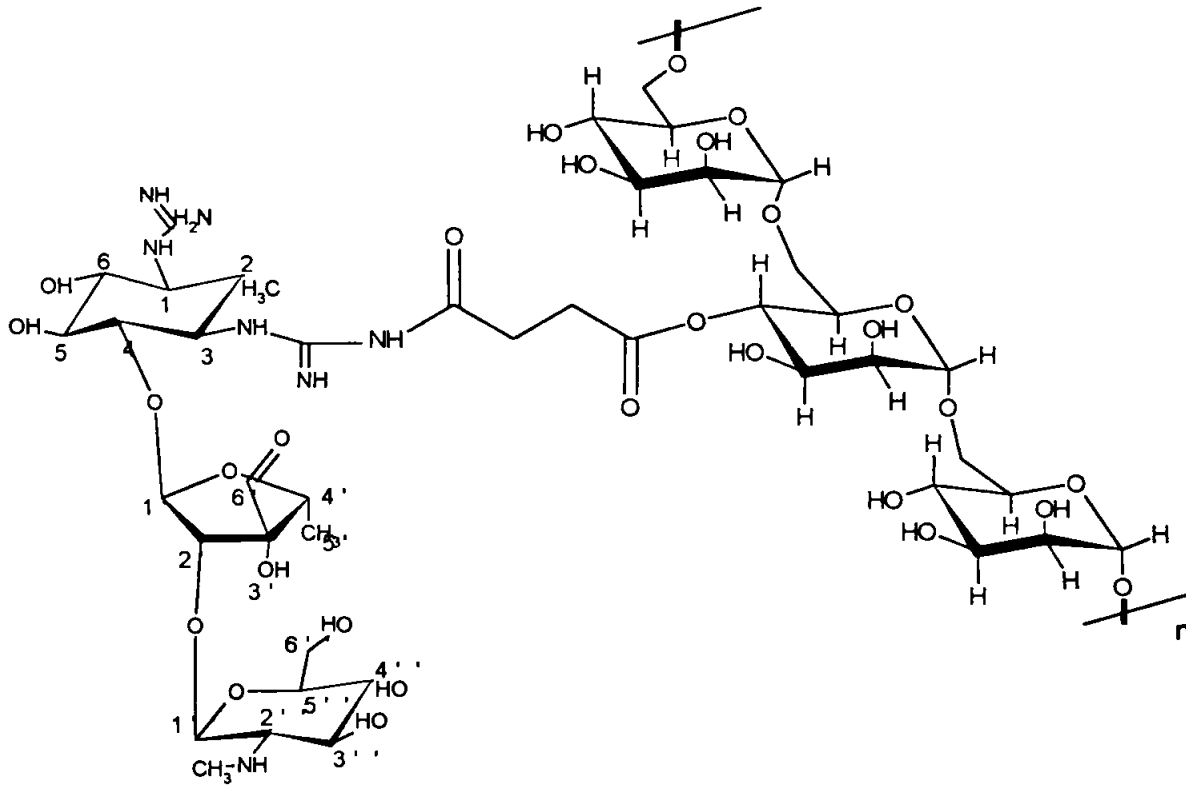


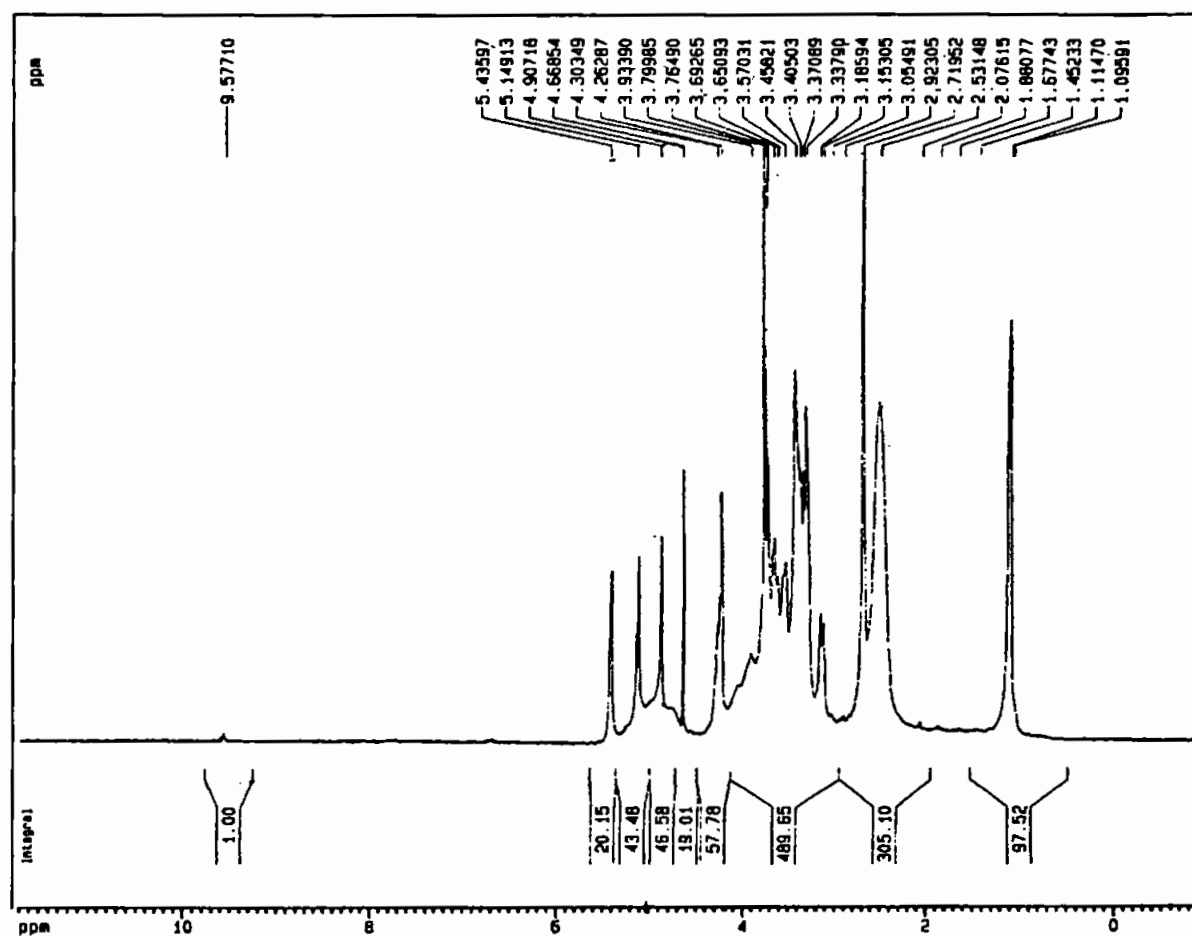
ESPECTRO 8 – Infravermelho em pastilha de KBr, do fármaco dirigido de estreptomicina com derivado carboximetilado de manana.

Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3330-3460 (ν OH)
B	2890-2990 (ν CH, CH ₂)
C	1672 (ν C=O, amida); 1538 (δ NH, amida)
D	1150-1050 (ν C-O, C-O-C, C-OH)

6.3. Fármacos dirigidos de estreptomicina com DSM



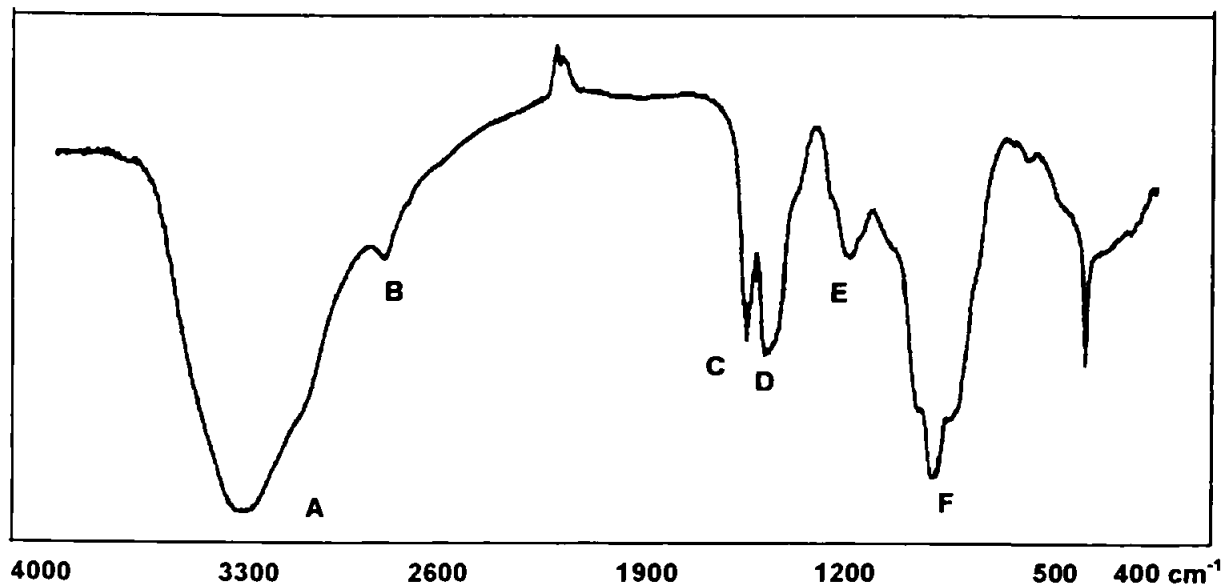


ESPECTRO 8 – RMN ^1H do fármaco dirigido de estreptomicina com derivado succinilado de manana.

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 1,10$ (s, 3H), (7'') *N*-metilglicosamina; $\delta = 2,72$ (s, 2H), 8 e 9; $\delta = 2,92$ (s, 3H), (5') *sec*-Me, formil estreptose; $\delta = 3,33$ -3,93, sinal largo (manana)*; $\delta = 4,90$ (s, 1H), (1') formil estreptose**; $\delta = 5,15$ (s, 2H), (6'')**; $\delta = 5,43$ (s, 1H), NH glicosamina; $\delta = 9,57$ (s, 1H) grupo aldeído.

* Estes sinais estão sobrepostos aos sinais referentes aos prótons 2'e 4' da formil estreptose

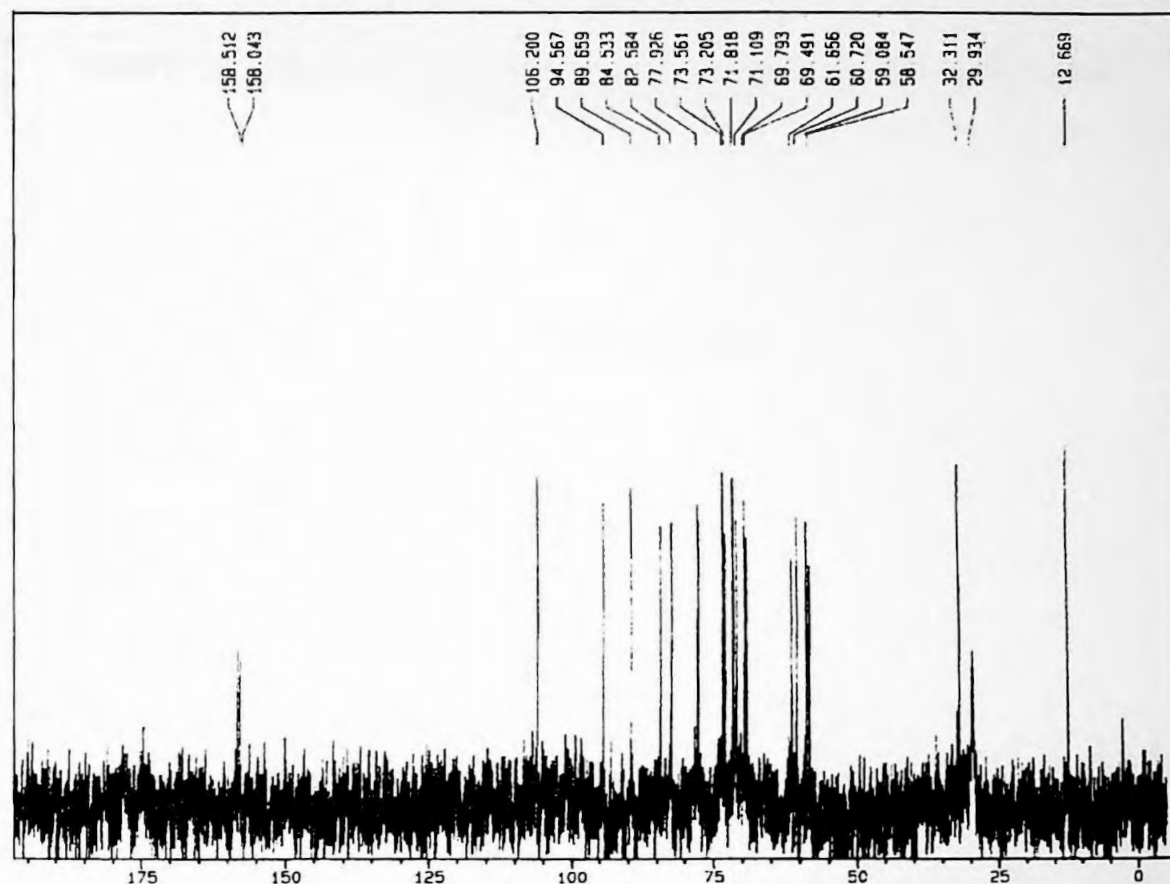
**Sinais sobrepostos aos sinais referentes aos prótons H1 da manana (GORIN & SPENCER, 1970)



ESPECTRO 9 – Infravermelho em pastilha de KBr do fármaco dirigido de estreptomicina com derivado succinoilado de manana.

Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3330-3460 (νOH)
B	2900-2960 (νCH, CH ₂)
C	1729 (νC=O, éster)
D, E	1654 (νC=O, amida); 1539 (δNH, amida)
F	1108-1046 (νC-O, C-O-C, C-OH)



ESPECTRO 10 – RMN ^{13}C do fármaco dirigido de estreptomicina com derivado succinilado de manana

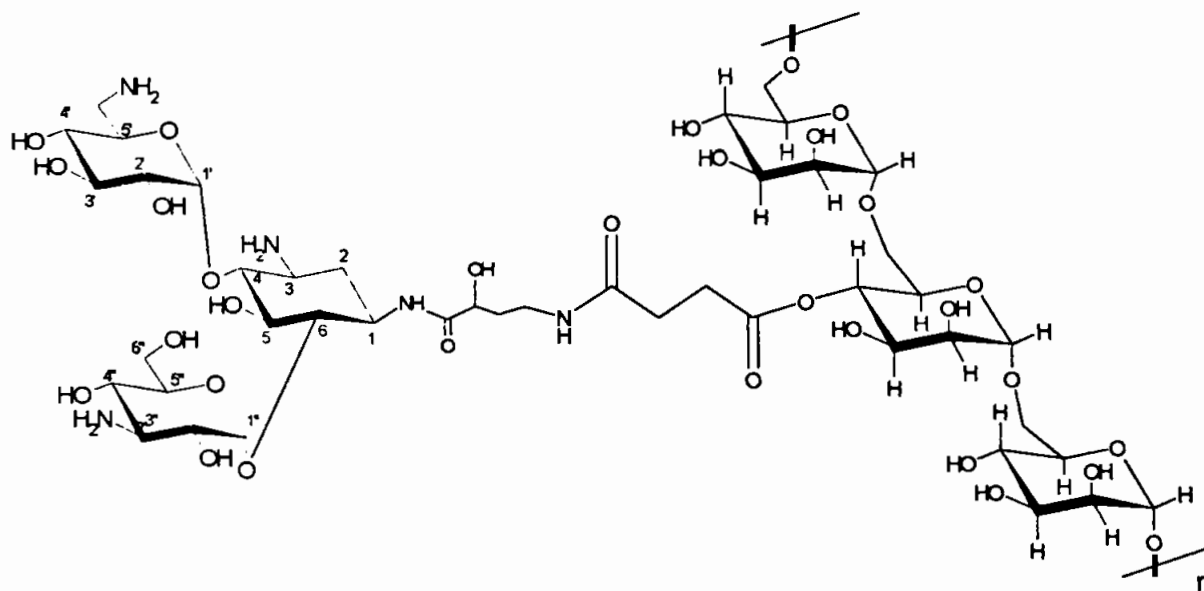
Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 12,67$, $\text{C5}'$ (formil estreptose); $\delta = 29,73$ (8 e 9 – espaçante); $\delta = 32,31$, $\text{C7}''$ (*N*-metilglicosamina); $\delta = 58,55$, C1 ; $\delta = 59,08$ C3 ; $\delta = 60,72$, C6 ; $\delta = 61,65$ C5 , (estreptidina); $\delta = 69,49$ - $94,57$, carbonos da manana (sobrepostos aos sinais de $\text{C2}'$ e $\text{C3}''$ da estreptomicina); $\delta = 106,20$ C1 e $\text{C1}''$; $\delta = 158,04$ e $158,51$ (C10 e C11).

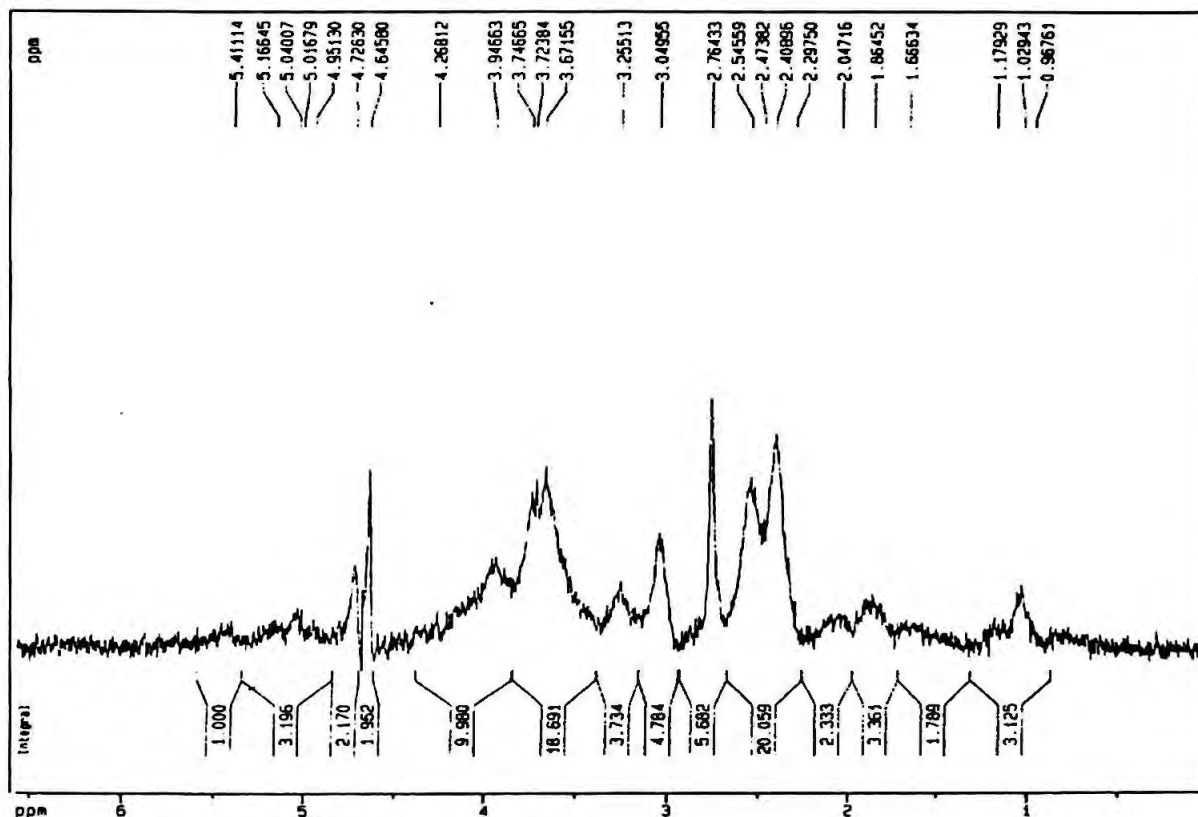
* Estes sinais estão sobrepostos aos sinais referentes aos prótons 2'e 4' da formil estreptose

**Sinais sobrepostos aos sinais referentes aos prótons H1 da manana (GORIN & SPENCER, 1970).

PARTE II – Obtenção dos Fármacos Dirigidos de Amicacina com Derivados de Manana

6.4. Fármacos dirigidos de amicacina com DSM



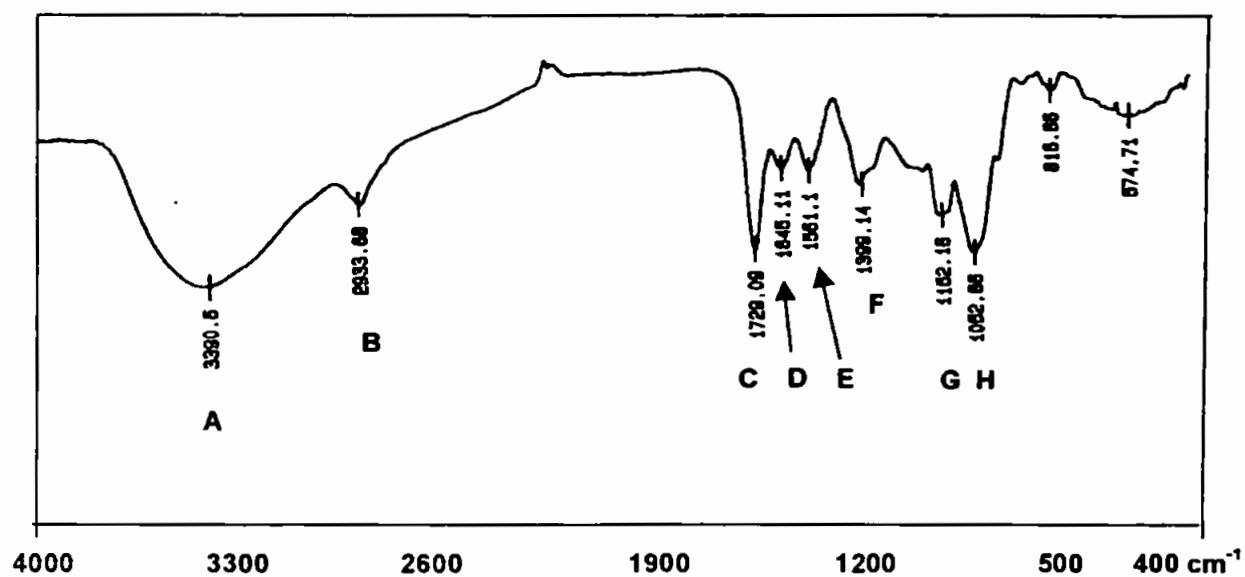


ESPECTRO 11 – RMN ^1H do fármaco dirigido de amicacina com derivado succinilado de manana

