

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RODRIGO DE VECCHI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA  
DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO UM ANÁLOGO DA  
ISONIAZIDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

D278a De Vecchi, Rodrigo

Avaliação da atividade antimicobacteriana de nanopartículas contendo um análogo da isoniazida [dissertação] / Rodrigo De Vecchi ; orientador, André Báfica. - Florianópolis, SC, 2010. 98 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

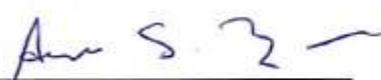
1. Farmacologia. 2. Tuberculose. 3. Isoniazida - Análogos. 4. Nanopartículas. 5. Macrófagos. I. Báfica, André Luiz Barbosa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

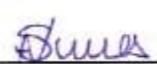
CDU 615

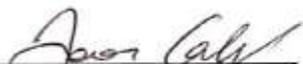
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA  
DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO UM ANÁLOGO DA  
ISONIAZIDA**

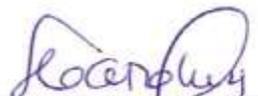
**RODRIGO DE VECCHI**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros da Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores:**

  
\_\_\_\_\_  
**André Luiz Barbosa Báfica  
Presidente e Orientador  
(FMC/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Anderson de Sá Nunes  
(USP)**

  
\_\_\_\_\_  
**João Batista Calixto  
(FMC/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

**Florianópolis, 26 de novembro de 2010.**



## AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, por ter me incentivado sempre a buscar o conhecimento; à minha Mãe, por sua infinita bondade e amor; à minha Irmã, por ser “simplesmente Ela”, grande amiga, incondicional; ao meu Irmão, pela amizade e motivação, mesmo à distância; e à *Jub*, por todo carinho, amor, amizade, força e companheirismo durante esta jornada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Báfica, pela oportunidade e pelo exemplo de foco no trabalho e no resultado;

À Dra. Tatiany Faria, pela dedicação, conhecimento repassado, e por ter me apresentado o “mundo nanométrico”;

Ao Prof. Anicleto Poli, pela grande amizade, carinho e dedicação;

À Prof. Ana Lúcia Gomes, pelo direcionamento;

Aos amigos do LIDI, especialmente Nicole e Álvaro;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia;

Aos amigos, colegas e técnicos da “Farmaco”;

À UFSC, pela infra-estrutura e ao CNPq, pelo auxílio-financeiro.



*“O valor de se praticar por algum tempo uma ciência rigorosa não está somente em seus resultados, mas principalmente no aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade. Aprende-se a alcançar um final de modo pertinente. Por isso será sempre valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem da ciência.”*

(Nietzsche, 1878)



## RESUMO

A vetorização de agentes tuberculostáticos através de nanopartículas é uma estratégia promissora para o tratamento da tuberculose pulmonar. Dentre os fármacos integrantes do esquema terapêutico, a isoniazida (INH) é o mais antigo e utilizado, apresentando excelente atividade antimicobacteriana. Embora amplamente utilizada, a INH acarreta efeitos adversos relacionados à sua toxicidade hepática e neuronal, além do rápido desenvolvimento de resistência do bacilo devido principalmente à baixa penetração intracelular do fármaco. Mecanismos de resistência rapidamente desenvolvidos por este patógeno intracelular têm intensificado a busca por novas estratégias terapêuticas, bem como por moléculas com atividade antimicobacteriana. Além disso, problemas relacionados à baixa eficiência de encapsulação da isoniazida em nanopartículas poliméricas requerem o aprimoramento da formulação farmacêutica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA contendo isoniazida e seu análogo, denominado JVA 001, bem como a avaliação comparativa da atividade antimicobacteriana de cada sistema. Para a obtenção de nanopartículas, foram testadas as técnicas de dupla-emulsão com evaporação do solvente, nanoprecipitação e *salting-out*. Após a padronização da formulação estéril, a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco foram determinados nas nanopartículas através de um método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), da isoniazida e seu análogo, o JVA 001. A eficiência de encapsulação média obtida com a isoniazida foi de 21%, enquanto que com o JVA 001, alcançou 61%. A formulação selecionada permitiu a obtenção de partículas esféricas submicrônicas, com diâmetro médio de 182 nm. Fotomicrografias obtidas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, emissão de campo ou microscopia de força atômica mostraram partículas com formato esférico e superfície lisa. A análise por calorimetria exploratória diferencial indicou a ocorrência de interações entre JVA 001 e a matriz polimérica nas nanopartículas de PLGA. Além disso, o espectro de difração de raios-X mostrou diferenças na estrutura cristalina do composto sintetizado a partir da conjugação da isoniazida com o grupamento citral. A atividade antimicobacteriana do JVA 001 foi avaliada *in vitro*, empregando-se o método do MTT, através do tratamento direto em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), cepa H37Rv, e intracelularmente, em macrófagos murinos infectados. Tanto a isoniazida livre quanto nanoencapsulada reduziram significativamente a viabilidade do Mtb em

cultura, de maneira dose e tempo dependente. Da mesma forma, JVA 001 inibiu o crescimento micobacteriano *in vitro*, entretanto, nanopartículas contendo o análogo JVA 001 foram mais efetivas na inibição do crescimento micobacteriano em macrófagos infectados, reforçando o potencial de nanopartículas poliméricas como carreador intracelular de fármacos. Os resultados obtidos neste trabalho revelam um potente análogo da INH com alta atividade contra *M. tuberculosis in vitro* e sugerem uma investigação mais aprofundada da utilização de sistemas carreadores nanoparticulados tratamento farmacológico da tuberculose pulmonar.

**Palavras-chave:** Tuberculose - Isoniazida - Análogos - PLGA - Nanopartículas - Macrófagos

## ABSTRACT

### EVALUATION OF ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF NANOPARTICLES ENCAPSATING AN ISONIAZID ANALOGUE

The delivery of antitubercular agents carried by nanoparticles is a promising strategy for the treatment of pulmonary tuberculosis. Among the drugs employed in the therapeutic regimens, isoniazid (INH) is the oldest and most used, showing an excellent antimycobacterial activity. However, INH causes adverse effects related to its hepatic and neuronal toxicity, in addition to the rapid development of bacillus resistance mainly due to the low intracellular penetration of the drug. The appearance of resistant strains of *M. tuberculosis* has intensified the research for new therapeutic strategies as well as molecules with antimycobacterial activity. In addition, problems related to the low INH entrapment efficiency in the polymeric nanoparticles require improvement of the pharmaceutical formulation. Thus, the present study aims to develop poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing INH and its analogue, called JVA 001, and the comparative evaluation of the antimycobacterial activities *in vitro*. To obtain nanoparticles, several techniques were tested, such as double-emulsion with solvent nanoprecipitation evaporation and salting-out. Following the establishment of a sterile formulation, the entrapment efficiency and drug content was determined in nanoparticles by a method to quantify INH or JVA 001 using high performance liquid chromatography (HPLC). The average entrapment efficiency obtained with INH was about 21%, while JVA 001 nanoparticles resulted in 61%. The selected formulation allowed submicronic and spherical particles with mean diameter between 182 nm. Images obtained using electron microscopy scanning field emission and atomic force microscopy revealed spherical particles with smooth surfaces. Differential scanning calorimetry curves indicate possible interactions between JVA 001 and the polymer matrix in PLGA nanoparticles. Furthermore, the X-ray diffraction spectrum showed differences in the crystalline structure of the compound synthesized from conjugation of citral group with INH. The antimycobacterial activity of JVA 001 was evaluated *in vitro*, by direct treatment of *M. tuberculosis* cultures H37Rv or intracellular bacteria in a murine macrophage model. Both, free and encapsulated INH significantly reduced viability of *M. tuberculosis* in culture, in a dose and time dependent manner. Although JVA 001 inhibited the mycobacterial growth *in vitro*, nanoparticles containing the analogue

were more effective in controlling mycobacterial growth in macrophages, indicating the potential of polymeric nanoparticles for effective intracellular drug delivery. These results reveal a potent analogue which display high activity against *M. tuberculosis* and suggest further investigation with the use of nanostructured carrier systems in pharmacological treatment of pulmonary tuberculosis.

**Keywords:** Tuberculosis - Isoniazid - Analogues - PLGA - Nanoparticles - Macrophage

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular da isoniazida.....	9
<b>Figura 2</b> - Rota de síntese do análogo da isoniazida, JVA 001 .....	13
<b>Figura 3</b> - Estrutura molecular do PLGA .....	16
<b>Figura 4</b> - Desenho esquemático das diluições seriadas empregadas na avaliação da atividade antimicobacteriana de fármacos livres e nanoencapsulados.....	34
<b>Figura 5</b> - Desenho esquemático das placas de cultura utilizadas nos ensaios de MTT tratadas com diferentes concentrações de fármacos livres e nanoencapsulados. ....	35
<b>Figura 6</b> - Desenho esquemático das placas de cultura utilizadas na avaliação da atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados tratados com diferentes concentrações de fármacos livres e nanoencapsulados.....	38
<b>Figura 7</b> - Curva de calibração de INH obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
<b>Figura 8</b> - Curva de calibração de JVA 001 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
<b>Figura 9</b> - Estruturas moleculares e hidrofobicidade ( $\log P$ ) dos fármacos utilizados no estudo. ....	44
<b>Figura 10</b> - Fotos de lâminas preparadas com amostras de nanopartículas poliméricas observadas através de microscopia óptica. ....	46
<b>Figura 11</b> - Avaliação comparativa da eficiência de encapsulação obtida com as técnicas de nanoprecipitação e <i>salting-out</i> e variação do pH da fase externa.....	47

<b>Figura 12</b> - Teor de fármaco e eficiência de encapsulação de nanopartículas poliméricas contendo isoniazida e JVA 001 obtidas pela técnica de nanoprecipitação. ....	48
<b>Figura 13</b> - Avaliação do tamanho e carga superficial de nanopartículas poliméricas brancas e contendo os fármacos INH e JVA 001. ....	49
<b>Figura 14</b> - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas contendo fármacos, JVA 001 e INH, obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). ....	50
<b>Figura 15</b> - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas brancas e contendo fármacos obtidas através da técnica de microscopia eletrônica por emissão de campo (FEG).....	52
<b>Figura 16</b> - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas contendo fármacos, obtidas através da técnica de Microscopia de Força Atômica. ....	53
<b>Figura 17</b> - Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC) de amostras de PLGA, fármacos livres e nanoencapsulados. ....	55
<b>Figura 18</b> - Espectro de difração de raios-X obtidos a partir de cristais de fármacos. ....	56
<b>Figura 19</b> - Estudo de estabilidade de nanopartículas poliméricas brancas e contendo fármacos, INH e JVA 001. ....	58
<b>Figura 20</b> - Exemplo de placa apresentando resultados do ensaio de MTT.....	59
<b>Figura 21</b> -Avaliação da atividade antimicobacteriana de isoniazida e JVA 001. ....	60
<b>Figura 22</b> - Avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) do crescimento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. ....	62

<b>Figura 23</b> - Macrófagos em cultura infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> corados com Kinyoun. ....	63
<b>Figura 24</b> - Ensaio de morte intracelular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em macrófagos após exposição a diferentes tratamentos .....	64
<b>Figura 25</b> - Avaliação da atividade antimicobacteriana de nanopartículas contendo JVA001 6 dias pós-tratamento com diferentes concentrações de JVA 001 nanoencapsulado.....	65
<b>Figura 26</b> - Avaliação da atividade antimicobacteriana de nanopartículas contendo 100 µg/mL de JVA 001, após 2, 4 e 6 dias de tratamento.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características da isoniazida em relação aos mecanismos de ação e de resistência.....	12
<b>Tabela 2</b> - Condições cromatográficas padronizadas para a determinação de isoniazida e JVA 001 .....	26
<b>Tabela 3</b> - Formulações testadas para a obtenção de nanopartículas poliméricas pela técnica de dupla emulsão. ....	28
<b>Tabela 4</b> - Formulações testadas durante a padronização da técnica de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.....	29
<b>Tabela 5</b> - Áreas dos picos cromatográficos obtidas a partir da análise de soluções-padrão de isoniazida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
<b>Tabela 6</b> - Áreas dos picos obtidas por análise de soluções-padrão de JVA 001 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
<b>Tabela 7</b> - Formulações testadas durante a padronização da técnica de dupla emulsão (a/o/a) com evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas poliméricas contendo isoniazida.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micro molar
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA	Análise de Variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FEG	<i>Field Emission Gun</i>
INH	isoniazida
JVA 001	Hidrazida do ácido 4-piridino carboxílico, 2-(3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ilideno)
MDR-TB	Tuberculose Multiresistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
p/p	Peso por peso
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PLGA	Ácido poli-lático-co-glicólico
PVA	Álcool polivinílico
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão linear
RPM	Rotações por minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TB	Tuberculose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 TUBERCULOSE.....	5
2.1.1 Transmissão.....	6
2.1.2 Diagnóstico.....	6
2.1.3 Tratamento.....	7
2.2 ISONIAZIDA (INH).....	8
2.2.1 Análogos da isoniazida.....	12
2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	13
2.4 ÁCIDO POLI-LÁTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA).....	16
2.5 APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 MATERIAIS.....	23
4.1.1 Matérias-primas.....	23
4.1.2 Solventes e reagentes.....	23
4.1.3 Culturas de células e bactérias.....	24
4.1.4 Equipamentos.....	24
4.2 MÉTODOS.....	25
4.2.1 Análise Cromatográfica.....	25
4.2.2 Preparação da curva de calibração.....	26
4.2.3 Determinação do coeficiente de partição óleo/água (log P).....	26

4.2.4	Obtenção de nanopartículas poliméricas pela da técnica de dupla-emulsão com evaporação do solvente.....	27
4.2.5	Obtenção de nanopartículas pela técnica de <i>salting-out</i> .....	28
4.2.6	Obtenção de nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação.	28
4.2.7	Obtenção de nanopartículas fluorescentes .....	29
4.2.8	Padronização da obtenção de nanopartículas estéreis .....	29
4.2.9	Caracterização Morfológica .....	30
4.2.9.1	Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta ...	30
4.2.9.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
4.2.9.3	Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG) .....	31
4.2.9.4	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	31
4.2.10	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas nanopartículas.....	31
4.2.11	Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	32
4.2.12	Difratometria de raios-X .....	32
4.2.13	Estudos de estabilidade .....	33
4.2.14	Avaliação da atividade antimicobacteriana de nanocarreadores contendo INH e JVA 001 pelo método do MTT.....	33
4.2.15	Obtenção de macrófagos murinos.....	36
4.2.16	Infecção de macrófagos em cultura.....	37
4.2.17	Tratamento de macrófagos infectados.....	37
4.2.18	Avaliação da viabilidade bacteriana em macrófagos infectados .....	39
4.2.19	Análise estatística.....	39

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	41
5.2 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA (LOG P) .....	43
5.3 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE DUPLA EMULSÃO .....	44
5.4 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELAS TÉCNICAS DE NANOPRECIPITAÇÃO E <i>SALTING-OUT</i> .....	46
5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	48
5.5.1 Determinação do tamanho e potencial zeta das nanopartículas	49
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	50
5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo .....	51
5.5.4 Microscopia de força atômica .....	53
5.6 ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	54
5.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.....	56
5.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE .....	57
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE FÁRMACOS NANOENCAPSULADOS.....	59
5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS .....	63
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

A tuberculose (TB) permanece como uma das mais freqüentes e importantes doenças infecciosas, causando morbidade e morte no mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da TB. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de oito a dez milhões de novos casos ocorrem anualmente, e esta incidência tende a aumentar. Neste contexto, a tuberculose é, ao lado da malária e do vírus HIV, uma das três doenças que mais causam morte por um único agente infeccioso, com aproximadamente 2 milhões de mortes por ano (WHO, 2009).

A incidência de tuberculose multiresistente (MDR-TB) aos fármacos utilizados no tratamento (MDR-TB) tem aumentado durante a última década, não somente nos países em desenvolvimento como também em países desenvolvidos. Este reaparecimento global da TB, bem como a rápida emergência de MDR-TB, ressalta a importância do desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose e novos esquemas de tratamento para um controle clínico eficaz em pacientes tratados com a antibióticoterapia padrão (ZHANG & TELENTI, 2000).

Considerando o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose, alguns aspectos da doença são importantes e devem ser considerados, tais como o desenvolvimento de fármacos que apresentam atividade antimicobacteriana com duração prolongada *in vivo*; a descoberta de novos compostos para combater MDR-TB; a erradicação de formas latentes de *M. tuberculosis*, através do emprego de novas classes de fármacos anti-TB, promissoras na prevenção de causadoras de recidiva pacientes infectados de forma latente (TOMIOKA & NAMBA, 2006).

Diante deste quadro, estudos de controle de liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias utilizadas no tratamento, têm sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos. Dentre os vetores mais utilizados incluem-se as micropartículas e sistemas coloidais, como lipossomas e nanopartículas. As nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , constituídas geralmente por polímeros biodegradáveis, e têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade em fluídos biológicos e melhor conservação durante o armazenamento. Estes sistemas têm sido

desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente para administração parenteral, oral e pulmonar (AZARMI et al., 2008).