Atribuições – D_2O , $\delta = \text{ppm}$: $\delta = 1,86$ (m, 2H), (H8 amicacina); $\delta = 2,04$ (m, 1H), (H7 amicacina); $\delta = 2,29-2,54^*$; $\delta = 2,76$ (s, 2H), (H9 e 10 succinil); $\delta = 3,05-4,27$ (m, 35H), (H2,3,4,5,6 amicacina); $\delta = 4,9-5,04$ (m, 2H), (H1 manana); $\delta = 5,16$ (sl**, 1H), (H1' amicacina); $\delta = 5,41$ (sl**, 1H), (H1'' amicacina).

*vide item 5.1.5.1.

**sl= sinal largo.

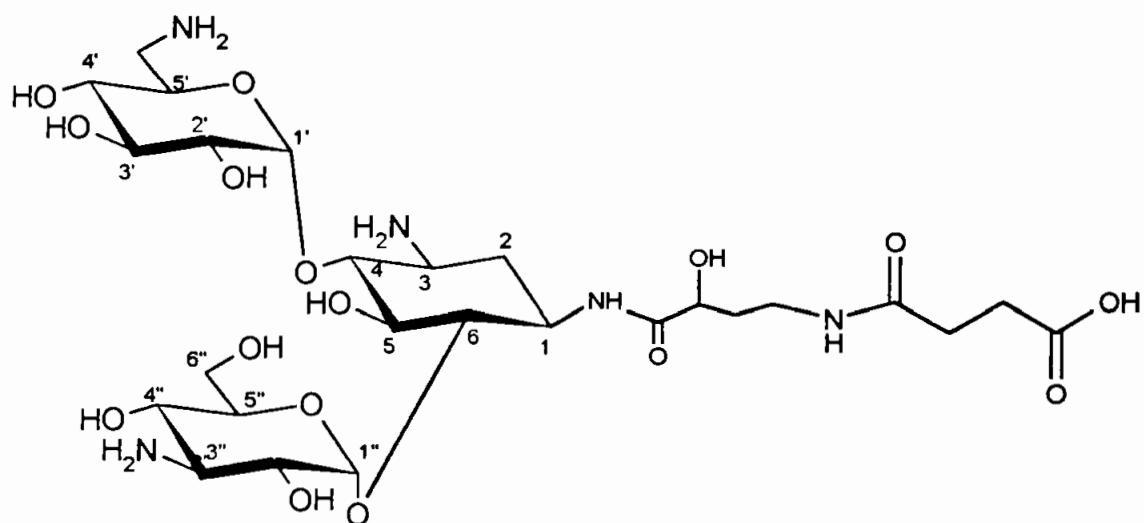


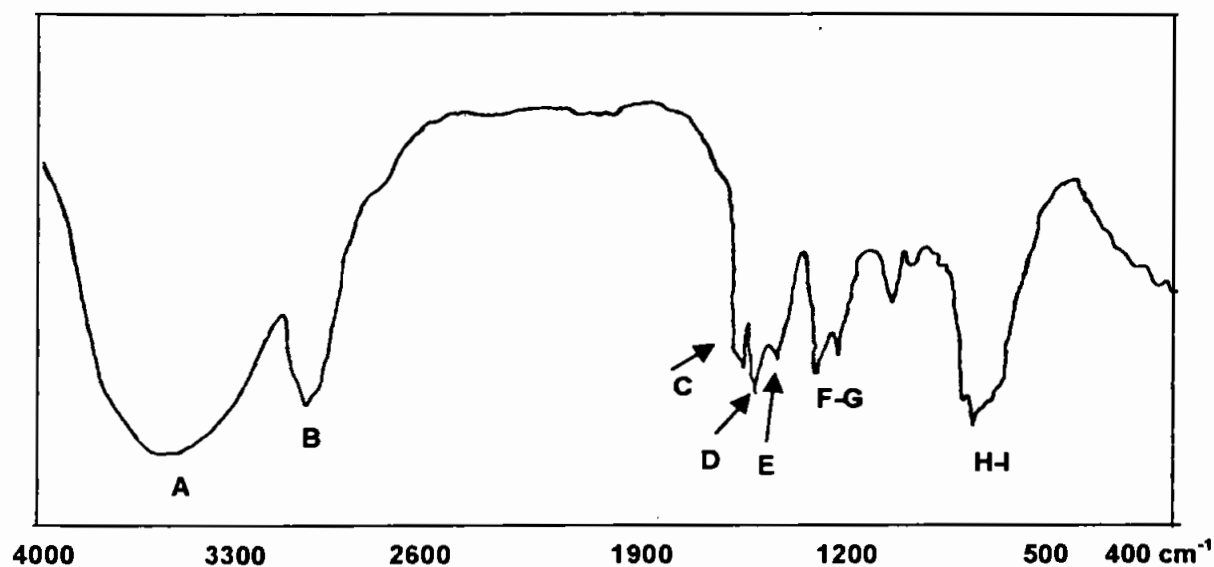
ESPECTRO 12 – Infravermelho em pastilha de KBr do fármaco dirigido da amicacina com derivado succinóilado de manana.

Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3300-3460 (νOH)
B	2900-2950 (νCH, CH ₂)
C	1729 (νC=O, éster)
D	1645 (νC=O, amida)
E	1561 (δNH, amida)
F	1399 (δCH)
G-H	1152-1052 (νC-O, C-O-C, C-OH)