Em relação à administração oral de nanopartículas, estudos têm se direcionado especialmente para a diminuição dos efeitos colaterais de fármacos que causam irritação de mucosa e aumento da biodisponibilidade e a proteção de fármacos degradáveis como peptídeos, proteínas e hormônios. A administração pulmonar das nanopartículas tendo como objetivo o controle, a liberação e a biodisponibilidade dos fármacos, bem como a diminuição dos efeitos colaterais tem sido objeto de estudo visando melhor administração do tratamento pelos pacientes (SHARMA et al., 2004).

Os métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas são classificados de acordo com técnicas baseadas na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados tais como o ácido poli lático (PLA), o ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA), copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico. O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas ao nível molecular, que será dependente da composição qualitativa e quantitativa das formulações (GOVENDER et al., 1999).

Tendo em vista a urgência na busca por novos fármacos com atividade contra o *M. tuberculosis*, bem como a otimização da administração destes fármacos, o presente estudo teve como objetivo principal a avaliação da atividade antimicobacteriana de um análogo da isoniazida, principal fármaco utilizado no tratamento da TB, assim como aumento da sua atividade antimicobacteriana através do emprego de sistemas poliméricos nanoestruturados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que acomete principalmente os pulmões, podendo disseminar-se para outros órgãos ou tecidos. Apesar do descobrimento do *M. tuberculosis*, principal agente etiológico da doença, ter ocorrido há mais de 100 anos, a TB continua sendo um grave problema saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos.

A doença ativa pode se desenvolver tanto devido a uma infecção recente (TB primária ou doença rapidamente progressiva), quanto à reativação de uma infecção latente, adquirida no passado (PABLOS-MENDÉZ et al., 1998).

Os principais sintomas da TB pulmonar, a forma mais comum da doença, são: tosse inicialmente seca que persiste por mais de três semanas e leva à formação de uma secreção purulenta; perda de apetite e conseqüente emagrecimento; além de cansaço, febre baixa no final da tarde e sudorese noturna (KRITSKI et al., 1998).

A TB mata no mundo aproximadamente 3,0 milhões de pessoas por ano. Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo *M. tuberculosis*, correspondendo a 30% da população mundial, sendo que em países subdesenvolvidos, a estimativa é que 70% da população esteja infectada, com cerca de 2,8 milhões de mortes pela TB e 7,5 milhões de novos casos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma imensa tragédia poderá ocorrer nas próximas duas décadas, com quase um bilhão de pessoas infectadas e mais de 35 milhões de mortes. O Brasil ocupa o 14º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB do mundo. De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, no Brasil existem atualmente cerca de 50 milhões de pessoas infectadas com o bacilo, que não desenvolveram a doença, com contaminação de mais de 1 milhão de pessoas a cada ano pelo contato com os doentes surgem no Brasil, aproximadamente, 111 mil novos casos por ano, ocorrendo 6 mil mortes (WHO, 2009).

### 2.1.1 Transmissão

A TB pode ser transmitida de 3 maneiras: através da inalação de gotículas contendo *M. tuberculosis*; da ingestão de material contaminado, geralmente leite; e da inoculação direta, que ocorre mais freqüentemente entre profissionais da área de saúde. Através da fala, do espirro e principalmente da tosse de doentes com TB pulmonar ativa, ocorre a transmissão pela inalação de *M. tuberculosis*. Gotículas contaminadas são lançadas ao ar, onde as mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão. Somente os núcleos secos destas gotículas (núcleos de Wells), com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares iniciando sua multiplicação (BRASIL, 2002; SMITH & MOSS, 1994).

Os fatores que determinam a probabilidade de transmissão da doença estão relacionados com (i) as características dos focos, que são os doentes pulmonares bacilíferos e dos contatos, que são as pessoas que coabitam com o doente, levando em consideração que a concentração de bacilos eliminada por uma pessoa, é estimada em  $10^2$  a  $10^4$  bacilos por mL de escarro quando há lesões sólidas, mas chega a  $10^7$  a  $10^8$  em caso de lesões cavitárias; (ii) o ambiente e a maneira como ocorrem suas relações, ou seja, a concentração de bacilos no ar, determinada pelo volume do espaço e sua ventilação; (iii) o tempo de exposição e (iv) a condição imune da pessoa exposta (ATS, 2000; TRUJILLO & KRITSKI, 2000).

### 2.1.2 Diagnóstico

Denomina-se “caso de tuberculose” todo o indivíduo com diagnóstico confirmado por baciloscopia ou cultura e aquele em que o médico, com base nos dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firma o diagnóstico de TB (BRASIL, 2002).

A baciloscopia, análise direta do escarro pelo microscópio óptico, é o método básico para o diagnóstico da TB na forma pulmonar. O método de coloração utilizado é denominado Ziehl-Neelsen, no qual as micobactérias apresentam-se como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho sobre fundo azul. É uma metodologia rápida, de fácil execução e baixo custo, disponibilizando ampla cobertura diagnóstica (ATS, 2000). Entretanto, esta técnica não é específica já que cora outras micobactérias, muitas vezes, freqüentes no meio ambiente.

Portanto, a cultura através do isolamento e identificação do bacilo é considerada padrão-ouro para testes diagnósticos, pois proporciona informações quanto à virulência, sensibilidade aos fármacos e outras propriedades biológicas do *M. tuberculosis* que possam servir de informação para estudos epidemiológicos. Em geral a sensibilidade da cultura é de 80-85% e a especificidade é aproximadamente de 98% (ATS, 2000).

### 2.1.3 Tratamento

A TB causada por cepas de *M. tuberculosis* sensíveis aos antibióticos é uma doença curável em mais de 95% dos casos novos, desde que o tratamento adequado seja realizado (DALCOLMO et al., 1995; ISEMAN, 1993). Apesar do Ministério da Saúde do Brasil fornecer gratuitamente os fármacos utilizados no tratamento da doença desde 1971, ainda existem altos índices de morbidade e mortalidade em decorrência da TB no país (VRANJAC, 2010).

Existem diversos fármacos que podem ser utilizados no tratamento da TB, sendo que os primeiros a serem introduzidos foram a estreptomicina (SM), em 1944, ácido *p*-aminossalicílico (PAS), em 1946 e isoniazida (INH), em 1952. Mais recentemente, foram introduzidos a rifampicina (RMP), a pirazinamida (PZA), a etionamida (ETH) e o etambutol (EMB).

O esquema de tratamento recomendado pela OMS é o chamado RHZ de curta duração, isto é, rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z) por 2 meses, seguidos de rifampicina (R) e isoniazida (H) por mais 4 meses (BRASIL, 2002). Esta conduta tem o objetivo de impedir a seleção de cepas resistentes dos bacilos (DALCOMO et al., 1995). Em 1979 a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária / Ministério da Saúde (DNPS/MS) normalizou para todo o país um Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tendo como base um tratamento quimioterápico baseado no esquema RHZ de curta duração, indicado para todas as formas de TB em casos novos da doença (RUFFINO-NETTO, 1999).

Tendo em vista que a resistência primária aos fármacos, que ocorre em pacientes portadores de uma cepa já resistente de *M. tuberculosis*, é relativamente baixa no Brasil, o tratamento utilizado deveria proporcionar uma boa eficácia. Entretanto a deterioração do sistema de saúde pública do país associada à piora nas condições sócio-econômicas da população em décadas passadas resultou em crescentes taxas de abandono do tratamento, principalmente nos grandes centros urbanos. O abandono ou a má realização do tratamento para TB favorecem o desenvolvimento de

resistência secundária ou adquirida, que é aquela onde uma cepa inicialmente susceptível se torna resistente por pressão seletiva, proveniente da utilização incorreta do tratamento farmacológico (DALCOLMO et al., 1995).

O aumento da resistência primária isolada à INH (de 4,4 para 6%) e a resistência à INH associada à rifampicina (de 0,9 para 1,4%) foi observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB, conduzido entre 2007 e 2008, em relação aos resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997. Assim, em 2009, o Ministério da Saúde do Brasil introduziu o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva da TB deve-se a este aumento na taxa de resistência (VRANJAC, 2010).

## 2.2 ISONIAZIDA (INH)

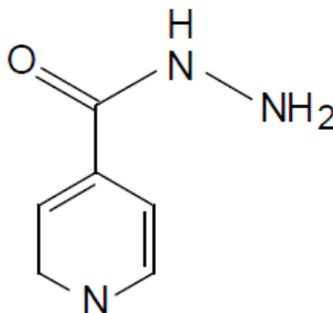
A isoniazida, cuja sigla é INH, consiste na hidrazida do ácido isonicotínico e ainda é considerado o fármaco de primeira escolha para a quimioterapia da TB, desde sua descoberta em 1945, quando pesquisadores relataram a atividade da nicotinamida contra o crescimento do *M. tuberculosis*. Sete anos mais tarde, em 1952, em meio à busca por derivados com maior atividade antimicobacteriana verificaram a excelente atividade antimicobacteriana de um intermediário de síntese, a isoniazida. Sua molécula, representada na figura 1, possui uma das mais simples estruturas químicas já sintetizadas com alta especificidade contra o bacilo causador da TB (VILCHÈZE & JACOBS, 2007).

A INH pertence à classe farmacológica dos antimicrobianos. Tipicamente, fármacos pertencentes a esta classe terapêutica são capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias, devido a uma alta afinidade de ligação à componentes do metabolismo bacteriano, inibindo desta forma a síntese de biomoléculas funcionais ou impedindo a atividade celular normal (ZHANG et al., 2010).

A INH apresenta atividade exclusiva contra micobactérias, especialmente aquelas de crescimento lento. Este fármaco entra na célula através de difusão passiva e age apenas contra bactérias em divisão, não exercendo qualquer efeito sobre micobactérias em fase estacionária ou de crescimento em condições anaeróbicas. Sua ação é bacteriostática nas primeiras 24 horas de tratamento e passa a ser bactericida após este período. A INH age induzindo alterações morfológicas nas micobactérias devido à inibição da síntese de componentes essenciais da parede celular micobacteriana, os ácidos micólicos. Após sua ligação com uma molécula

de NAD, este pró-fármaco é capaz de inibir o alongamento das cadeias graxas que constituem os ácidos micólicos, com cerca de 70 a 90 carbonos, através da ocupação do sítio ativo da enzima enoil-ACP redutase, também chamada de *inhA*. Este complexo possui alta afinidade de ligação à enzima *inhA*, sendo eficaz em baixas doses terapêuticas (VILCHÈZE & JACOBS, 2007).

O MIC para cepas sensíveis compreende-se entre 0,02 e 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (MIDDLEBROOK, 1952). Apresenta em sua estrutura, um anel pirimidina e o grupamento hidrazida, essenciais para sua atividade. Evidências sugerem que este fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular do *M. tuberculosis*, tornando a bactéria susceptível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio (BLANCHARD, 1996; RISKÁ et al., 2000; ROSSETTI et al., 2002).



**Figura 1-** Estrutura molecular da isoniazida

A isoniazida é prontamente absorvida quando administrada por via oral ou parenteral. Antiácidos contendo alumínio podem prejudicar sua absorção. Atinge o pico de concentração plasmática de 3 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 1 a 2 horas da administração oral. Apresenta ampla distribuição pelos tecidos e líquidos corporais, penetra bem no tecido caseoso e sua concentração é inicialmente mais elevada no plasma e no músculo que no tecido infectado, todavia este último retém o fármaco por longo período de tempo, em quantidades bem acima das necessárias para uma ação bacteriostática. Possui volume de distribuição de 0,57 a 0,76  $\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , atravessa a barreira placentária em torno de 90%, sendo excretada no leite cerca de 20% da concentração sérica, já que possui baixa ligação às proteínas plasmáticas, sofre biotransformação hepática, é acetilada pela N-acetil-transferase à N-acetilisoniazida. A seguir é biotransformada ao ácido isonicotínico e monocetilidrazina, sendo este último responsável pela hepatotoxicidade via

formação de um metabólito intermediário reativo ao ser N-hidroxilado (GOODMAN & GILMAN, 2005).

As neoplasias malignas (hepatocarcinomas e colangiocarcinomas) têm sido produzidas experimentalmente com griseofulvina e isoniazida. A meia-vida nos inativadores lentos é de três horas, e de uma hora nos inativadores rápidos. A isoniazida é excretada na urina, uma parte na forma da droga inalterada, e a outra parte na forma acetilada ou inativada (MITCHISON, 1985). A INH pode ser usada por via oral ou intramuscular. A dose para o adulto é de 400 mg diariamente, em crianças é utilizada de 10 a 20mg/kg de peso/dia, devendo ser tomada de preferência 1 hora antes do almoço ou duas horas após (GOODMAN & GILMAN, 2005).

A alteração do pH gástrico provocada pelos alimentos protéicos ou antiácidos pode exercer influência na velocidade da passagem do conteúdo gástrico para o intestino, além de alterar o grau de ionização de eletrólitos presentes no estômago. Antiácidos, especialmente os que contêm hidróxido de alumínio, podem retardar e diminuir a absorção da isoniazida e suas concentrações séricas. Halotano, alimentos como os glicídeos, lipídeos e proteínas estes retardam o esvaziamento gástrico tanto da liberação e na dissolução do fármaco. Todos os tipos de alimentos reduzem a absorção do fármaco, sendo que maior redução da quantidade de fármaco disponível no sangue foi observado após a ingestão de carboidratos. A associação da etionamida à isoniazida aumenta a sua toxicidade ao sistema nervoso central (SNC). Paralelamente, a associação da rifampicina à isoniazida aumenta a sua hepatotoxicidade (KATZUNG, 2005).

Os efeitos indesejáveis da INH dependem da posologia e ocorrem em cerca de 5% dos indivíduos, sendo os mais comuns: hepatite grave, fadiga, fraqueza, mal estar, convulsões, anorexia, náuseas, vômito e neuropatia periférica (devido à excreção urinária aumentada de piridoxina), podendo ser evitada pela ingestão diária de piridoxina de 50 a 100mg

A INH é contra-indicada em casos de hipersensibilidade, ou relatos de hipersensibilidade a fármacos quimicamente relacionados, como etionamida, pirazinamida e ácido nicotínico. Não é recomendado o emprego da INH em pacientes com insuficiência renal e hepática, epilepsia, alcoolismo, lactação e porfiria. Apresenta-se fracamente permeável no estômago tendo como principal via de absorção o intestino. A fraca permeabilidade no estômago pode ser explicada com base na protonação que ocorre no meio ácido, devido ao fármaco constituir uma base fraca (GOODMAN & GILMAN, 2005).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica do *Food and Drug Administration* (FDA, 2006), a isoniazida é um fármaco de classe I ou III, em virtude de sua alta solubilidade, mas permeabilidade e absorção pouco conclusivos.

A resistência à INH parece estar associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam para catalase-peroxidase (*katG*) (ZHANG et al., 1992), a enzima enoyl-ACP redutase envolvida na biossíntese do ácido micólico (*inhA*) (BANERJEE et al., 1994), a alquil hidroperóxido redutase envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*) (WILSON & COLLINS, 1996) e a enzima  $\beta$ -ketoacil ACP sintetase (*kasA*) (MDLULI et al., 1998).

Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação do fármaco, relacionado ao gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC* e (iii) bloqueio da biossíntese do ácido micólico (*inhA* e *mabA*) (ZHANG & TELENTI, 2000).

A ocorrência de mutações, associadas com resistência, nos genes *katG* e *inhA* são encontradas em 75-85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco. Essas mutações freqüentemente estão associadas com a diminuição da atividade de catalase-peroxidase (ALTAMIRANO et al., 1994; MUSSER, 1995). Esta enzima é responsável também pela ativação da INH endogenamente. A enzima *inhA* (enoyl-ACP redutase) que catalisa uma etapa primária na síntese de ácido graxo, quando alterada em consequência da mutação no gene modifica a sua afinidade pelo cofator, resulta na expressão de um fenótipo resistente à INH. As mutações em *ahpC* foram identificadas em isolados clínicos desse microrganismo e estão localizadas em importantes regiões promotoras do gene. Uma pequena proporção de cepas resistente não apresenta mutações nos genes *katG*, *inhA* ou *ahpC*, indicando que outros genes estão envolvidos com a resistência à isoniazida (KELLEY et al., 1997).

Em um estudo nacional realizado em 2003, SILVA e colaboradores constataram que 75% dos isolados analisados apresentaram mutações no gene *katG*, sendo o códon 315 o mais freqüente. Na região promotora do gene *ahpC*, as mutações ocorreram em 14% dos isolados. Para o gene *inhA*, apenas 1% dos isolados, apresentaram mutações. Também foi observado que 6,2% dos isolados apresentaram mutações nos genes *katG* e *ahpC*, simultaneamente.

**Tabela 1 - Características da isoniazida em relação aos mecanismos de ação e de resistência.**

<b>isoniazida</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Alvo molecular</b>	<b>Genes envolvidos e função</b>
Descoberta em 1952	Inibição da síntese de	Enzima responsável	<i>katG</i> : conversão pró-fármaco
Bactericida: atua em bacilos ativos	ácidos micólicos	por síntese de ácido micólico	<i>inhA</i> : alvo do fármaco <i>ahpC</i> : marcador resistência <i>kasA</i> : alvo do fármaco

### 2.2.1 Análogos da isoniazida

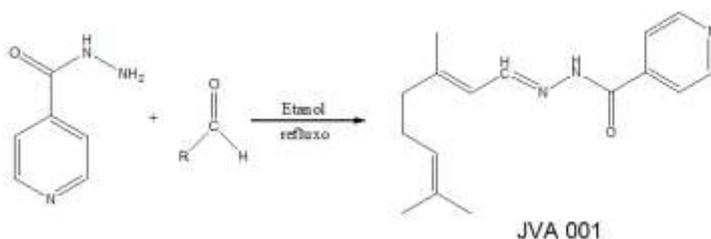
Atualmente, análogos condensados com grupamentos já conhecidos têm sido sintetizados com uma gama de fármacos já conhecidos a isoniazida. Há muito tem se estudado a respeito da bioquímica e mecanismo de ação da isoniazida, fármaco utilizado no tratamento da TB há mais de 50 anos, tornando-se o agente antimicobacteriano mais estudado nos últimos anos, principalmente devido ao reaparecimento global da tuberculose e ao alarmante aumento no número de isolados clínicos apresentando resistência ao fármaco ou aumento de virulência (MDLULI et al., 1998).

A compreensão das complexas interações entre o patógeno e o hospedeiro e os agentes antimicrobianos, além dos casos de resistência relatados na literatura, indicam a alta eficácia da terapia combinada, pois a concentração plasmática de fármacos no hospedeiro precisa ser mantida suficientemente alta restringir a o crescimento de subpopulações mutantes e multiresistentes de bactérias (MITCHISON & NUNN, 1986). Na prática, os fármacos utilizados em terapias combinadas são mais eficazes quando atingem concentrações séricas que permitem a restrição desta amplificação, concomitantemente a uma baixa toxicidade. Avanços nestas importantes características do fármaco podem possibilitar o encurtamento da duração dos regimes terapêuticos (GILLESPIE, 2002).

Há um crescente número de evidências sobre o efeito de características moleculares determinantes no aumento da biodisponibilidade de fármacos com o potencial supressor do aumento da resistência antimicobacteriana, e que a eficácia de fármacos pode ser aumentada devido a este aumento nas concentrações plasmáticas, mesmo contra

organismos resistentes (ZHANG & TELENTI, 2000). Além disso, a afinidade das interações químicas entre o fármaco e a parede micobacteriana consistem em um importante objeto de estudo no desenvolvimento de novos análogos ativos contra o *M. tuberculosis* (BRENNAN, 1995).

A conjugação de grupamentos hidrofóbicos, particularmente aqueles derivados de compostos aromáticos, tem sido bem empregada, demonstrando bons resultados de atividade antimicobacteriana. Portanto, estes análogos continuam atraindo a atenção de químicos medicinais até os dias atuais (HEARN et al., 2009).



**Figura 2** - Rota de síntese do análogo da isoniazida, JVA 001

Dados ainda não publicados demonstram que o composto sintetizado a partir da conjugação do grupamento citral à molécula de isoniazida, denominado JVA 001 (ALMEIDA e colaboradores, manuscrito em preparação).

### 2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As primeiras nanopartículas elaboradas segundo um método de polimerização foram desenvolvidas por BIRRENBACH & SPEISER em 1976, mas, apesar do interesse inicial pela técnica, sua utilização na terapêutica foi bastante limitada devido à lenta velocidade de degradação desses sistemas.

O princípio da vetorização de medicamentos está fundamentado no tamanho, características físico-químicas, estabilidade e citotropismo do princípio ativo e na composição dos fluidos biológicos, monitorada pelas características do veículo. Nanocarreadores de fármacos oferecem diversas vantagens com relação às formas farmacêuticas convencionais. Devido ao

reduzido tamanho das partículas, elas podem ser administradas em vias de administração especiais, como é o caso da via pulmonar e podem ser úteis para liberação controlada do princípio ativo em órgãos específicos ou sítios alvos do organismo.

O direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação desejado poderá não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade do fármaco a ser administrado para obtenção da resposta biológica, minimizando com isso efeitos colaterais indesejáveis (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Nanopartículas poliméricas têm sido utilizadas com sucesso para grande variedade de fármacos, destacando-se entre eles os antibióticos, anticancerígenos, antiinflamatórios, analgésicos, vacinas e substâncias biologicamente ativas devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. A encapsulação de fármacos antimicrobianos nestes carreadores poliméricos previne a degradação da substância ativa, preservando sua atividade biológica. Além disso, características aerodinâmicas das nanopartículas favorecem a administração de fármacos pela via pulmonar (PANDEY et al., 2005).

Nanopartículas podem ser definidas como dispersões coloidais ou partículas sólidas, com tamanho entre 10-1000 nm, onde um fármaco encontra-se dissolvido, associado, encapsulado ou ligado a uma matriz nanoestruturada. Dependendo de fatores como método de preparação e composição, é possível a obtenção de sistemas estruturalmente diferentes, chamados nanoesferas ou nanocápsulas. Nanocápsulas são sistemas vesiculares heterogêneos em que o fármaco encontra-se confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa, a qual encontra-se envolvida por uma única membrana polimérica. As nanoesferas, por sua vez, são sistemas matriciais homogêneos constituídos por uma rede polimérica em que o fármaco se encontra dissolvido, distribuído na forma de cristais ou adsorvido na superfície das partículas (KOMMAREDDY et al., 2007).

Dentre as inúmeras vantagens do uso de nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos, podemos citar (i) o tamanho e as características de superfície das partículas que podem ser modulados para uma determinada via de administração ou tecido alvo, (ii) a possibilidade de controlar a liberação do fármaco, sendo este liberado apenas no local alvo, com conseqüente aumento do efeito terapêutico e redução dos efeitos colaterais, (iii) as características de degradação e liberação das partículas podem ser moduladas através da escolha dos constituintes da matriz, (iv) os sistemas podem ser utilizados através de muitas vias de administração

incluindo oral, nasal, parenteral e intra-ocular e tópica (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Os métodos de preparação de nanopartículas podem ser divididos em três principais grupos: polimerização de monômeros, dispersão de polímeros pré-formados e coacervação ou gelificação iônica. Nanopartículas biodegradáveis podem ser preparadas através de vários métodos, e as técnicas mais utilizadas são a dupla emulsão com evaporação do solvente, secagem por spray e a nanoprecipitação (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Considerando as limitações das técnicas de polimerização, foram propostos métodos de preparação de nanopartículas usando polímeros pré-formados, como por exemplo, os poliésteres. Dentre eles, estão a poli-ε-caprolactona (PECL), poli-ácido láctico (PLA) e copolímeros como o ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA). Estes métodos baseiam-se na formação de emulsões de uma solução orgânica de polímero em uma fase aquosa ou na precipitação espontânea do polímero sem nenhum processo de emulsificação (CALVO et al., 1995).

A técnica de nanoprecipitação ou nanodeposição do polímero pré-formado consiste na precipitação do polímero após adição de uma solução orgânica do mesmo, em um não solvente como a água. A utilização de solventes orgânicos hidromiscíveis, tais como a acetona e o etanol, conduz à difusão rápida e espontânea do mesmo na água, gerando uma turbulência interfacial entre as duas fases (SOPPIMATH et al., 2001), que resulta na formação espontânea e imediata de nanopartículas. A adição de um óleo à solução orgânica do polímero resulta na formação de nanocápsulas, devido à deposição do polímero na interface entre o óleo e a água da emulsão formada. As partículas formadas por este método apresentam um tamanho de partícula reduzido. Esta metodologia permite a encapsulação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, mediante sua dissolução prévia na fase orgânica da formulação (FESSI et al., 1989; CALVO et al., 1995).

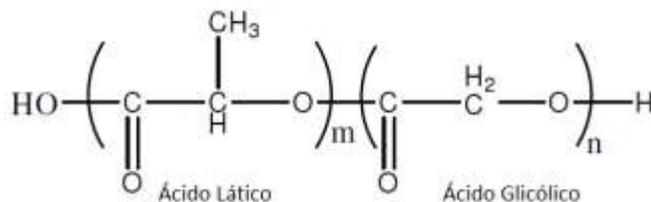
Em contrapartida, o método da dupla emulsão apresenta-se bastante adequado para a nanoencapsulação de fármacos de caráter hidrofílico. O método consiste na preparação de uma emulsão primária a/o, através da sonicação de um pequeno volume de água contendo o fármaco e um solvente orgânico contendo o polímero. Esta emulsão consiste na fase interna da segunda emulsão, também preparada por sonicação, cuja fase externa é uma solução aquosa do tensoativo. A preparação das formulações de nanopartículas por este método requer a presença de um agente emulsificante para estabilizar a fase dispersa em uma emulsão múltipla. O

agente emulsificante, neste caso, é requerido para prevenir a agregação e a coalescência das partículas. Dentre os tensoativos utilizados na preparação de sistemas nanoestruturados estão o álcool polivinílico, metilcelulose, polissorbato 80, dodecil sulfato e poloxâmero (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

#### 2.4 ÁCIDO POLI-LÁTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis têm tido extensiva aplicação na clínica, dentre elas a liberação controlada de fármacos. O primeiro sistema de liberação polimérico foi desenvolvido por LANGER & FOLKMAN em 1976.

Polímeros biodegradáveis sintéticos ganharam mais popularidade do que polímeros biodegradáveis naturais polímeros. As principais vantagens dos polímeros sintéticos incluem elevado grau de pureza do produto, maior uniformidade do lote e ausência de imunogenicidade. Durante os últimos 30 anos, diversos polímeros biodegradáveis foram sintetizados. A maioria deles possuem ligações lábeis em sua cadeia, como ésteres, orto-ésteres, anidridos, carbonatos, amidas e uretanos. Dentre as diferentes classes de polímeros biodegradáveis, o termoplástico alifático poli (ésteres), tais como ácido poli-lático) (PLA) e copolímero de ácido glicólico poli-lático (PLGA) são os mais comumente usado como carreadores de fármacos, devido às suas excelentes biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica (ATHANASIOU et al., 1996).



**Figura 3** - Estrutura molecular do ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA)

Polímeros selecionados para a administrações de fármacos devem preencher os requisitos de biocompatibilidade, compatibilidade com o fármaco, cinética de biodegradação adequada, propriedades mecânicas que conferem uma estrutura razoavelmente rígida, podendo ser utilizados como dispositivo de liberação de fármacos. Dentre os polímeros sintéticos estudados para esta finalidade, o PLGA tem gerado muito interesse devido

às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade (LI, 1999).

Polímeros biodegradáveis como o PLGA degradam-se por hidrólise não enzimática de seus grupamentos éster em fluidos corporais. Os produtos de degradação (ácido lático e glicólico) são compostos metabólicos. Por esta razão, PLA e PLGA foram aprovados pelo *FDA* para a liberação de fármacos nos Estados Unidos (GÖPFERICH, 1996).

A biodegradação do PLGA ocorre por meio da cisão aleatória das cadeias hidrolíticas do polímero. A erosão do polímero em dispositivos de liberação é ocasionada pela degradação de fragmentos poliméricos solúveis em água, acompanhado por uma perda de peso progressiva da matriz e liberação gradativa do fármaco através de difusão. As características físicas e químicas do PLGA, tais como peso molecular, temperatura de transição vítrea e proporções de co-polímeros são cruciais para o comportamento de biodegradação dos polímeros e cinética de liberação de fármacos incorporados na matriz (GÖPFERICH, 1996).

O perfil de biodegradação do PLGA pode ser influenciado por suas propriedades físico-químicas ou dos fármacos encapsulados na matriz polimérica. Em geral, a taxa de degradação do PLGA diminui com a diminuição de 1) peso molecular do polímero (PARK, 1994), 2) cristalinidade inicial (LI et al., 1999), 3) a relação lático / copolímero de ácido glicólico (OGAWA et al., 1998); 4) A temperatura de transição vítrea, 5 hidrofiliidade) do polímero O aumento da taxa de degradação com a incorporação de compostos ácidos ou básicos (BODMEIER et al., 1989). Nanopartículas à base de polímeros biodegradáveis têm sido amplamente estudados como sistema de entrega de liberação controlada durante as últimas três décadas. Nos últimos anos, um contínuo interesse em nanopartículas de PLGA foi provocado pela sua aplicação para o controle da liberação de drogas macromoleculares.

## 2.5 APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

As manifestações da tuberculose são observadas principalmente no sistema respiratório, assim o desenvolvimento de uma forma farmacêutica pulmonar por inalação é almejado, uma vez que direciona o tratamento para o local da infecção onde são encontrados os macrófagos alveolares, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos (PANDEY & KHULLER, 2005). Nesse sentido, diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de otimizar diferentes aspectos tecnológicos, utilizando vetores como as nanopartículas e fármacos anti-tuberculose para a administração pulmonar (GILL et al., 2007, AZARMI et al., 2008; SHAM et al., 2004).

Em 2003, PANDEY e colaboradores desenvolveram nanopartículas nebulizadas de PLGA contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida. Nesse estudo foi observado que fármacos encapsulados, administrados via pulmonar, apresentaram uma maior biodisponibilidade quando comparados com a administração oral.

O uso de nanopartículas como carreadores de fármacos para a via pulmonar vem demonstrando ser uma estratégia bastante promissora tanto para fármacos hidrofílicos como lipofílicos (SHARMA et al., 2004, BILATI et al., 2005, PELTONEN et al., 2004).

Os maiores desafios no desenvolvimento de nanopartículas para a deposição nos pulmões incluem: (1) as características das partículas inaladas, tais como tamanho, distribuição, forma, carga elétrica, densidade, higroscopicidade e (2), a anatomia das vias respiratórias, e (3) padrões respiratórios, tais como frequência, volume corrente e fluxo. Desses fatores, o tamanho das partículas de aerossol e distribuição de tamanho são os mais influentes sobre a deposição de aerossol nos pulmões. O tamanho das partículas é um fator crítico que afeta o local de sua deposição, pois determina os mecanismos de funcionamento e grau de penetração nos pulmões tamanho do aerossol é freqüentemente expressa em termos de diâmetro aerodinâmico (dC) (ZAINUDIN, 1993).

O diâmetro aerodinâmico é definido como o diâmetro equivalente de uma partícula esférica de densidade de uma unidade com a mesma velocidade de sedimentação de uma corrente de ar como a partícula em questão (SCHLESINGER, 1985). Assim, as partículas que possuem densidade superior a unidade terão diâmetros reais menores do que seu diâmetro aerodinâmico. Por outro lado, partículas com menor densidade

unidade terão diâmetro geométrico maior do que seu diâmetro aerodinâmico.

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular um análogo hidrofóbico da isoniazida, JVA 001 (hidrazida do ácido 4-piridino carboxílico, 2-(3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-Ilideno), e avaliar a atividade antimicobacteriana destes compostos *in vitro*.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do análogo hidrazida do ácido 4-Piridino Carboxílico, 2-(3,7-Dimetil-2,6-octadieno-1-Ilideno) quanto suas propriedades físico-químicas;
- Desenvolvimento e caracterização de nanoesferas poliméricas incorporando o análogo hidrazida do ácido 4-Piridino Carboxílico, 2-(3,7-Dimetil-2,6-octadieno-1-Ilideno);
- Avaliação da atividade antimicobacteriana das nanopartículas desenvolvidas em cultura bacteriana, cepa de referência do *M. tuberculosis* H37Rv, e macrófagos murinos infectados com o bacilo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Matérias-primas

- Isoniazida - ácido 4-piridinocarboxílico hidrazina (Sigma-Aldrich);
- O JVA 001, ácido 4-piridinocarboxílico 2-(3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ilideno) hidrazida, foi sintetizado por Almeida e colaboradores (dados ainda não publicados);
- PLGA - ácido Poli(D,L-lático-co-glicólico) 50:50 Resomer RG 502H (Boehringer Ingelheim);
- PVA - álcool polivinílico, com peso molecular 31,000 kDa; grau de polimerização 630 parcialmente hidrolizado (86,7 - 88,7%) (Sigma-Aldrich);
- Monooleato de sorbitano (Span 80, Beraca - São Paulo);
- Monooleato de sorbitano polioxietilenado (Tween 80, Delaware – Porto Alegre).

### 4.1.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes, com exceção daqueles utilizados na análise por CLAE, possuíam grau de pureza para análise (p.a).