6.5. Succinamida de amicacina

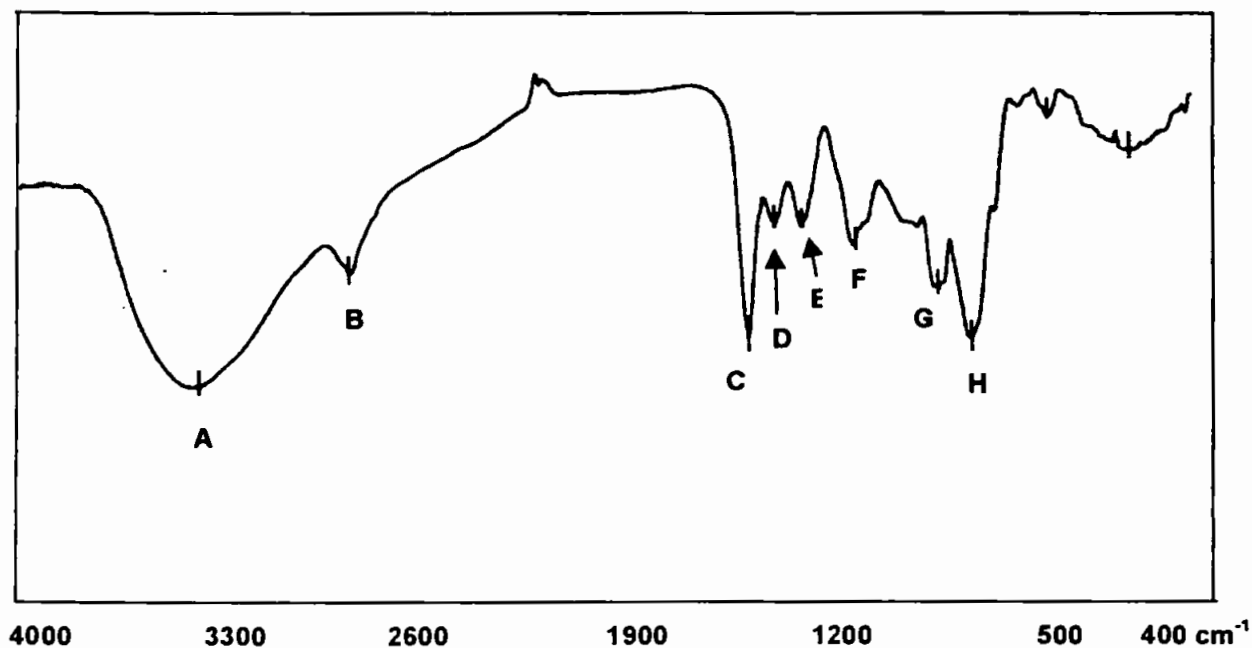




ESPECTRO 13 – Infravermelho em nujol/NaCl da succinamida de amicacina

Atribuições

Banda	cm^{-1}
A	3310-3465 (ν OH)
B	2900-2980 (ν CH, CH ₂)
C	1716 (ν C=O, ácido)
D	1652 (ν C=O, amida)
E	1539 (δ NH, amida)
F-G	1452-1380 (δ CH)
H-I	1159-1080 (ν C-O, C-O-C, C-OH)



ESPECTRO 14 – Infravermelho em pastilha de KBr do conjugado manana-succinamida de ampicacina (fármaco dirigido)

Atribuições

<i>Banda</i>	<i>cm⁻¹</i>
A	3303-3458 (νOH)
B	2907-2956 (νCH, CH ₂)
C	1730 (νC=O, éster)
D	1643 (νC=O, amida)
E	1563 (δNH, amida)
F	1395 (δCH)
G-H	1154-1054 (νC-O, C-O-C, C-OH)

7 – CONCLUSÕES PARCIAIS

7.1. Considerando o tropismo da manose pelos receptores de macrófagos pulmonares, como amplamente descrito na literatura, planejou-se a síntese de fármacos dirigidos de manana, polissacarídeo constituído de manose, como transportador seletivo de estreptomicina e de amicacina. Inicialmente, obtiveram-se succinil e carboximetilmanana, utilizando-se método descrito para o dextrano. Os transportadores foram obtidos com baixo rendimento e grau de acilação maior para o derivado succinoílico.

7.2. A obtenção dos fármacos dirigidos de estreptomicina com ambos os derivados de manana a partir do método geral descrito, utilizando DCC, requereu, no mínimo, 24 horas para o derivado succinoílico e 48 horas para o derivado carboximetílico, considerando-se 72 horas como tempo ideal. Observou-se, também, que o tempo e a ordem de adição dos reagentes são determinantes.

7.3. Enfrentou-se maior dificuldade na síntese dos fármacos dirigidos de amicacina com ambos os derivados de manana, especialmente no caso do derivado de carboximetilmanana, obtendo-se melhores resultados com o emprego de EDC como agente condensante.

7.4. A substituição dos tuberculostáticos nos polímeros, determinada por meio da análise elementar de nitrogênio, foi de 0,6 mmol/g para a succinilmanana e carboximetilmana, no caso da estreptomicina, e de 0,39 mmol/g para a succinilmanana, em se tratando de amicacina.

7.5. Os derivados obtidos foram caracterizados por IV, RMN ^1H e de ^{13}C e análise elementar. A estrutura complexa dos polímeros obtidos não permitiu que se

obtivessem os espectros com resolução compatível com a identificação inequívoca dos compostos.

7.6. A determinação da massa molecular dos compostos, de grande importância para a caracterização completa, não foi possível. Por outro lado, a espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI/MS), bem como a cromatografia por permeação em gel seriam alternativas de grande valor para identificação destes produtos.

7.7. Submetidos aos ensaios em cultura de *M. tuberculosis* cepa H37RvATCC 27294, os fármacos dirigidos de estreptomicina apresentaram CIM igual ao do fármaco de partida, sugerindo que não houve diminuição da eficácia do tuberculostático.

7.8. Os fármacos dirigidos de amicacina, submetidos ao ensaio em cultura de *M. tuberculosis* cepa H37RvATCC 27294, *M. bovis*, *M. avium* e *M. kansasii*, mostraram-se menos ativos que os de estreptomicina e que a amicacina de partida, sugerindo que a dose mínima eficaz pode não ter sido atingida nos microrganismos. Deve-se, no entanto, considerar que a amicacina por si só apresenta atividade inferior à da estreptomicina.

7.9. A avaliação dos fármacos dirigidos de estreptomicina realizada em macrófagos infectados mostrou baixa atividade intracelular dos compostos. Porém, devem ser considerados os resultados obtidos com a estreptomicina *per se*, uma vez que esta última foi empregada em concentrações duas vezes maiores, enquanto que se tem baixa substituição nos polímeros derivatizados. Há, portanto, indicativos de atividade intracelular, que deve ser mais cuidadosamente avaliada. Para tanto, se faz necessária a caracterização inequívoca dos produtos, para estudos do perfil de captura dos conjugados pelas células, bem como da toxicidade dos mesmos, a fim de se observar o índice quimioterápico dos fármacos dirigidos.

8 - PERSPECTIVAS

O trabalho realizado fornece pontos de partida para um leque de investigações:

- Os métodos de síntese podem ser mais explorados, empregando-se agentes condensantes e catalisadores alternativos, buscando-se, dessa forma, melhores rendimentos e maiores graus de substituição dos antibióticos nos polímeros derivatizados;
- A caracterização dos produtos finais – estrutural e determinação de massa molecular- deve ser aprimorada, e, para tanto, se fazem necessárias metodologias analíticas alternativas que permitam tal feito, uma vez que os compostos são estruturalmente complexos.
- A avaliação biológica deve ser realizada também, com respeito à toxicidade, para investigação do índice quimioterápico dos compostos propostos, uma vez que o objetivo central do trabalho é diminuir significativamente os efeitos indesejáveis dos aminoglicosídeos.
- A investigação dos perfis de hidrólise e captação pelos macrófagos dos derivados de manana também é bastante importante, uma vez que se constituem em pontos-chave para a atividade dos fármacos dirigidos propostos.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, R., DAX, A., STUTZ, E., HILDEBRANDT, J. Chemical modification of amikacin at C-4" with inversion of configuration. *J. Antibiot.*, Tokyo, v. 38, p. 275-278, 1985.
- ARRANZ, F., SANCHEZ-CHAVES, M., RAMIREZ, J. C. Functionalization of dextran: Incorporation of carboxy groups by *o*-succinylation. *Angew. Makromol. Chem.*, Basel, v. 194, p. 79-89, 1992.
- BARNES, P. F., DAVIDSON, P.T. Tuberculosis in patients with HIV infections. *Med. Clin. North. Am.*, Philadelphia, v. 77, n. 6, p. 11369 -11389, 1993.
- BLAKLEY, B. W. Clinical forum: A review of intratympanic therapy. *Am. J. Otol.*, Philadelphia, v. 18, p. 520-526, 1997.
- BLOOM, B. R., ROOK, G. A. W. Mechanisms os pathogenesis in tuberculosis. In: BLOOM, B. R., ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, Washington: ASM Press, p. 485-501, 1994.
- BROGLIO, R., LIMA-FILHO, M. T. Tuberculosis pulmonar. In: VERONESI, R, FOCACCIA, R., DIETZE, R., eds. *Doenças Infeciosas e Parasitárias*, 2ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 325-343.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs. Fut.* Auckland, v. 16, n.5, p. 443-456, 1991.
- CARVALHO, P. B., RAMOS, D. C. C., COTRIM, P. C, FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antileishmanial targeted drugs of pyrimethamine, *J. Pharm. Sci.* n. 92, v. 10, p. 2109-2116, 2003.

-
- CHAKRABORTY, P.; BHADURI, A. N., DAS, P. K. Sugar receptor-mediated drug delivery to macrophages in the therapy of exp. visceral leishmaniasis, *Biochem. Biophys. Res*, Orlando, v. 166, p. 404-408, 1990.
- aCHAMBERS, H. F. Chemotherapy of infections. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., eds. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1143-1170.
- bCHAMBERS, H. F. Antimicrobial Agents: The aminoglycosides; In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., eds. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.1219-1238.
- CHUNG, M. C, FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.22, n. 1, p. 75-84, 1999.
- CLOTHORPE, P., FARR, S. J., TAYLOR, G., SMITH, I. J, WYATT, D. The pharmacokinetics of pulmonary delivery insulin: a comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 9, p. 764-768, 1992.
- COESSENS, V., SCHACHT, E., DOMURADO, D. Synthesis of polyglutamine and dextran conjugates of streptomycin with an acid-sensitive drug-carrier linkage. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v. 38, p. 141-150, 1996.
- COOKSEY, R.C.; CRAWFORD, J.T.; JACOBS, W.R.; SHINNICK, T.M. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 37, n. 6, p. 1348-52, 1993.

-
- COUVREUR, P., FATTAL, E., ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 8, p. 1079-1086, 1991.
- De DUVE, C., De BARSY, T., POOLE, B., TROUET, A., TULKENS, P., VAN HOOFF, Lysosomotropic agents. F., *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 23, p. 2495, 1974.
- DESVARIEUX, M., HYPPOLITE-PIERRE, R., JOHNSON, W. D., PAPE, J. W. A novel approach to directly observed therapy for tuberculosis in an HIV endemic area. *Am J. Pub. Health*, Chicago, v. 91, n.1, p 138-141, 2001.
- DESVEAUX, N., PERCHERON, F. Préparation de carboxyméthylmannanes hydrosolubles. *C. R. Acad. Sc. Paris*, Paris, v. 276, p. 355-357, 1973.
- DOLIN, P.J., RAVINGLIONE, M. C., KOCHI, A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1900-2000, *Bull. WHO*, Geneve, v. 72. n. 2, p. 213-20, 1994.
- DULON, D., ZAJIC, G., ARAN, J. M., SCHACHT, J. Aminoglycoside antibiotics impair calcium-entry but not viability and motility of cochlear outer hair cells. *J. Neurosci. Res.*, New York, v. 24, p. 338-346.
- DUTT, M., KHULLER, G. K. Tuberculosis sustained release of isoniazide from a single injectable dose of poly(DL-lactide-co-glicolide) microparticle as a therapeutic approach towards tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 15-22, 2001.

EDSON, R. S., TERRELL, C.L. *The aminoglycosides*. Mayo Clin. Proc., New York, v. 74, p. 519-528, 1999.

FIELDING, R. M. The use of inhaled liposome formulations for drug delivery to the lung and systemic circulation. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, San Francisco, v. 32, p. 103-106, 1989.

FRECHET, J. M. J. Functional Polymers and Dendrimers – reactivity, Molecular Architecture, and Interfacial Energy. *Science*, Washington, n. 263, p. 1710-1715, 1994.

FRIIS, G.J., BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T. MADSEN, U., eds. *A textbook of drug design and development*. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p.351-385.

FORGE, A., SCHACHT, J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol. Neuro-Otol.*, Basel, v.5, p. 3-22, 2000.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Disponível na internet: www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0534A.htm; acessado em 14/02/2003.

GAC, S., COUDANE, J., BOUSTTA, M., DOMURADO, M., VERT, M. Synthesis, characterization and in vivo behaviour of a norfloxacin-poly(L-lysine imide) conjugate bearing mannosyl residues. *J. Drug Targeting*, Oxford, v. 7, p. 393-406, 2000.

-
- GAO, Z., LUKYANOV, A. N., SINGHAL, A., TORCHILIN, V. Diacyl lipid-Polymer micelles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drugs. *Nano Lett.*, Washington, v. 2, n. 9, p. 979-984, 2002.
- GHOSE, T., BLAIR, A.H., VAUGHAM, K., KULKARNI, P. *Targeted drugs*. New York: Plenum Press, 1982. p. 1-22.
- GONZALEZ-ROTHI, R. J., CACACE, J., STRAUB, L., SCHREIER, H. Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: Functional and morphological interactions. *Exp. Lung Res.*, London, v. 17, p. 687-705, 1991.
- GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T. Proton magnetic resonance spectroscopy – An aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. *Adv. Appl. Microb.*, New York, v. 13, p. 25-89, 1970.
- GUPTA, P. K., HICKEY, A. J., MEHTA, R. C., DeLUCA, P. P. Development and characterization of aerosol formulations of biodegradable microspheres of targeted delivery to the lungs. *Pharm. Res.*, Washington, v. 7, suppl. 82, 1990.
- HARRIES, A. D. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in developing countries. *The Lancet*, London, v. 335, n. 17, p. 387-90, 1990.
- HATFULL, G.F.; JACOBS, W. R. Jr. Mycobacteriophages: Cornerstones of mycobacterial research. In: BLOOM, B.R. (ed.) *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. Washington: American Society for Microbiology, 1994. p. 165-83.

-
- HAWORTH, W. N., HEATH, R. L., PEAT, S. The constitution of yeast mannan. *J. Chem. Soc.*, London, p. 833, 1941.
- HAWORTH, W. N., HIRST, E. L., ISHERWOOD, F. A. Polysaccharides. Part XXIV. Yeast mannan. *J. Chem. Soc.*, London, p. 786, 1937.
- HEGDE, S. S., JAVID-MAJD, F., BLANCHARD, J.S. Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally-encoded aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, Washington, v. 276, n. 49, p. 45876-45881, 2001.
- IHRE, H. R., JESÚS, O. L. P., SZOKAJR, F. C., FRECHET, J. M. J. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: design, synthesis and characterization. *Bioconj. Chem.*, Washington, v. 13, n. 3, p. 443-452 2002.
- JACOBS Jr, W.R.; BARLETTA, R.G.; UDANI, R.; CHAN, J. KALKUT, G.; SOSNE, G.; TIESER, T.; SARKIS, G.J.; HATFULL, G.F.; BLOOM, B.R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, Washington, v. 260, n. 5109, p. 819-22, 1993.
- JOHNS HOPKINS CENTER FOR TUBERCULOSIS RESEARCH. Disponível na internet: http://www.hopkins-tb.org/drug/drug_4.shtml. Acessado em 15/02/2003.