- Ácido fosfórico 85% (ACS<sup>®</sup>);
- Ácido clorídrico (Merck<sup>®</sup>);
- Água Milli-Q (Sistema de Água Ultrapura - Milli-Q Plus - Millipore<sup>®</sup>);
- Acetona (Vetec<sup>®</sup>);
- Acetonitrila para CLAE (Tedia<sup>®</sup>);
- Carbonato de cálcio (Synth<sup>®</sup>);
- Cloreto de cálcio dihidratado (Vetec<sup>®</sup>);
- Cloreto de magnésio hexahidratado (Synth<sup>®</sup>);
- Cloreto de potássio (Vetec<sup>®</sup>);
- Cloreto de sódio (Vetec<sup>®</sup>);
- Hidróxido de sódio (Merck<sup>®</sup>);
- Fosfato de potássio monobásico (Merck<sup>®</sup>);
- Saponina purificada (Vetec<sup>®</sup>);
- MTT – Metil Tiazol Tetrazólio (Amresco<sup>®</sup>);
- DMSO – Dimetilsulfoxido (Merck<sup>®</sup>);
- SDS - Dodecil sulfato de sódio (Nuclear<sup>®</sup>);
- DMF - N<sub>1</sub>N-dimetilformamida (pH 4.7);

- Meio DMEM (LGC<sup>®</sup> Biotecnologia);
- Meio LJ - Löwenstein-Jensen (Laborclin<sup>®</sup>);
- Meio líquido Middlebrook 7H9 Broth (Difco<sup>®</sup>);
- Meio líquido Middlebrook 7H10 Broth (Difco<sup>®</sup>);
- Enriquecimento OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) (Difco<sup>®</sup>);
- Soro fetal bovino (Hyclone<sup>®</sup>).

#### 4.1.3 Culturas de células e bactérias

As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios *in vitro* foram provenientes do LACEN – SC e cultivadas durante 28 dias em meio LJ.

- Material cirúrgico;
- PBS estéril;
- Antibióticos Estreptomicina (10.000ug/mL) / Penicilina (10.000U/mL) Difco<sup>®</sup>;
- Tubos Falcon de 15 e 50 mL (TRP<sup>®</sup>);
- Placas de 6, 24 e 96 poços (TRP<sup>®</sup>);
- Tripsina/EDTA 0,05% (cat. no. 25300-054; Gibco<sup>®</sup>);
- Microtubos de 0,6; 1,5 e 2,0 mL;
- Placas de Petri;
- *Swab* estéreis;
- Criotubos.

#### 4.1.4 Equipamentos

- Agitador magnético (Biomixer<sup>®</sup> 78HW-1);
- Analisador térmico (Shimadzu<sup>®</sup> DSC-60);
- Balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup> AUW220D);
- Centrífuga Mini-Spin (Eppendorf<sup>®</sup>);
- Centrífuga (Eppendorf<sup>®</sup>);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu<sup>®</sup>, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP;
- Difrátômetro X'Pert Pro (Panalytical<sup>®</sup>);
- Espectrofotômetro F 4500 (Hitachi<sup>®</sup>);
- Fluxo laminar (Veco<sup>®</sup>);
- Fluxo laminar (Trox<sup>®</sup>);
- Ponta de ultrassom (Unique<sup>®</sup>);
- Rotaevaporador (Quimis<sup>®</sup>)

- Liofilizador (Terroni<sup>®</sup>);
- pHmetro (Quimis<sup>®</sup>);
- Microscópio óptico Olympus<sup>®</sup> DP72 acoplado à câmera digital;
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV;
- Microscópio eletrônico de emissão de campo JEOL JSM-6701F;
- Incubadora Innova CO-170 (New Brunswick Scientific<sup>®</sup>);
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments<sup>®</sup>);
- Unidade de filtração Millex AA 0,8 um (Millipore<sup>®</sup>);
- Nanosurf<sup>®</sup> easyscan 2;
- Leitor de placas TECAN<sup>®</sup> Infinite M200;
- Ultracentrífuga Primac CR 20B2 (Hitachi<sup>®</sup>);
- Vórtex (Gilson<sup>®</sup>).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Análise Cromatográfica

A metodologia de quantificação de fármacos utilizada neste trabalho foi desenvolvida empregando cromatografia líquida de alta eficiência, adaptada de BHUTANI et al., 2007.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VP e *workstation* Class-VP, utilizando sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas estão resumidas na tabela 2. A coluna cromatográfica utilizada foi Luna C-18 (250 x 4,6 mm ID, 5 mm; Phenomenex, USA). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila e tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 3,5 em diferentes proporções, conforme o fármaco a ser quantificado, utilizando fluxo de 1,0 mL por minuto. O volume de injeção de 20 µL e detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 261 nm.

**Tabela 2** - Condições cromatográficas padronizadas para a determinação de isoniazida e JVA 001

<b>Parâmetro</b>	<b>isoniazida</b>	<b>JVA 001</b>
Coluna	C <sub>18</sub> (250x4,6 mm)	C <sub>18</sub> (250x4,6 mm)
Granulometria	5 µm	5 µm
Fase móvel	Acetonitrila:tampão* (10:90)	Acetonitrila:tampão* (35:65)
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Deteção	261 nm	261 nm
Temperatura	25 °C	25 °C
Volume de injeção	20 µL	20 µL

\* Tampão fosfato de potássio monobásico pH=3,5

#### 4.2.2 Preparação da curva de calibração

Dez miligramas de fármaco, isoniazida ou JVA 001, foram dissolvidos em 10 mL de DMSO em balão volumétrico. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com fase móvel. Esta solução foi diluída para obter soluções-padrão de fármacos nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 µg/mL. As soluções-padrão foram quantificadas por CLAE, conforme parâmetros cromatográficos descritos anteriormente. As soluções foram analisadas em triplicata e as médias das áreas dos picos cromatográficos referentes a cada concentração foram plotadas em um gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram calculados pela análise da regressão linear a partir dos valores médios de três curvas de calibração obtidas em dias diferentes.

#### 4.2.3 Determinação do coeficiente de partição óleo/água (log P)

O coeficiente de partição óleo em água foi determinado utilizando-se diclorometano como fase orgânica (óleo), segundo metodologia descrita por MEHTA e colaboradores em 2007. Foram transferidos 2,0 mg de fármaco, INH ou JVA 001, para microtubos de 2,0 mL. A

seguir, os fármacos foram solubilizados em 1,0 mL de água e 1,0 mL de diclorometano. A mistura foi homogeneizada, com auxílio de vórtex, durante 5 minutos e centrifugada por 1 hora a 3000 RPM. Após centrifugação, 200  $\mu$ L da fase orgânica e 200  $\mu$ L da fase aquosa foram retirados e as soluções foram analisadas por CLAE, utilizando as condições cromatográficas descritas anteriormente. As concentrações dos fármacos foram determinadas em cada uma das fases, e o coeficiente de partição óleo/água foi determinado segundo a equação:

$$\log P = \frac{C_o}{C_a \cdot r} \quad \text{onde } C_o = \text{concentração de fármaco na fase orgânica}$$

$C_a$  = concentração de fármaco na fase aquosa

$r$  = razão dos volumes entre fase orgânica/aquosa

#### **4.2.4 Obtenção de nanopartículas poliméricas pela da técnica de dupla-emulsão com evaporação do solvente**

A primeira técnica utilizada para a obtenção das nanopartículas foi a dupla emulsão com evaporação do solvente, adaptada de PANDEY et al., 2003 e SHARMA et al., 2004.

Para obtenção das nanopartículas pela técnica de dupla emulsão, o fármaco foi solubilizado em 1,0 mL de água e homogeneizado com o auxílio de vórtex. Esta solução aquosa ( $a_1$ ) foi incorporada em uma fase orgânica ( $o_1$ ) contendo 100,0mg de PLGA dissolvidos em 9,0 mL de diclorometano e sonicada durante 30 segundos, usando ponta de ultrassom a potência de 50W. Esta emulsão primária ( $a/o$ ) foi novamente emulsificada com 2,0 mL de solução de PVA 1% usando 2 ciclos de 30 segundos a 50W. Em seguida, essa emulsão foi transferida para uma solução de PVA 0,3% e agitada magneticamente por 20 minutos. Após isso, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o volume final foi ajustado para 10,0 mL. A suspensão final de nanopartículas foi filtrada através de membrana celulósica de 0,8  $\mu$ m. Por fim, foram testadas diferentes relações fármaco:polímero afim de buscar o aumento da eficiência de encapsulação. Os testes iniciais foram realizados encapsulando a isoniazida. Diversas proporções fármaco:polímero foram testadas, conforme apresentado na tabela 3, a seguir.

**Tabela 3** - Formulações testadas para a obtenção de nanopartículas poliméricas pela técnica de dupla emulsão.

Fórmula	[INH] (mg)	PLGA (mg)	Relação fármaco: Polímero	DCM (mL)	Sol. PVA 1%
<b>F1</b>	20	100	1:5	9,0	15,0
<b>F2</b>	40	100	2:5	9,0	15,0
<b>F3</b>	60	100	3:5	9,0	15,0
<b>F4</b>	90	100	4,5:5	9,0	15,0
<b>F5</b>	120	100	6:5	9,0	15,0

DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico; PLGA: ácido polilático-co-glicólico

#### 4.2.5 Obtenção de nanopartículas pela técnica de *salting-out*

Para obtenção das nanopartículas pela técnica de dupla emulsão com *salting out*, adaptou-se a metodologia descrita por SONG et al., 2008. A isoniazida foi solubilizada em 1,0 mL de água e homogeneizada com o auxílio de vórtex. Esta solução aquosa ( $a_1$ ) foi incorporada em uma fase orgânica ( $o_1$ ) contendo 100,0 mg de PLGA dissolvidos em 9,0 mL de diclorometano e sonicada durante 30 segundos, usando ponta de ultrassom a potência de 50W. Esta emulsão primária ( $a/o$ ) foi novamente emulsificada com 2,0 mL de solução de PVA 1% usando 2 ciclos de 30 segundos a 50W. Em seguida, essa emulsão  $a/o/a$  foi adicionada em solução de PVA 0,3% contendo diferentes concentrações de  $CaCl_2$ , e agitada magneticamente por 20 minutos. Após esta etapa, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o volume final foi ajustado para 10,0 mL. A suspensão final de nanopartículas foi filtrada através de membrana celulósica de 0,8  $\mu m$ . Por fim, foram testadas diferentes relações fármaco:polímero afim de buscar o aumento da eficiência de encapsulação. Os testes foram realizados encapsulando a isoniazida, com diversas proporções de fármaco:polímero.

#### 4.2.6 Obtenção de nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação

A metodologia para obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação foi adaptada a partir de técnicas descritas por BILATI et al., 2005. Para obtenção das nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação, o fármaco foi solubilizado em etanol e

homogeneizada com o auxílio de vórtex. Esta solução de fármaco foi incorporada em uma fase orgânica contendo 45,0 mg de PLGA dissolvidos em 3,0 mL de diclorometano e homogeneizada com o auxílio de vórtex durante 1 minuto. Esta mistura foi emulsificada com 10,0 mL de solução aquosa de PVA a 1%, através de sonicação a 50 W durante 3 minutos. Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o volume final foi ajustado para 10,0 mL. A suspensão final de nanopartículas foi filtrada através de membrana celulósica de 0,8  $\mu\text{m}$ . Diversas proporções fármaco:polímero foram testadas, conforme apresentado na tabela 4.

**Tabela 4** - Formulações testadas durante a padronização da técnica de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.

Fórmula	[INH] (mg)	Etanol (mL)	PLGA (mg)	Relação fármaco:polímero	DCM (mL)	PVA 1% Sol. Aquosa
<b>F6</b>	10	2,0	30	1:3	3,0	10,0
<b>F7</b>	10	3,0	30	1:3	3,0	10,0
<b>F8</b>	10	2,0	45	1:4,5	3,0	10,0
<b>F9</b>	10	3,0	45	1:4,5	3,0	10,0

**DCM:** diclorometano; **PVA:** álcool polivinílico; **PLGA:** ácido polilático-co-glicólico.

#### 4.2.7 Obtenção de nanopartículas fluorescentes

Nanopartículas fluorescentes foram obtidas através da técnica de nanoprecipitação, com adaptações. Cerca de 10,0 mg de fármaco foram transferidos para um tubo Falcon contendo 2,0 mL de etanol. A seguir, foram adicionados à solução de fármaco 5 mg de fluoresceína sódica (FITC), sob agitação. Posteriormente essa solução foi misturada em uma suspensão de 45,0 mg de PLGA (50:50, 502H) e solubilizados em 3,0 mL de diclorometano. Com o auxílio da ponta de ultrassom a 50W durante três minutos, essa solução foi emulsificada em uma solução aquosa de PVA a 1%. Em seguida, o solvente da emulsão foi eliminado através de rotaevaporação a 60 °C. Por fim, o volume final da suspensão de nanopartículas foi ajustado para 10,0 mL.

#### 4.2.8 Padronização da obtenção de nanopartículas estéreis

A padronização da obtenção de nanopartículas estéreis para o tratamento das culturas de células ocorreu conforme a técnica de nanoprecipitação, realizada em condições estéreis. A quantidade de

fármaco padronizada em 10,0 mg, foram solubilizados em 2,0 mL de etanol e homogeneizado com 3,0 mL de fase orgânica, contendo o polímero. Esta solução foi adicionada em uma fase aquosa contendo PVA 1% (p/v) previamente filtrada em membrana 0,22 $\mu$ m. Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar. O excesso de solvente foi removido através de rotaevaporação e o volume final ajustado para 10,0 mL. A suspensão final foi centrifugada e o *pellet* contendo as nanopartículas foi lavado três vezes com água para injeção. As partículas foram acondicionadas a -20 °C. Nanopartículas sem fármaco, também chamadas de placebo ou nanopartículas brancas, foram produzidas empregando a mesma técnica de preparação, com exceção da adição de fármaco na fase aquosa.

#### 4.2.9 Caracterização Morfológica

As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas quanto à sua morfologia, tamanho e características superficiais. Essas características foram avaliadas através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura simples, por emissão de campo e de força atômica. Os protocolos de obtenção das imagens estão descritos detalhadamente a seguir.

##### 4.2.9.1 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

O diâmetro médio das nanopartículas poliméricas obtidas foi determinado pela técnica de espectroscopia de correlação fotônica. Suspensões de nanopartículas e contendo fármaco, isoniazida e JVA 001, foram diluídas em água milli-Q e analisadas em Nanozetalyzer<sup>®</sup>, a 25 °C. O índice de polidispersão foi determinado sob as mesmas condições.

A carga superficial foi avaliada a partir da medida da mobilidade eletroforética por anemometria laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm das partículas através da determinação do potencial zeta ( $\xi$ ) em aparelho Nanozetalyzer<sup>®</sup>. As nanopartículas foram resuspendidas em água milli-Q a 25 °C.

##### 4.2.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi analisada utilizando microscópio eletrônico de varredura do LCME - UFSC. As amostras foram fixadas em um suporte metálico e submetidas à metalização através do recobrimento com ouro, sob vácuo. A visualização foi

realizada em aumentos de 300 a 1.000 vezes, com uma voltagem de excitação de 5 a 15 kV.

#### **4.2.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG)**

A fim de se obter uma maior ampliação de imagem e evitar a degradação das nanopartículas, foram realizadas também eletromicrografias através da técnica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun*). Esta técnica permitiu ampliação de imagem na ordem de 220.000 vezes, e foi realizada no LCME - UFSC.

#### **4.2.9.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Micrografias foram obtidas através da técnica de microscopia de força atômica (MORRIS *et al.*, 2001), utilizando-se o equipamento Nanosurf<sup>®</sup> easyscan 2, em modo de contato (varredura). A ponta utilizada foi ContAl-G com frequência de ressonância de 13 kHz e constante de mola  $k = 0,2$  N/m. A velocidade de varredura foi de 1,4 s por linha e o número de pontos (resolução da imagem) foi 512 pixel.

#### **4.2.10 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas nanopartículas**

A eficiência de encapsulação (EE%) foi estimada por CLAE, conforme já descrito anteriormente. O sobrenadante, constituído pela fase aquosa contendo o fármaco não encapsulado, foi separado do *pellet* contendo o fármaco encapsulado em nanopartículas através de ultracentrifugação a  $30,9 \times g$  a  $4$  °C durante 1 hora. As concentrações de fármaco livre e encapsulado foram determinadas no sobrenadante e no *pellet*, respectivamente.

O teor de fármaco nas nanopartículas foi expresso em micrograma de fármaco por miligrama de nanopartículas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Cerca de 18,3 mg de nanopartículas foram exatamente pesados e transferidos para um tubo Falcon de 5 mL, dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido e sonicadas durante 20 segundos a 20 W. Esta solução foi mantida em banho-maria a  $37$  °C durante 30 minutos, e diluída 100 vezes em fase móvel antes de ser injetada no cromatógrafo.

As soluções foram injetadas em triplicata e a concentração de fármaco, isoniazida ou JVA 001, foi determinada comparando-se as áreas dos picos correspondentes aos fármacos nas amostras com aqueles obtidos após a análise das soluções-padrão, nas mesmas condições.

A eficiência de encapsulação foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade total de fármaco adicionado à formulação e a de fármaco livre, quantificado no sobrenadante após a ultracentrifugação. As equações utilizadas para calcular a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco estão apresentadas a seguir:

$$EE\% = [(TM-FD) / TD] \times 100$$

onde: EE = Eficiência de encapsulação em (%)

TD = Massa total de fármaco adicionada

FD = Massa de fármaco livre no sobrenadante

$$DC = (DE/TM) \times 100$$

onde: DC = teor de fármaco

DE = massa de fármaco encapsulada

TM = massa total de nanopartículas

#### **4.2.11 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Nanopartículas poliméricas liofilizadas, contendo os fármacos, INH e JVA 001, foram submetidas à análise por calorimetria exploratória diferencial, com o objetivo de verificar a natureza e a intensidade de interação entre a matriz polimérica e o fármaco encapsulado. A caracterização termoanalítica dos fármacos livres e das nanopartículas foi realizada através de curvas DSC obtidas em célula DSC-60 utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 1,5 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de -30 a 250 °C. A célula de DSC foi previamente calibrada após a utilização de uma amostra de índio metálico com pureza de 99,99% a partir da temperatura de fusão (156,4°C) e energia de fusão (28,5 J.g<sup>-1</sup>) deste material. Estas análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

#### **4.2.12 Difratometria de raios-X**

Os difratogramas de raios-X do fármaco livre, mistura-física (1:1) e das nanopartículas brancas e contendo fármaco foram obtidos utilizando-se difratômetro X'Pert Pro, equipado com tubo de raios-X ânodo de cobre, operando a 40 KV de tensão e uma corrente de 30 mA, com velocidade de varredura de 1°/minuto (modo theta-theta), usando silício (Si) policristalino como padrão. Estas análises foram realizadas

no Laboratório de Difração de Raios X do Departamento de Física da UFSC.

#### 4.2.13 Estudos de estabilidade

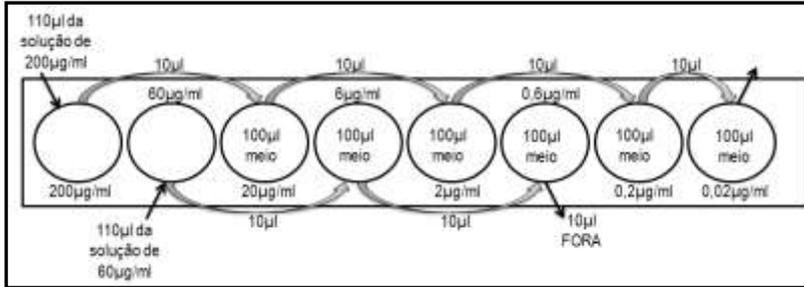
Alíquotas dos *pellets* de nanopartículas foram estocadas a -20 °C, e avaliadas no dia de obtenção e após 15, 30 e 60 dias. Foram avaliados parâmetros como eficiência de encapsulação por CLAE, tamanho de partícula, potencial zeta e pH em suspensão.

#### 4.2.14 Avaliação da atividade antimicrobacteriana de nanocarreadores contendo INH e JVA 001 pelo método do MTT

A atividade antimicrobacteriana das nanopartículas foi avaliada através do método do MTT – Metil Tiazol Tetrazólio, adaptado de MSHANA *et al.*, 1998, utilizando cepas clínicas de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes aos fármacos isoniazida e rifampicina. Todo o procedimento, exceto a leitura da densidade óptica, foi realizado em cabine de segurança biológica.

A suspensão do *M. tuberculosis* foi preparada a partir do crescimento em meio LJ, em fase exponencial de crescimento de até 30 dias (metabolismo ativo), em tubos contendo pérolas de vidro e meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC. Após agitação em vórtex e subsequente repouso, a concentração de bactérias foi ajustada através da comparação da turbidez da suspensão bacteriana à turbidez do tubo nº1 da escala 1 de McFarland, equivalente à  $3 \times 10^8$  bactérias/mL. A concentração final utilizada foi de  $3 \times 10^7$  bactérias/mL.

Para o tratamento das culturas, foram preparadas soluções-mãe dos fármacos livres e encapsulados, na concentração de 10 mg/mL, em meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC. Em uma placa de 96 poços, fundo chato, foram realizadas as diluições seriadas na ordem 10, a partir da solução estoque de fármaco, para obter as concentrações de: 0,02; 0,2; 0,6; 2,0; 6,0; 20,0; 60,0 e 200,0 µg/ml de fármaco em meio 7H9 com volume final de 100 µL. Todas as diluições foram realizadas em triplicata de acordo com a figura 4.



**Figura 4** - Desenho esquemático das diluições seriadas empregadas na avaliação da atividade antimicrobiana de fármacos livres e nanoencapsulados

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana, contendo  $10^6$  bactérias, aos 100  $\mu\text{L}$  de fármacos já adicionados anteriormente, de modo a se obter as concentrações desejadas de: 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O ponto de corte para leitura foi de 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (FRANZBLAU et al., 1998; MISHANA et al., 1998), sendo que a partir desta concentração as bactérias foram consideradas resistentes.

Como controle negativo, foi utilizada a mesma concentração de bactérias inativadas termicamente, através do aquecimento a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, em banho-maria. Para o controle positivo, foram plaqueadas  $10^6$  bactérias por poço, sem adição de fármaco. Poços contendo apenas meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC foram utilizados como branco para as leituras. O desenho esquemático das placas utilizadas nos ensaios de MTT, contendo as culturas de *M. tuberculosis* H37Rv com os diferentes tratamentos com fármacos livres e nanoencapsulados, está representado na figura 5, a seguir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H <sub>2</sub> O	Mtb viáv.	Mtb viáv.	Mtb viáv.	H <sub>2</sub> O	100µg/ml INH	100µg/ml INH	100µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	100µg/ml INH-NP	100µg/ml INH-NP	100µg/ml INH-NP
B	H <sub>2</sub> O	30µg/ml INH	30µg/ml INH	30µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	30µg/ml INH-NP	30µg/ml INH-NP	30µg/ml INH-NP				
C	H <sub>2</sub> O	Mtb inativ.	Mtb inativ.	Mtb inativ.	H <sub>2</sub> O	10µg/ml INH	10µg/ml INH	10µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	10µg/ml INH-NP	10µg/ml INH-NP	10µg/ml INH-NP
D	H <sub>2</sub> O	3µg/ml INH	3µg/ml INH	3µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	3µg/ml INH-NP	3µg/ml INH-NP	3µg/ml INH-NP				
E	H <sub>2</sub> O	INH	INH	INH	H <sub>2</sub> O	1µg/ml INH	1µg/ml INH	1µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	1µg/ml INH-NP	1µg/ml INH-NP	1µg/ml INH-NP
F	H <sub>2</sub> O	INH-NP	INH-NP	INH-NP	H <sub>2</sub> O	0,3µg/ml INH	0,3µg/ml INH	0,3µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	0,3µg/ml INH-NP	0,3µg/ml INH-NP	0,3µg/ml INH-NP
G	H <sub>2</sub> O	NPB	NPB	NPB	H <sub>2</sub> O	0,1µg/ml INH	0,1µg/ml INH	0,1µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	0,1µg/ml INH-NP	0,1µg/ml INH-NP	0,1µg/ml INH-NP
H	H <sub>2</sub> O	Bco	Bco	Bco	H <sub>2</sub> O	0,01µg/ml INH	0,01µg/ml INH	0,01µg/ml INH	H <sub>2</sub> O	0,01µg/ml INHnp	0,01µg/ml INHnp	0,01µg/ml INHnp

**Figura 5** - Desenho esquemático das placas de cultura utilizadas nos ensaios de MTT tratadas com diferentes concentrações de fármacos livres e nanoencapsulados. Mtb viáv.: Controle positivo, Mtb H37Rv viáveis; Mtb inativ.: Controle negativo, Mtb H37Rv inativadas termicamente; Branco (Bco): Meio 7H9 + MTT + tampão de lise; NPB: Meio 7H9 + MTT + nanopartículas brancas (placebo); INH: diferentes concentrações de fármacos livres, INH ou JVA 001; INH-NP: nanopartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de fármacos, INH ou JVA 001.

Após plaqueadas, as culturas bacterianas foram fechadas com parafilme e incubadas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, durante 7 dias. Após este tempo de incubação, adicionou-se em cada poço 50 µL de uma solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5 difenil-tetrazólio brometo] em PBS estéril pH 7,2 contendo 10% de tween 80 na concentração de 1,0 mg/mL. Esta solução foi preparada no momento do uso.

Após a adição do MTT, a placa retornou para a incubação nas mesmas condições, durante 4 horas. Em seguida, em cada poço foram adicionados 50 µL de tampão de lise contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50% de N<sub>1</sub>N-dimetilformamida a pH 4,7 para dissolução dos cristais de formazan e inativação das bactérias. As placas foram incubadas por mais 12 horas, a 37°C.

A leitura final do teste foi baseada na visualização da mudança de cor do MTT, de amarelo (oxidada) para a cor púrpura (reduzida), o que foi relacionado com crescimento celular. A densidade óptica desta

solução foi determinada na própria placa, através de leitor de placas em comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.2.15 Obtenção de macrófagos murinos

Camundongos pesando entre 25-35g, provenientes do biotério central da UFSC, foram sacrificados e tiveram suas patas traseiras dissecadas e os ossos, fêmur e tíbia, removidos e submersos em PBS estéril contendo antibiótico (CEP/UFSC PP00339/201). Em fluxo laminar, as extremidades destes ossos foram cortadas com o auxílio de lâmina de bisturi. Em seguida, utilizando-se uma seringa de insulina, os conteúdos medulares dos ossos foram lavados com PBS estéril e antibiótico. Este procedimento foi repetido com todos os ossos.

Macrófagos foram obtidos conforme descrito anteriormente por BAFICA e colaboradores, em 2005. Brevemente, a suspensão de células obtida foi centrifugada a 1000 RPM por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 30 mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 20% de sobrenadante de L929. As células foram distribuídas em placa de 6 poços, contendo 5 mL por poço, e incubadas a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. No 5º dia de cultivo, foram adicionados 3 mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 20% de sobrenadante de L929 por poço, incubadas nas mesmas condições. No 7º dia de cultivo, os macrófagos já estavam diferenciados. As culturas foram lavadas duas vezes para remoção das células não-aderentes através da adição de tripsina, jateando PBS vigorosamente sobre a monocamada de células, com o auxílio de micropipeta de 1 mL e ponteira com barreira. Foram acrescentados 2 mL de tripsina/EDTA a 0,05% por poço e incubados a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, durante 5 minutos.

As células foram transferidas para um tubo Falcon de 50 mL e o volume final ajustado para 30 mL com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, e centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuspensado em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, e o volume ajustado para obter-se uma concentração de 10<sup>5</sup> células por poço. Foram adicionados 500 µL desta suspensão em cada poço de uma placa de 24 poços. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

#### 4.2.16 Infecção de macrófagos em cultura

A suspensão de *M. tuberculosis* foi preparada a partir do crescimento em meio LJ, em fase exponencial de crescimento de até 30 dias, período no qual o metabolismo foi considerado ativo. O crescimento das bactérias foi realizado em tubos contendo pérolas de vidro em meio 7H9, enriquecido com 10% de OADC. Após agitação em vórtex e subsequente repouso, a concentração de bactérias foi ajustada através da comparação da turbidez da suspensão bacteriana à turbidez do tubo nº 1 da escala de McFarland, correspondente à concentração de  $3 \times 10^8$  bactérias/mL. A concentração final obtida foi de  $2 \times 10^6$  bactérias/mL. Parte da suspensão foi plaqueada em meio 7H10 para a realização de controle.

A infecção dos macrófagos murinos foi realizada conforme descrito anteriormente por BAFICA e colaboradores, em 2005. Brevemente, foram adicionados 5  $\mu$ L da suspensão bacteriana ( $10^4$  bactérias) em cada poço da placa contendo os macrófagos murinos previamente plaqueados. Essa concentração bacteriana foi utilizada buscando-se simular uma infecção equivalente a uma bactéria para cada 10 macrófagos (MOI 0,1). A placa foi incubada por 4 horas a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. A seguir, cada poço foi lavado com PBS a fim de remover os bacilos não fagocitados. Após a lavagem, foram adicionados 100  $\mu$ L de meio DMEM em cada poço.

#### 4.2.17 Tratamento de macrófagos infectados

Uma placa espelho foi preparada, contendo os fármacos livres e encapsulados, nas diluições de 2, 20 e 200  $\mu$ g/mL, em meio DMEM, com volumes de 100  $\mu$ L por poço, que foram adicionados aos poços de macrófagos infectados, em 100  $\mu$ L de meio, ajustando as concentrações finais de 1; 10 e 100  $\mu$ g/mL de fármaco.

A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% por um período de 24 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e a placa foi novamente lavada com PBS para a remoção do excesso de fármaco em solução. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de meio DMEM em cada poço.

A placa voltou a ser incubada a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após os períodos de 2, 4 e 6 dias pós-infecção, o meio foi removido e as células lisadas utilizando-se 200  $\mu$ L de saponina a 1% em água estéril.

O desenho esquemático das placas utilizadas nos ensaios de atividade antimicobacteriana *in vitro*, contendo as culturas de *M. tuberculosis* H37Rv com os diferentes tratamentos com fármacos livres e nanoencapsulados, está representado na figura 6, a seguir.

	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
B	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + FL 100 µg/ml	MØ + FL 100 µg/ml	MØ + NPB 100 µg/ml	MØ + NPB 100 µg/ml	MØ + Bact.	MØ + Bact.	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
C	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + FL 10 µg/ml	MØ + FL 10 µg/ml	MØ + NPB 10 µg/ml	MØ + NPB 10 µg/ml	MØ	MØ	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
D	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + FL 1 µg/ml	MØ + FL 1 µg/ml	MØ + NPB 1 µg/ml	MØ + NPB 1 µg/ml	H <sub>2</sub> O				
E	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + NP 100 µg/ml	MØ + NP 100 µg/ml	MØ + NPB + F L100 µg/ml	MØ + NPB + FL100 µg/ml	Bact.	Bact.	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
F	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + NP 10 µg/ml	MØ + NP 10 µg/ml	MØ + NPB + F L 10 µg/ml	MØ + NPB + FL 10 µg/ml	H <sub>2</sub> O				
G	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	MØ + NP 1 µg/ml	MØ + NP 1 µg/ml	MØ + NPB + F L 1 µg/ml	MØ + NPB + FL 1 µg/ml	H <sub>2</sub> O				
H	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Figura 6** - Desenho esquemático das placas de cultura utilizadas na avaliação da atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados tratados com diferentes concentrações de fármacos livres e nanoencapsulados. MØ + FL 100: Macrófagos infectados tratados com fármaco livre [100µg/ml]; MØ + FL 10: Macrófagos infectados tratados com fármaco livre [10 µg/ml]; MØ + FL 1: Macrófagos infectados tratados com fármaco livre [1 µg/ml]; MØ + NP 100: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas contendo 100 µg/ml de fármaco; MØ + NP 10: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas contendo [10 µg/ml] de fármaco; MØ + NP 1: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas contendo [1 µg/ml] de fármaco; MØ + NPB 100: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas equivalente a 100 µg/ml de nanopartícula contendo fármaco; MØ + NPB 10: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas equivalente a 10 µg/ml de nanopartícula contendo fármaco; MØ + NPB 1: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas equivalente a 1 µg/ml de nanopartícula contendo fármaco; MØ + NPB + FL 100: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas + fármaco livre [100 µg/ml]; MØ + NPB + FL 10: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas + fármaco livre [10 µg/ml]; MØ + NPB + FL 1: Macrófagos infectados tratados com nanopartículas brancas + fármaco livre [1 µg/ml]; MØ + Bact.: Controle de macrófagos + bactérias; Bact.: Controle de bactérias; MØ: Controle de macrófagos.

#### **4.2.18 Avaliação da viabilidade bacteriana em macrófagos infectados**

As células lisadas foram ressuspensas vigorosamente com o auxílio de micropipeta. Os bacilos liberados a partir da lise dos macrófagos foram semeados em meio sólido 7H10. Utilizando-se um *swab* estéril, 100 µL do lisado de células foram transferidos para placas de Petri contendo meio sólido 7H10. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37 °C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após 28 dias de incubação, as colônias foram contadas na placa, e os resultados expressos graficamente.

#### **4.2.19 Análise estatística**

Os resultados experimentalmente obtidos neste trabalho foram expressos pela média ± erro padrão da média (EPM) de três ou mais experimentos distintos. As análises estatísticas foram realizadas através ANOVA (análise de variância) de uma ou mais vias (na dependência do número de co-variáveis em estudo), seguido pelo *post hoc* de Bonferroni. Para as comparações múltiplas, foi empregado o *post hoc* de Newman-Keuls. Para comparações simples entre grupos foi empregado o *teste t de Student*. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc.). Foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

---

A fim de investigar as características moleculares dos fármacos utilizados no estudo, isoniazida e JVA001, e obter melhor entendimento durante o desenvolvimento das nanopartículas carreadoras, análises físico-químicas foram empregadas. Os resultados obtidos a partir destas análises estão apresentados a seguir.