-
- JULIANO, R. L., McCULLOUGH, H. N. Controlled delivery of an antitumour drug: localized action of liposome-encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v. 214, p. 381-387, 1980.
- JUNG, Y. J., LEE, J.S., KIM, H. H., KIM, Y. T., KIM, Y. M. Synthesis and properties of dextran-5-aminosalicylic acid ester as a potential colon-specific prodrug of 5-aminosalicylic acid. *Arch. Pharm. Res.*, Philadelphia, v. 21, p.179-186, 1988.
- KAMAREL, A., WONG, A., McCALDEN, T. Methodology for efficacy study of liposome bronchodilators in long duration experiments. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, San Francisco, v. 32, p. 32-36, 1989.
- KAWAGUCHI, H., NAITO, T., NAKAGAWA, S., FUJISAWA, K. BB - K8, A new semisynthesis aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot.*, Tokyo, vol. 25, n. 12, p. 695-707, 1972.
- KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara, Ed. 2001/2002*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, 2.ed. New York: Wiley-Interscience, 1988. p. 53-139.
- KUWAHARA, R., TSUCHIYA, T. Synthesis of 2'-acylamido derivatives of 2'-amino-5,2'-dideoxy-5-epi-5-fluorodibekacin and a study on the structures of 5- fluorinated dibekacin analogs by ^{13}C NMR. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 299, p. 271-279, 1997.

-
- LEE, Y. C., BALLOU, C. E. Preparation of mannobiose, mannotriose and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry*, Washington, v. 4, n. 2, p. 257, 1965.
- LEMIEUX, C., WOLFROM, M. L. The chemistry of streptomycin. *Adv. Carbohydr. Chem.*, New York, n. 3, p. 337-384, 1948.
- LEMKE, T. Tuberculostatic agents. In: WILLIAMS, D.A.,LEMKE,T.L., eds. *Foye's Medicinal Chemistry*. 5.ed. New York: Academic Press, 2002. p.904.
- LENNARTZ, M. R., SESSIONS-COLE, F., STAHL, P. D. Biosynthesis and processing of the mannose receptor in human macrophages. *J. Biol. Chem.*, Washington, v. 264, n. 4, p. 2385-2390, 1989.
- LOWRIE, D. B., TASCAN, R. E., BONATO, V. L. D., LIMA, V. M. F., FACCIOLI, L. H., STRATOPOULOS, E., COLSTON, J. M., HEWINSON, R. G., MOELLING, K., SILVA, C. L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, London, n. 400, p. 269-271, 1999.
- MAJUMDAR, S., BASU, S. K. Killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by receptor-mediated drug delivery. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.35, p.135-140, 1991.
- MAJUMDAR, S., BASU, S. K. Receptor-mediated delivery of *p*-aminosalicylic acid conjugated to maleylated serum albumin against *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Drug Delivery*, London, v. 2, p.144-149, 1995.

-
- Mc LEOD, A., FRIEND, D.R., TOZER, T. Synthesis and chemical stability of glucocorticoid-dextran esters: potential prodrugs for colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 92, p. 105-114, 1993.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P., GLUPCZYNSKI, Y., TULKENS, P. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 43, n. 4, p.727-737, 1999.
- MITSCHER, L. A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D.A., LEMKE, T.L., eds. *Foye's Medicinal Chemistry*. 5.ed. New York: Academic Press, 2002. p.759.
- MONTELEONE, P. M., MUHAMMAD, N., BROWN, R. D., Mc GRORY, J. P., HANNA, S. Amikacin sulphate. *Anal. Profiles Drug Subs*. New York, v.12, p.37-58, 1983.
- MOSSA, J., TARAGAN, A. H. U. K., HASSAN, M. M. A. Streptomycin. *Anal. Profiles Drug Subs*. New York, v.16, p. 507-524, 1987.
- MUKHOPADHYAY, B., MUKHOPADHYAY, A., BASU, S. K. Enhancement of tumouricidal activity of daunomycin by receptor-mediated delivery. *Biochem. Pharmacol.*, London, v. 46, p. 919-924, 1993.
- MUKHOPADHYAY, B., MUKHOPADHYAY, A., SRIVASTAVA, R. K., BASU, S. K. Scavenger receptor-mediated delivery of daunomycin elicits selective toxicity towards neoplastic cells of macrophage lineage. *Biochem. J.*, Portland, v. 284, p.237-241, 1992.

- NISHIKAWA, M. KAMIJO, A., FUJIDA, T. TAKAKURA, Y. SEZAKI, H., HASHIDA, M. Synthesis and pharmacokinetics of a new liver-specific carrier, glycosilated carboxymethyl dextran, and its applications to drug targeting. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.10, n.9, p.1253-1261, 1993.
- ONE, M. SNIDER, D. E., KOCHI, A Global epidemiology of tuberculosis— obity and mortality of a worldwide epidemic, *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 273, n. 3, p. 220–226, 1995.
- PEAT, S., WHELAN, W. J., EDWARDS, T. E. Polysaccharides of Baker's yeast. Part IV. Mannan. *J. Chem Soc.*, London, p. 29-34, 1961.
- PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*. 3rd ed. Boston: Butterworth Heinemann, 1988. 391 p.
- PICHLER, M., WANG, Z., GRABNER-WEISS, C., REIMER, D., HERING, S., GRABNER, M., GLOSSMANN, H., STRIESSNIG, J. Block of P/Q-type calcium channels by therapeutic concentrations of aminoglycoside antibiotics. *Biochemistry*, Washington, v. 35, p. 14659-14664, 1996.
- RANG, H. P., RITTER, J. M., DALE, M. M., *Farmacologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692p.
- SATO, D. N. *Avaliação da atividade antibacteriana "in vitro" de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao Mycobacterium tuberculosis*. São Paulo, 1998. [Dissertação de Mestrado - FCF-USP].
- SBARBARO, J. A., Tuberculosis: Yesterday, today and tomorrow, *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 122, n. 12, p. 955–956, 1996.

-
- SCHACHT, E. H., VANSTEENKISTE, S., SEYMOUR, L. Macromolecular carriers for drug targeting. In: WERMUTH, C. G., ed. *The Practice of Medicinal Chemistry*, London: Academic, 1996. p.717-736.
- SCHANKER, L. S., MITCHELL, E. W., BROWN, R. A. Species comparison of drug absorption from the lung after aerosol inhalation or intratracheal injection. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v. 14, p. 79-88, 1986.
- SCHATZ, A., BUGIE, S., and WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, London, v. 57, p. 244-48, 1944.
- SETT, R., SARKAR, K., DAS, P. K. Macrophage-directed delivery of doxorubicin conjugated to neoglycoprotein using leishmaniasis as the model disease. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.168, p. 994-999, 1993.
- SHITARA, T., KOBAYASHI, Y., TSUCHIYA, T., UMEZAWA, S. Synthesis of 5-deoxy-5-fluoro and 5-deoxy-5,5-difluoro derivatives of kanamycin B and its analogs. Study on structure-toxicity relationships. *Carbohydr. Res.* Amsterdam, v. 232, p. 273-290, 1992.
- SILVA, M., FERREIRA, E. I. Situação atual da quimioterapia contra a tuberculose. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 35, p. 17-30, 1999.
- SINGH, G., SHARMA, P.D. Mutual Prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, Bombaim, v.56, n.3, p. 69-79, 1994.