### 5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Várias metodologias de cromatografia líquida têm sido descritas na literatura para a determinação da isoniazida (BHUTANI et al., 2006; CALLERI et al., 2002), empregando-se a absorção no ultravioleta para este fármaco. A acidificação da fase móvel conduz ao aumento do limite de detecção e da sensibilidade do método. Adicionalmente, a simetria do pico é melhorada quando fase móvel e amostras são acidificadas (LOH & AHMED, 1990).

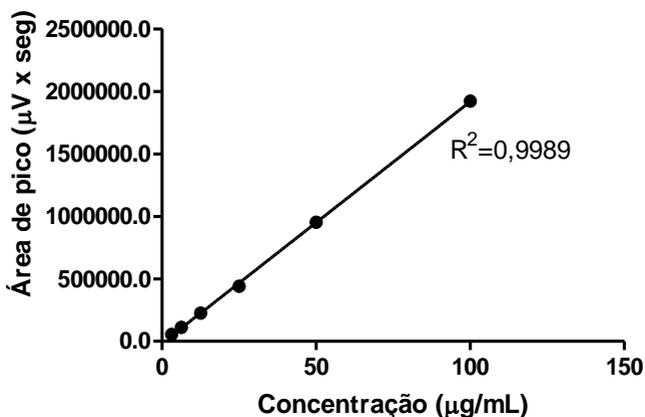
Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de isoniazida diluídas em uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico pH=3,5, na proporção 10:90. O tempo de retenção da isoniazida nas condições empregadas foi de 3,8 minutos. Na tabela 6 a seguir, encontram-se demonstradas as áreas dos picos obtidas nas diferentes concentrações de isoniazida.

**Tabela 5** - Áreas dos picos cromatográficos obtidas a partir da análise de soluções-padrão de isoniazida por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração de INH ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média $\pm$ EPM	C.V. (%)
3,12	54.237 $\pm$ 6.302	19,1
6,25	112.456 $\pm$ 3.839	5,9
12,50	225.636 $\pm$ 10.362	7,9
25,00	440.992 $\pm$ 25.480	10,0
50,00	953.581 $\pm$ 2.919	0,5
100,00	1.921.528 $\pm$ 10.551	0,5

C.V.: Coeficiente de Variação; **Média**: áreas de picos cromatográficos (n=3)

A partir destes dados, construiu-se um gráfico de área de pico *versus* concentração de fármaco, e a equação da reta foi obtida através de regressão linear. O coeficiente de regressão da reta está representado na figura 7.



**Figura 7** - Curva de calibração de INH obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

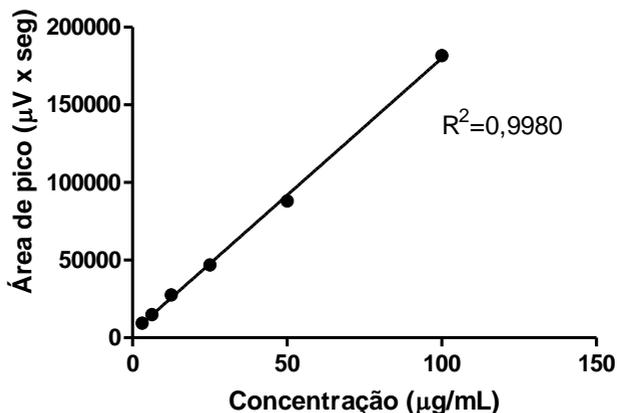
Já para a análise de JVA 001, foram necessárias adaptações das condições cromatográficas, devido às diferentes características da molécula como, por exemplo, apolaridade e máxima de absorção. Para a elaboração da curva de calibração, foram utilizadas soluções de JVA 001 diluídas em uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico pH=3,5, na proporção 65:35. Na tabela 6 encontram-se demonstradas as áreas dos picos obtidas nas diferentes concentrações de JVA 001. O tempo de retenção de JVA nas condições empregadas foi de 4,7 minutos.

**Tabela 6** - Áreas dos picos obtidas por análise de soluções-padrão de JVA 001 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Concentração de JVA 001 (µg/mL)	Área do pico ± SEM	C.V. (%)
3,12	9.481 ± 959	17,5
6,25	14.908 ± 756	8,8
12,50	27.561 ± 1.841	9,5
25,00	46.859 ± 2.167	8,0
50,00	88.109 ± 583	1,1
100,00	181.799 ± 574	0,5

C.V.: Coeficiente de Variação; **média**: Áreas de picos cromatográficos (n=3)

A partir destes dados, construiu-se um gráfico de área de pico *versus* concentração de fármaco, e a equação da reta foi obtida através de regressão linear. O coeficiente de regressão da reta está representado na figura 8.



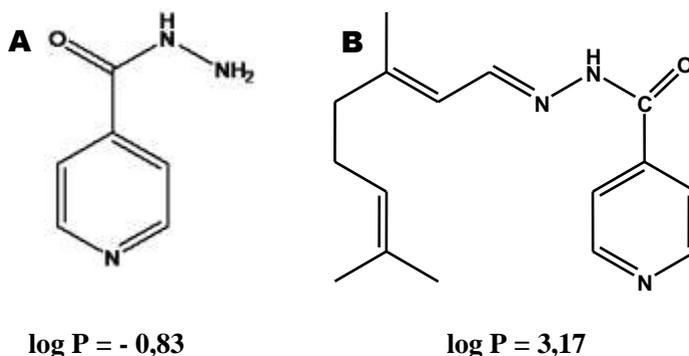
**Figura 8** - Curva de calibração de JVA 001 obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a análise cromatográfica das soluções-padrão e a construção das curvas de calibração a partir das áreas de pico correspondentes às concentrações, as amostras de sobrenadante e *pellet* de nanopartículas foram injetados no cromatógrafo. As áreas de picos obtidas a partir destas análises foram interpoladas nas curvas de calibração. A eficiência de encapsulação e o teor de fármaco nas formulações de nanopartículas contendo INH e JVA 001 foram determinados, conforme descrito anteriormente.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA (LOG P)

Uma das importantes características moleculares para ação e encapsulação de fármacos em nanopartículas poliméricas consiste no coeficiente de partição óleo/água, também conhecido como log P. Neste trabalho, o log P foi determinado empregando-se métodos preditivos e experimentais. Os solventes empregados foram água e diclorometano, já que este último foi o solvente utilizado na fase orgânica para suspensão do polímero.

A determinação do log P consiste em uma importante etapa dos estudos de pré-formulação, embasando a escolha do polímero e técnica de obtenção de nanopartículas. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho foram comparados com valores preditivos de polaridade, calculados pelo método descrito por ERTL e SELZER em 2003. Este método baseia-se em cálculos da área superficial de fragmentos moleculares, estimados através do programa computacional Molinspiration Cheminformatics® ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)).



**Figura 9** - Estruturas moleculares e hidrofobicidade (log P) dos fármacos utilizados no estudo. A: isoniazida (INH) e B: JVA 001

Os resultados de coeficiente de partição obtidos experimentalmente, seguindo a metodologia descrita por METHA *et. al.*, 2007, foram log P = -0,83 para a isoniazida, enquanto que para o JVA 001 o valor de log P obtido experimentalmente foi 3,17. Estes resultados estão de acordo com os valores preditivos estimados através de programas de quimioinformática, que apresentam log P = -0,90 para a isoniazida e log P = 3,20 para o JVA 001.

### 5.3 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE DUPLA EMULSÃO

A primeira técnica testada foi a de dupla emulsão com evaporação do solvente, por consistir em técnica descrita na literatura (PANDEY *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2004), amplamente utilizada para a nanoencapsulação de tuberculostáticos. No entanto, nenhuma das formulações testadas com esta técnica apresentou tamanho nanométrico, como desejável. Mesmo assim, a eficiência de encapsulação foi

determinada através de espectrofotometria utilizando comprimento de onda 261nm.

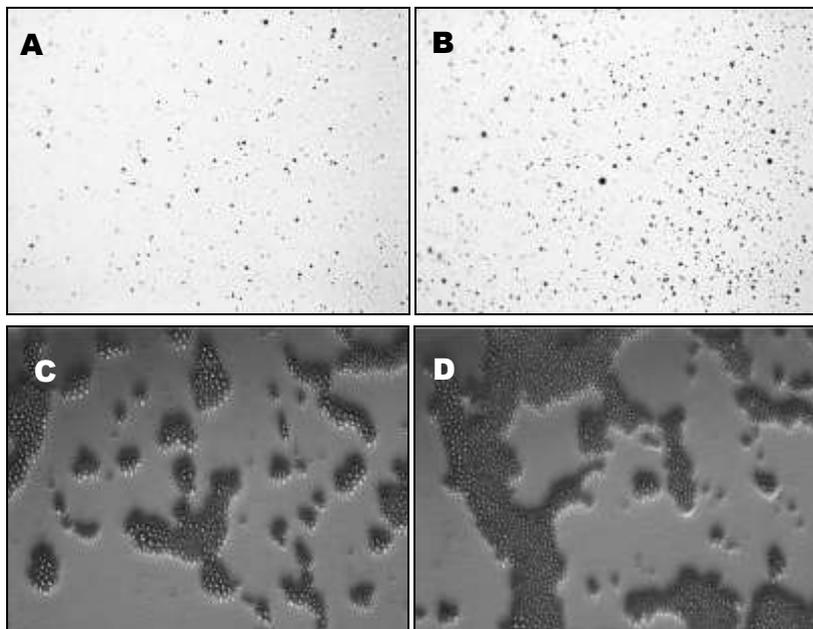
Os valores de eficiência de encapsulação obtidos após a obtenção de nanopartículas pela técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente estão representados a seguir na tabela 7.

**Tabela 7** - Formulações testadas durante a padronização da técnica de dupla emulsão (a/o/a) com evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas poliméricas contendo isoniazida

<b>Fórmula</b>	<b>INHPLGA (mg)</b>	<b>Fármaco: DCM (mg)</b>	<b>PVA polímero (mL)</b>	<b>PVA (FE)</b>	<b>Diâmetro médio (µm)</b>	<b>Eficiência (%) Encapsulação</b>	
F1	20	100	1:5	9,0	1%	12,11	8,19±2,37
F2	40	100	2:5	9,0	1%	6,57	5,61±3,14
F3	60	100	3:5	9,0	1%	4,15	6,27±2,53
F4	90	100	4,5:5	9,0	1%	4,50	0,80±2,34
F5	120	100	6:5	9,0	1%	3,46	2,47±1,76
F6	20	100	1:5	9,0	0,5%	7,61	7,83±3,23
F7	40	100	2:5	9,0	0,5%	3,46	4,98±3,42
F8	60	100	3:5	9,0	0,5%	7,32	6,81±4,09
F9	90	100	4,5:5	9,0	0,5%	2,08	0,77±2,95
F10	120	100	6:5	9,0	0,5%	3,81	2,14±3,73

**DCM:** diclorometano; **PVA:** álcool polivinílico; **FE:** fase externa.

Após a obtenção de nanopartículas poliméricas, tanto placebo quanto contendo fármaco, foi verificada a formação de nanopartículas em suspensão, observadas através de microscopia óptica. A figura 10 apresenta as fotomicrografias obtidas utilizando-se aumentos de 10 e 40 vezes, a partir de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo os fármacos JVA 001 e INH, imediatamente após a sua preparação.

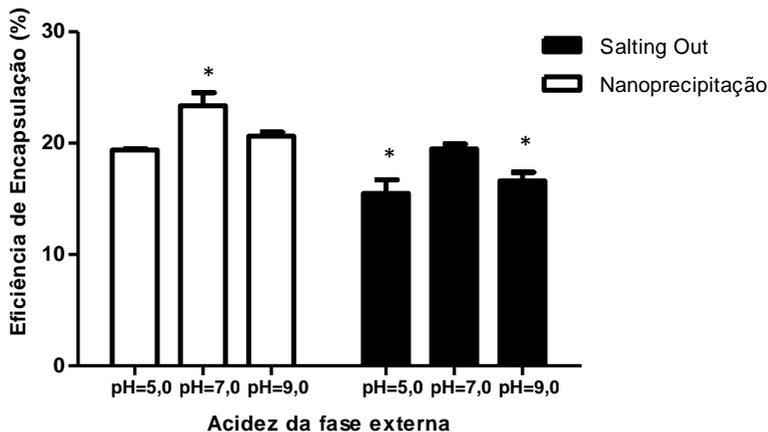


**Figura 10** - Fotos de lâminas preparadas com amostras de nanopartículas poliméricas brancas (placebo) e contendo os fármacos, INH e JVA 001, observadas através de microscopia óptica. A: nanopartículas poliméricas contendo INH fotografadas em aumento de 10X; B: nanopartículas poliméricas contendo JVA 001 fotografadas em aumento de 10X; C: nanopartículas poliméricas contendo INH fotografadas em aumento de 40X; D: nanopartículas poliméricas contendo JVA 001 fotografadas em aumento de 40X

#### **5.4 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELAS TÉCNICAS DE NANOPRECIPITAÇÃO E *SALTING-OUT***

Após a verificação da baixa eficiência de encapsulação da isoniazida em nanopartículas obtidas pela técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente, testes empregando as técnicas de nanoprecipitação e *salting-out* foram conduzidos. Além disso, a influência do pH da fase externa também foi avaliada, já que este fator poderia estar afetando o grau de ionização do fármaco e, conseqüentemente, a eficiência de encapsulação das nanopartículas contendo isoniazida.

Os resultados de eficiência de encapsulação de nanopartículas poliméricas contendo isoniazida foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média e estão representados graficamente na figura 11.



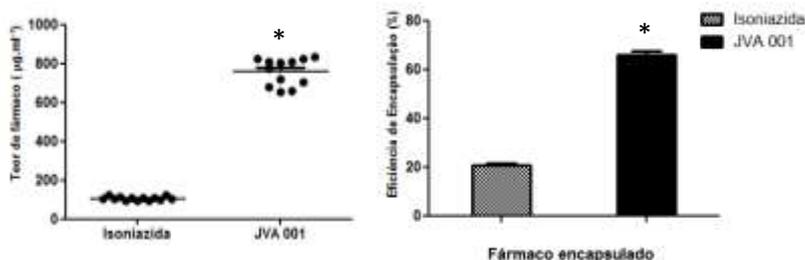
**Figura 11** - Avaliação da eficiência de encapsulação obtida com as técnicas de nanoprecipitação e *salting-out* e variação do pH da fase externa. Barras abertas: Nanoprecipitação; barras fechadas: nanoprecipitação com *salting-out*. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos distintos, onde \* indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni)

A análise estatística dos dados apontou diferenças significativas com relação aos valores de eficiência de encapsulação obtidos utilizando-se diferentes valores de pH de fase externa e combinação das técnicas de nanoprecipitação e *salting-out*, verificando-se valores maiores de eficiência de encapsulação de fármaco com o uso da técnica de nanoprecipitação em pH=7,0.

Após a verificação do aumento da eficiência de encapsulação da isoniazida em nanopartículas poliméricas obtidas com a utilização da técnica de nanoprecipitação, a eficiência de encapsulação de JVA 001 foi também avaliada. Nanopartículas poliméricas contendo JVA 001 foram obtidas utilizando-se a técnica padronizada anteriormente utilizando-se a isoniazida. A metodologia de quantificação de JVA 001

utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação seguiu as condições cromatográficas previamente descritas.

Os valores experimentais de teor de fármaco e eficiência de encapsulação de isoniazida e JVA 001 em nanopartículas poliméricas, obtidas pela técnica de nanoprecipitação utilizando pH=7,0 na fase externa, estão representados na figura 12.



**Figura 12** - Teor de fármaco e eficiência de encapsulação de nanopartículas poliméricas contendo isoniazida e JVA 001, obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de doze experimentos distintos, onde \* indica diferença significativa, após analisado pelo teste *t de Student*.

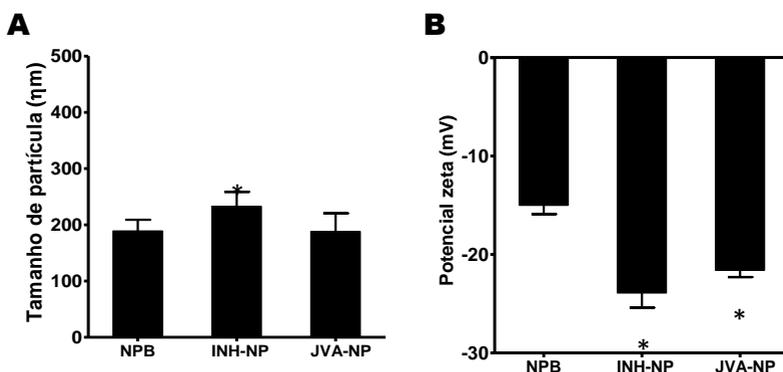
Estes valores demonstram um aumento significativo na taxa de eficiência de encapsulação do JVA 001 em relação à nanopartículas contendo isoniazida, obtidas através da mesma técnica de preparação, traduzindo-se em valores até 5 vezes maiores no teor de JVA 001 encapsulado.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS

Técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), emissão de campo (FEG) e microscopia de força atômica (AFM) foram utilizadas para a obtenção de imagens amplificadas em até 220.000 vezes. Estas imagens, representadas nas figuras 14, 15 e 16 permitem a observação mais detalhada e individualizada das nanopartículas, bem como a avaliação das características morfológicas e superficiais desses sistemas.

### 5.5.1 Determinação do tamanho e potencial zeta das nanopartículas

A determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho de nanopartículas poliméricas é um importante parâmetro de avaliação, não apenas de características morfológicas, quanto para avaliar o comportamento *in vitro* ou *in vivo* de nanopartículas poliméricas após sua administração. Por tal razão estes parâmetros devem ser precisamente caracterizados e avaliados. No presente trabalho, foram avaliados o diâmetro médio de nanopartículas contendo isoniazida e JVA 001, bem como nanopartículas brancas (placebo). A figura 13 resume graficamente os valores de tamanho de partícula e carga superficial.



**Figura 13** - Avaliação do tamanho e carga superficial de nanopartículas poliméricas brancas e nanopartículas contendo os fármacos INH ou JVA 001. A. Tamanho e B. Carga superficial de nanopartículas brancas (NPB), contendo isoniazida (INH-NP) e nanopartículas poliméricas contendo JVA 001 (JVA-NP), obtidas pela técnica de nanoprecipitação em pH=7,0. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos distintos, onde \* indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (placebo: NPB) após ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

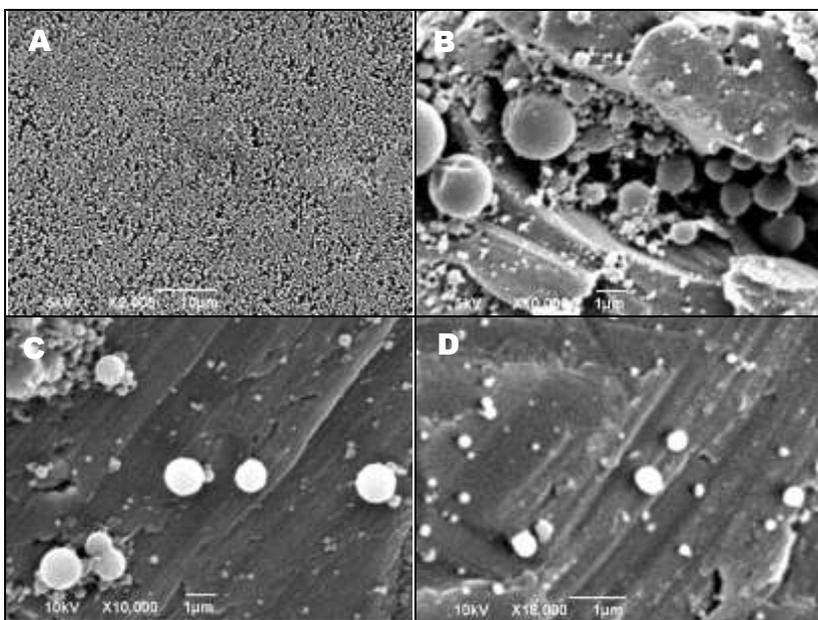
Estes resultados revelam que o diâmetro médio das nanopartículas apresentou-se similar, apesar do leve aumento no diâmetro médio das nanopartículas contendo isoniazida em relação às aquelas contendo JVA 001 e nanopartículas brancas. A carga superficial, representada pelo potencial zeta, foi significativamente maior em nanopartículas contendo isoniazida ou JVA 001, quando comparada às nanopartículas brancas. Estes dados sugerem que a

presença de fármaco altera a carga superficial das nanopartículas de PLGA.

### 5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura

Através de fotomicrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível observar que as nanopartículas poliméricas obtidas através da técnica de nanoprecipitação apresentam formato esférico, superfície lisa e dimensões submicrônicas, ou seja, menores entre 100 nm e 1 µm.

Fotomicrografias de nanopartículas contendo os fármacos, INH e JVA 001, foram obtidas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura e estão representadas na figura 14.



**Figura 14** - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas contendo fármacos, JVA 001 e INH, obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A, C: Nanopartículas poliméricas contendo JVA 001; B, D: Nanopartículas poliméricas contendo INH

Estas fotomicrografias permitem uma melhor análise morfológica das nanopartículas carreadoras, já que oferecem uma amplificação de imagem de até 18.000 vezes, onde é possível observar,

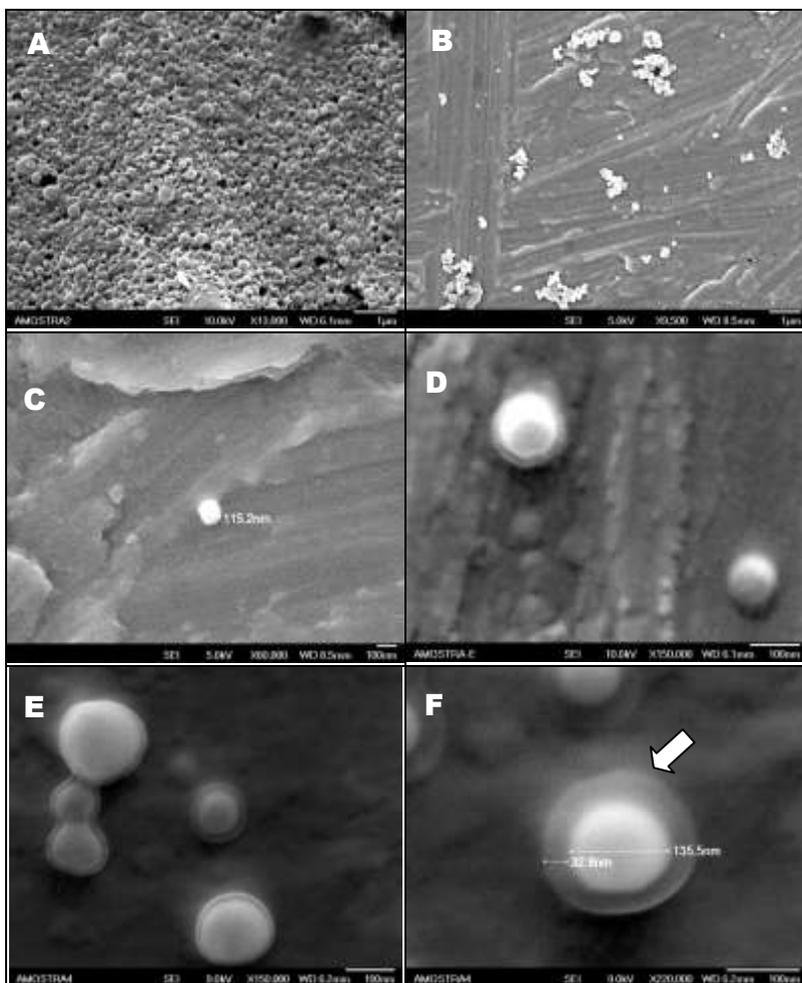
em primeiro plano, nanopartículas de maior tamanho e ao fundo, no segundo plano da imagem, partículas nanométricas de menor diâmetro médio. As imagens foram obtidas empregando-se uma aceleração eletrônica de 5kV, como mostram as figuras 14A e 14B e 10kV, como observado nas figuras 14C e 14D.

No entanto, ampliações na ordem de 100.000 vezes utilizando esta técnica de microscopia resultaram na degradação das nanopartículas, inviabilizando as imagens. Este fato foi atribuído ao aumento exagerado na aceleração eletrônica necessária, superior a 15kV, sugerindo a utilização técnicas alternativas para a obtenção de imagens, buscando maior poder de amplificação para uma melhor caracterização da superfície das nanopartículas.

### **5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo**

Outra técnica empregada para a avaliação morfológica e de superfície das nanopartículas foi a Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, conhecida como *FEG (Field Emission Gun)*. Fotomicrografias obtidas por *FEG* estão representadas a seguir na figura 15.

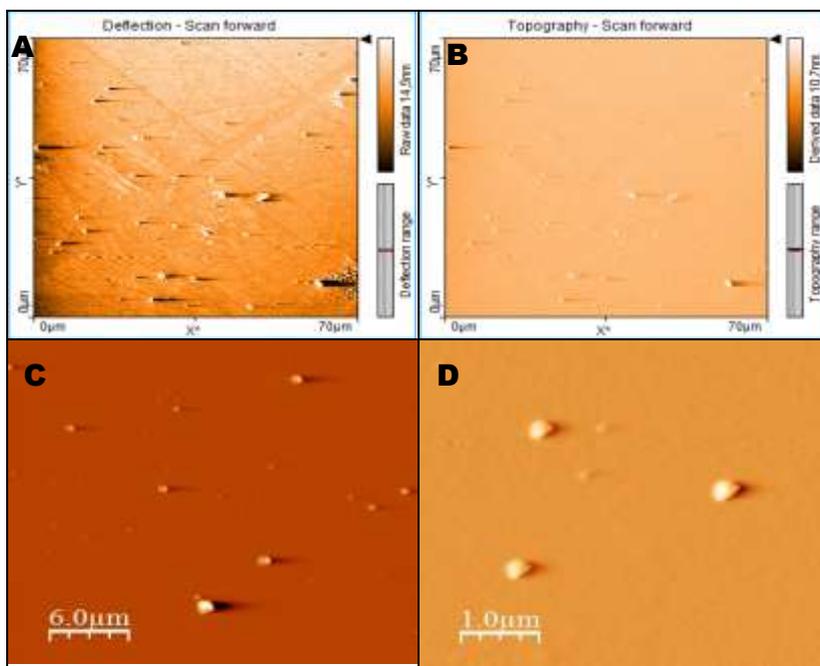
A observação das fotomicrografias obtidas pela técnica de *FEG*, representadas na figura 15, mostra o poder de amplificação de imagem proporcionado por esta técnica, mantendo-se a integridade das amostras já que utiliza uma menor aceleração eletrônica (5 kV). Na figura 15F, por exemplo, é possível observar o halo, indicado pela seta, formado devido à degradação hidrolítica do polímero durante o preparo da amostra, já que as nanopartículas foram suspensas em água antes da obtenção das imagens. Aumentos de até 220.000 vezes possibilitam uma visualização detalhada e individualizada das nanopartículas, permitindo até mesmo a determinação da espessura da parede polimérica.



**Figura 15** - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas brancas e contendo fármacos, INH e JVA 001, obtidas através da técnica de microscopia eletrônica por emissão de campo (FEG). A, B: Nanopartículas poliméricas brancas. C, D: Nanopartículas poliméricas contendo INH. E, F: Nanopartículas poliméricas contendo JVA 001

### 5.5.4 Microscopia de força atômica

Outra técnica que permite a visualização de nanopartículas poliméricas é a microscopia de força atômica, conhecida por AFM. A técnica de microscopia de força atômica tem sido bem empregada na caracterização morfológica de nanopartículas poliméricas por permitir a geração de imagens tridimensionais de alta resolução, além do detalhamento da superfície em nível atômico. Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas contendo os fármacos utilizados neste trabalho foram obtidas através da técnica de microscopia de força atômica, como observa-se na figura 16.



**Figura 16** - Fotomicrografias de nanopartículas poliméricas contendo fármacos, obtidas através da técnica de Microscopia de Força Atômica. A, C: JVA 001; B, D: isoniazida

A microscopia de força atômica faz parte de um grupo de varredura por sonda, na qual o movimento desta sobre a amostra é realizado pelo sistema de varredura de ponta (“*scanner*”). Tal ponta é constituída por material piezoelétrico que expande e contrai

proporcionalmente, conforme a tensão aplicada. O modo de operação utilizado neste trabalho foi o modo de contato, no qual a ponta permanece em “contato direto” com a amostra durante a medida. Este modo de operação possibilita a varredura em altas velocidades e a obtenção de resolução atômica na topografia das imagens e a investigação da amostra em um meio líquido.

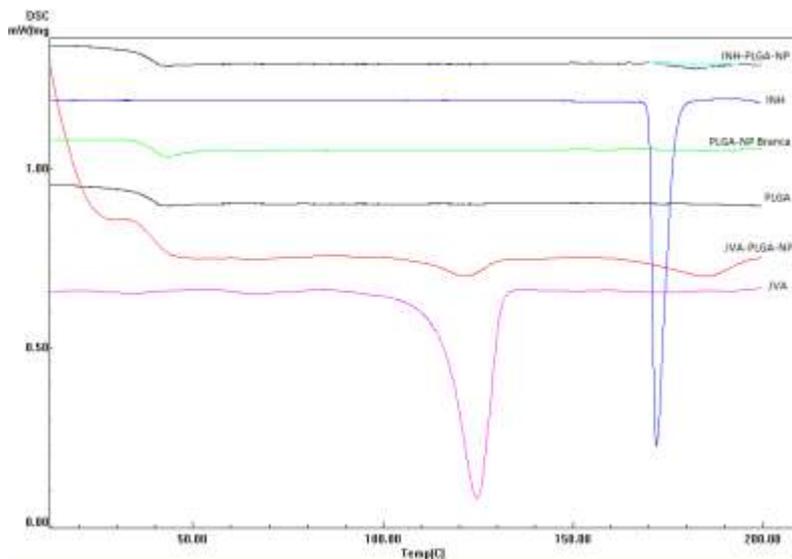
## **5.6 ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)**

A aplicação de técnicas termoanalíticas tem se tornado um importante instrumento para a caracterização de fármacos, bem como para a avaliação da interação fármaco-excipiente em estudos de pré-formulação e controle de qualidade. Dentre essas técnicas, destaca-se a calorimetria exploratória diferencial, mais conhecida por DSC, utilizada neste trabalho para a verificação de interações físico-químicas entre o fármaco e a matriz polimérica, além da distinção entre as diferentes formas cristalinas dos fármacos INH e JVA 001.

Métodos termoanalíticos como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), encontram grande utilidade para a análise de diversos polímeros e têm sido amplamente empregados na investigação de interações físico-químicas entre os polímeros e fármacos em sistemas poliméricos nanoestruturados carreadores de fármaco. Deste modo, informações úteis podem ser obtidas com relação à morfologia de polímeros cristalinos ou amorfos e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos (MAGENHEIM et al., 1991).

Análises utilizando curvas DSC têm sido utilizadas também para o estudo das interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e os adjuvantes. Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, despolimerização e degradação.

A figura 17 apresenta as curvas DSC obtidas a partir da análise calorimétrica exploratória diferencial de amostras de PLGA, cristais de fármaco, INH e JVA 001, bem como nanopartículas poliméricas brancas e contendo os fármacos INH e JVA 001. As curvas DSC foram obtidas em atmosfera inerte de nitrogênio, sob fluxo de  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Figura 17** - Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC) de amostras de PLGA, fármacos livres e nanoencapsulados. INH-PLGA-NP: nanopartículas poliméricas contendo INH; INH: cristais de isoniazida; PLGA-NP Branca: nanopartículas poliméricas brancas (placebo); PLGA: Ácido poli-Lático-co-Glicólico; JVA-PLGA-NP: nanopartículas poliméricas contendo JVA 001; JVA: cristais de JVA 001

A curva DSC obtida a partir da análise de amostras de PLGA é característica de estruturas poliméricas amorfas e mostra um evento térmico iniciado a 40 °C, correspondente à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) deste material. Tal evento se repete em todas as amostras contendo PLGA, como observa-se nas curvas DSC obtidas a partir de nanopartículas brancas e contendo INH e JVA 001.

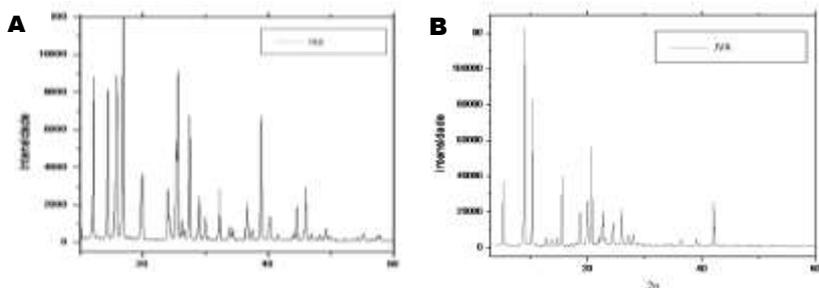
A curva DSC obtida a partir da análise de amostras de isoniazida (INH) demonstra um nítido evento endotérmico em 173,13°C ( $\Delta H = 194,90 \text{ J.g}^{-1}$ ), referente à fusão dos cristais de fármaco. Já no caso do JVA 001, observa-se um deslocamento deste evento térmico para 125,28 °C, em relação à INH, o que foi atribuído à mudança conformacional da molécula e de sua estrutura cristalina.