-
- SNEWIN, V.A.; GARES, M.; GAORA, P.Ó.; HASAN, Z.; BROWN, I.N.; YOUNG, D.B. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. *Infect. Immun.*, Washington, v. 67, n. 9, p. 4586-93, 1999.
- SPEEDING, H. Infrared spectra of periodate-oxidised cellulose. *J. Chem. Soc.*, London, p. 205-218, 1960.
- STAHL, P., SCHLESINGER, P., SIGADSON, E., RODMAN, J., LEE, Y. C. Receptor mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages. Characterization and evidence of receptor recycling. *Cell*, Cambridge, v.19, p. 207-208, 1980.
- STELLA, V.J., CHARMAN, W.N.A., NARINGREKAR, V.H. Prodrugs: do they have advantages in clinical practice? *Drugs*, Auckland, v.29, p. 445-473, 1985.
- STELLA, V.J., HIMMELSTEIN, K.J. Site-specific drug delivery via prodrugs. In: BUNDGAARD, H., ed. *Design of prodrugs*, Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 177-198.
- STEWART, T. S., BALLOU, C. E. A Comparison of yeast Mannans and phosphomannans by acetolysis. *Biochemistry*, Washington, v.7, n.5, p. 1855-1860, 1968.
- STEWART, T. S., MENDERSHAUSEN, P. B., BALLOU, C. E. Preparation of mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry*, Washington, v.7, p. 1843-1849, 1968.

-
- STOCKERT, R. T., MORRELL, A. G., SCHEINBERG, I. H. The existence of a second route for the transfer of certain glycoproteins from the circulation into the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v.68, p.988-993, 1982.
- STOKSTAD, E. Drug-Resistant TB on The Rise. *Science*, v. 287, p. 239, 2000.
- SUDRE, P., DAM, T. G., KOCHI, A., Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull. WHO*, Geneve, v. 70, p. 149-159, 1992.
- SWAN, S. K. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.*, Philadelphia, v.17, p.27-33, 1997.
- TAKAKURA, Y., ATSUMI, R., HASHIDA, M., SEZAKI, H. Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate with anionic charge. II - Disposition and pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administration. *Int. J. Pharm.*, New York, v. 37, p. 145-154, 1987.
- TAKAKURA, Y., FUJITA, T., FURITSU, H. Pharmacokinetics of succinylated proteins and dextran sulfate in mice: implications for hepatic targeting of protein drugs by direct succinylation via scavenger receptors. *Int. J. Pharm.*, New York, v. 105, p.19-29, 1994.
- TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier system in cancer chemotherapy: macromolecular produgs. *Crit. Ver. Oncol. Hematol.*, Amsterdam, v. 18, p. 207-231, 1995.

-
- TAYLOR, K.M.G., TAYLOR, G., KELLAWAY, I.W., STEVENS, J. The influence of lyposomal encapsulation on sodium cromoglycate pharmacokinetics in man. *Pharm. Res.*, Washington, v. 6, p. 633-636, 1989.
- TICE, T. R., MASON, D. W., GILLEY, R. M. Clinical use and future of parenteral microsphere delivery systems. In: PRESCOTT, L. F., NIMMO, W. S., eds. *Novel Drug Delivery and its Therapeutic Applications*. New York: Wiley, 1989, p. 223-235.
- TESTA, B., CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Med. Res.*, New York, v.16, p.233-241, 1996.
- TREVELYAN, W. E., HARRISON, J. S. Microdetermination of yeast carbohydrates. *Biochem. J.*, Cambridge, v. 50, p. 298-303, 1952.
- TSUCHYIA, T., TAKAHASHI, Y., KOBAYASHI, Y., UMEZAWA, S., UMEZAWA, H. Synthesis of 3'-deoxy-3'-fluorokanamycins A and B active against resistant bacteria. *J. Antibiot.*, Tokyo, v. 38, p. 1287-1290, 1985.
- TSUKIURA, H. K., SHITARA, T., UMEZAWA, S., TAKEUCHI, T., HAMADA, M., TOMONO, N., UMEMURA, E. Synthesis of low-toxicity, 5-deoxy-5-fluoro and 5-deoxy-5,5-difluoro derivatives of arbekacin and its analogs – study of structure-toxicity relationships. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 240, p. 307-312, 1993.

-
- TODISCO, T., DOTTORINI, M., PALUMBO, R., CALVITTI, M., VERNELLI, C., ROSSI, F., IANNACCI, L., GRANDOLINI, S., COSMI, V. Fate of human albumine microspheres and spherocytes radioaerosols in the tracheobronchial tree. *Lung*, (suppl.), New York, p. 665-671, 1990.
- UEKAMA, K., OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug delivery systems. In: BRUCK, S. D., ed. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. Boca Raton: CRC Press, 1987. p.1-40.
- VAN SCHEPDAEL, A., BUSSON, R., VANDERHAEGHE, H. J., VERBIST, L., CLAES, P. J., MINGEOT-LECLERCQ, M. P., TULKENS, P. M. Synthesis, antibacterial activity and toxicological evaluation (*in vitro* and computer-aided) of 1-*C*-hydroxymethyl kanamycin B and 1-*C*-hydroxymethyl, 6'' chlorokanamycin. *Br. J. Med. Chem.*, Cambridge, v. 34, p. 1483-1492, 1991.
- VITAL-BRAZIL, O., CORRADO, A. P. The curariform action of streptomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, London, v. 120, p. 452-459, 1957.
- WERMUTH C. G., Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLES, G., WOOLDRIDGE, K. R. H., eds. *Drug design: fact or fantasy?* New York: Academic Press, 1984. p. 47-72.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors II. Bioprecursors prodrugs. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, 1996. p. 697-716.

-
- WERMUTH, C.G., GAIGNAULT, J.C., MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I. Carrier prodrugs. In: WERMUTH, C.G., ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 671-696.
- WILLIAMS, D.A. In: WILLIAMS, D. A., LEMKE, T. L. eds. *Foye's Medicinal Chemistry*. 5.ed. New York: Academic Press, 2002, p. 960.
- WOLFE, H., MARMOR, M., MASLANSKY, R. *et al.*, Tuberculosis knowledge among NY city injection drugs users. *Am. J. Public Health*, Washington, v. 85, p. 985-988, 1995.
- WOO, P., W. K., DION, W., BARTZ, Q. R. Butirosins A and B, aminoglycoside antibiotics. III. Structures. *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.85, p. 2625-2628, 1971.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis: Prevention & Control. DOTS - Plus, 2003. *Disponível na internet* <http://www.who.int/gtb/policyrd/DOTSpplus.htm>. Acessado em 28/01/2003.
- YOO, H. S., LEE, E. A., PARK, T. G. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages. *J. Contr. Rel.*, Amsterdam, v. 82, p. 17-27, 2002.
- ZENG, X. M., MARTIN, G. P., MARRIOTT, C. The controlled delivery of drugs to the lung. *Int. J. Pharm.*, New York, v. 124, p. 149-164, 1995.