Com relação às nanopartículas poliméricas contendo INH, observa-se um evento térmico inicial acerca de 40 °C, que corresponde exatamente à  $T_g$  do PLGA. Além deste, é possível observar um sutil

evento na faixa de temperatura compreendida entre 170 e 190 °C, culminando em 183,41 °C. Este deslocamento em relação à curva DSC da INH é indicativo de interação físico-química entre o fármaco e a matriz polimérica. Já no caso do JVA 001, a curva DSC demonstra 3 eventos térmicos: o primeiro deles, relacionado ao PLGA, assim como ocorre com as nanopartículas contendo INH; o segundo, próximo a 125 °C, referente à presença de JVA 001 e um terceiro evento endotérmico, atribuído à formação de uma nova estrutura cristalina composta pelo fármaco e a matriz polimérica, indicativo de possível interação química entre JVA 001 e PLGA.

### 5.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

A análise de amostras de cristais de fármaco foi realizada através de difração de raios-X, com o objetivo de verificar diferenças na estrutura cristalina do análogo obtido a partir da derivatização da molécula de isoniazida, bem como evidenciar diferenças nas estruturas cristalinas dos dois fármacos. A figura 18 apresenta o difratograma obtido a partir da análise de cristais de isoniazida.



**Figura 18** - Espectro de difração de raios-X obtidos a partir de cristais de fármacos. A: isoniazida; B: JVA 001

Reflexões intensas observadas em 15,6°, 16,8°, 19,6°, 25,2° e 27,3° utilizando 2θ são características da cristalinidade da isoniazida. O padrão cristalográfico observado no difratograma 7A obtido através da análise experimental de amostras de cristais isoniazida é compatível com o padrão cristalográfico descrito pelo Cambridge *Structural Database System* (ICDD, 1980) onde esta estrutura molecular apresenta-se como um sistema cristalino ortorrômbico, com parâmetros cristalográficos característicos.

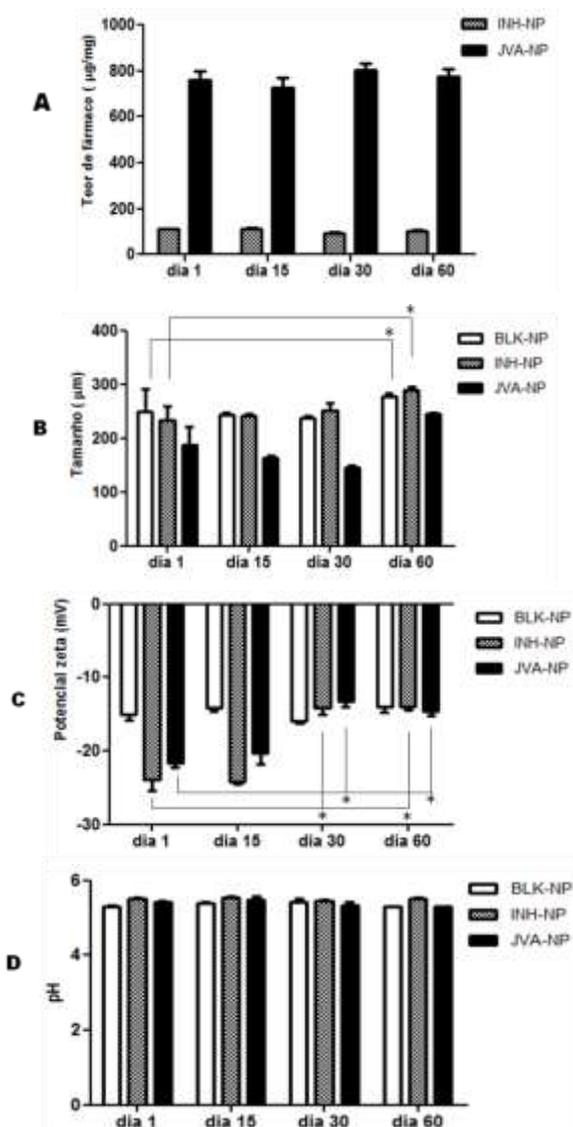
Com a finalidade de verificar alterações na estrutura cristalina da isoniazida, provenientes da conjugação do grupamento citral à molécula, foram realizadas análises para a obtenção do espectro de difração de raios-X em cristais de JVA 001.

Alterações no perfil espectral evidenciam modificações na estrutura cristalina da molécula, atribuídas ao processo de derivatização molecular, o que reflete na estrutura cristalina do fármaco conforme observa-se na figura 18B. Comparando-se os espectros apresentados na figura 18 constata-se que a isoniazida apresenta 6 picos principais de difração, o que caracteriza sua forma cristalina, enquanto que o JVA 001 apresenta em seu espectro um número maior de picos de difração, além do surgimento de uma intensa reflexão a  $42,9^\circ$ , evidenciando uma nova estrutura cristalina assumida pelo análogo derivado da isoniazida.

## 5.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

A compreensão do comportamento físico-químico de nanopartículas poliméricas é objeto de inúmeras pesquisas, sendo que as principais dificuldades encontradas para a caracterização físico-química decorrem do tamanho reduzido destas partículas. Através de estudos de estabilidade em condições de armazenamento, pode-se assegurar a qualidade e a integridade das nanopartículas após períodos e condições de armazenamento pré-definidas, garantindo a conservação da qualidade original das partículas no momento do tratamento *in vitro* (HOLZER et. al., 2009).

Neste estudo de estabilidade objetivou avaliar a integridade das nanopartículas poliméricas brancas (placebo) e contendo os fármacos, isoniazida e JVA 001. Parâmetros como tamanho, carga superficial e pH em suspensão foram avaliados em diferentes períodos de tempo no decorrer de dois meses. Durante o período de estudo, as nanopartículas poliméricas foram acondicionadas sob condições de armazenamento pré-estabelecidas ( $-20^\circ\text{C}$ ). Foram monitorados parâmetros físico-químicos monitorados que poderiam estar relacionados à ocorrência de degradação físico-química, após 15, 30 e 60 dias de armazenamento. Os resultados do estudo de estabilidade foram expressos na figura 19.



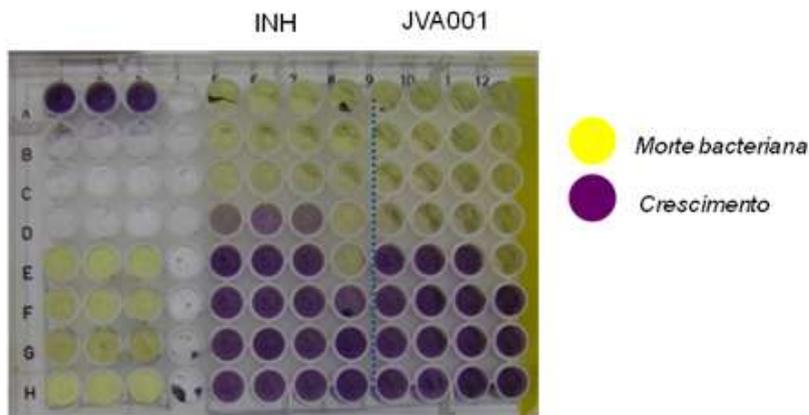
**Figura 19** - Estudo de estabilidade de nanopartículas poliméricas brancas e contendo fármacos, INH e JVA 001, sob condições de armazenamento, durante 60 dias. A: Avaliação da eficiência de encapsulação; B: Avaliação do tamanho; C: Avaliação do potencial zeta; D: Avaliação do pH em suspensão

Como observa-se na figura 19, o pH das suspensões de nanopartículas manteve-se constante ao longo do tempo, demonstrando a estabilidade físico-química destas formulações. Além disso, as eficiências de encapsulação das nanopartículas contendo os fármacos mantiveram-se inalteradas até o final do estudo, tanto para INH quanto para JVA 001, assegurando que as concentrações de fármacos nanoencapsulados adicionadas às culturas de células nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana mantiveram-se precisas.

Com relação ao potencial zeta, representado na figura 19C, observou-se uma redução em módulo nos valores de carga superficial em amostras de nanopartículas contendo isoniazida e JVA 001, ao longo do período de estudo.

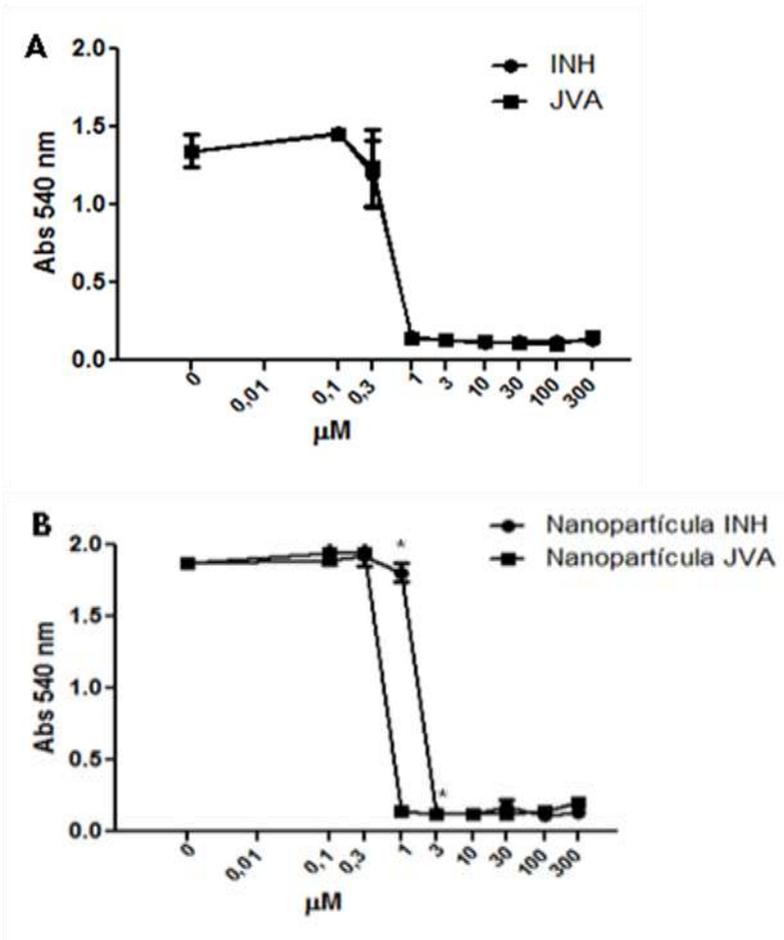
### 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE FÁRMACOS NANOENCAPSULADOS

A viabilidade bacteriana de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv foi determinada utilizando o método do MTT, conforme descrito anteriormente. A figura 20 apresenta uma imagem da placa, mostrando a correspondência de cor relacionada ao crescimento ou morte bacteriana. As concentrações de fármacos adicionadas em cada poço estão representadas esquematicamente nas figuras 5 e 6



**Figura 20** - Exemplo de placa apresentando resultados do ensaio de MTT. A cor roxa indica viabilidade celular, enquanto que a cor amarela corresponde à morte bacteriana.

A partir de metodologia padronizada, adaptada de MSHANA et al., 1998, determinou-se a viabilidade celular de culturas de *M. tuberculosis*, após tratamento com diferentes concentrações de fármacos livres ou nanoencapsulados. A figura 21 demonstra os resultados obtidos através deste modelo, após tratamento das culturas bacterianas utilizando-se diferentes concentrações de fármacos livres e nanoencapsulados.



**Figura 21** -Avaliação da atividade antimicobacteriana de isoniazida e JVA 001. **A:** Grupos tratados com isoniazida livre *versus* JVA 001 livre; **B:** Grupos tratados com nanopartículas contendo isoniazida e JVA 001.

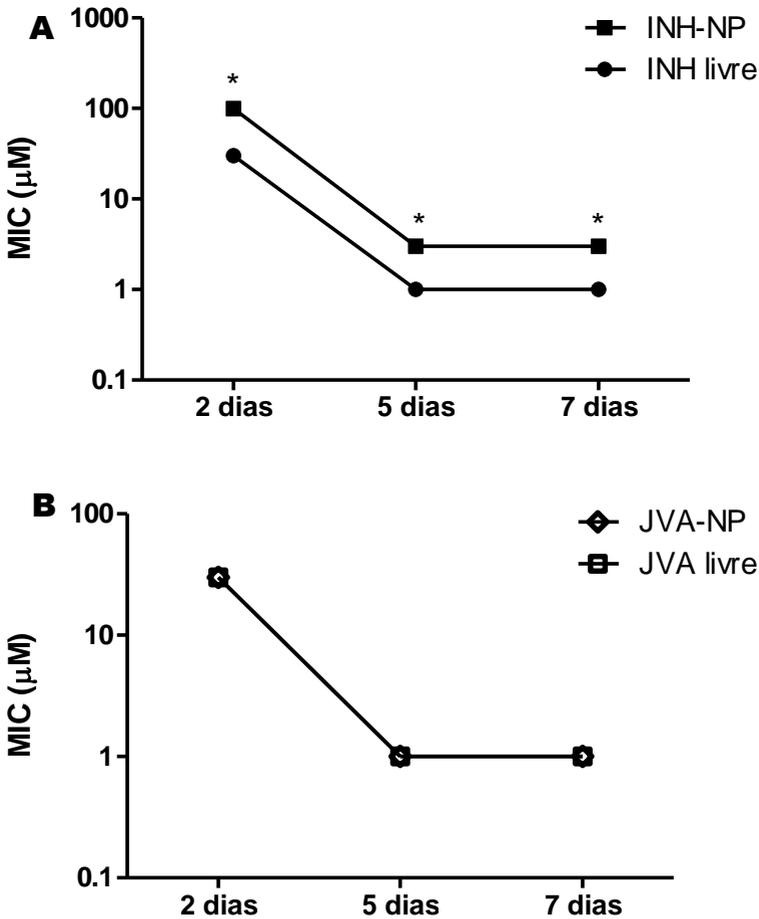
A atividade antimicobacteriana foi determinada através da redução *in vitro* do MTT pelo *M. tuberculosis* H37Rv após tratamento com fármaco livre e nanoencapsulado, em diferentes concentrações. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes, com leituras em triplicata, onde \* indica diferença significativa entre os grupos após a análise estatística empregando *teste t de Student*.

Como pode ser observado na figura 21A, o tratamento das culturas bacterianas com diferentes concentrações de JVA 001 apresentou um perfil de atividade inibitória similar ao da isoniazida livre, determinado através do modelo experimental *in vitro* padronizado no presente estudo.

Já na figura 21B observa-se que nanopartículas contendo JVA 001 apresentaram uma atividade antimicobacteriana superior à de nanopartículas poliméricas contendo INH. Constata-se uma tendência da inibição do crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em concentrações menores de JVA 001 encapsulado, quando comparado à mesma concentração de INH encapsulada. Quando encapsulado, o análogo da isoniazida, JVA 001, exerce seu efeito inibitório em concentrações a partir de 1  $\mu$ M, enquanto que nanopartículas poliméricas contendo INH inibem o crescimento micobacteriano em concentrações a partir de 3  $\mu$ M.

A concentração mínima necessária para inibir o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv foi determinada através do método do MTT após 2, 5 e 7 dias pós-tratamento, com os fármacos INH e JVA 001 livres e nanoencapsulados, e foi avaliada comparativamente conforme mostra a figura 22.

A figura 22A demonstra a diminuição na atividade antimicobacteriana de nanopartículas contendo isoniazida, verificada diretamente em culturas de *M. tuberculosis*, em relação ao fármaco livre. Por outro lado, o tratamento das culturas com JVA 001 não apresentam qualquer perda em sua eficácia quando este é administrado em sua forma nanoencapsulada. A figura 22B mostra o perfil inibitório de crescimento micobacteriano de JVA 001 nanoencapsulado, idêntico ao do fármaco livre.

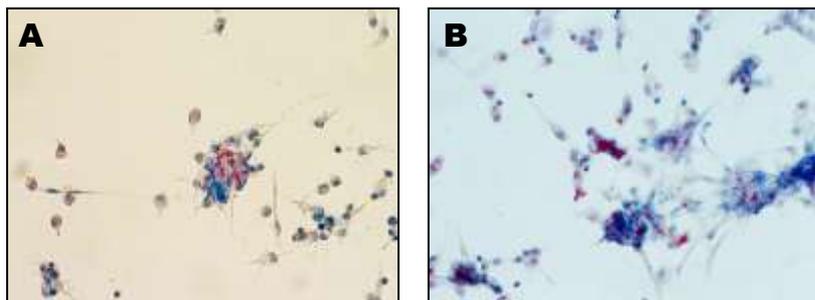


**Figura 22** - Avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) do crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv. As determinações de MIC foram realizadas através do método do MTT, após 2, 5 e 7 dias pós-tratamento com os fármacos isoniazida e JVA 001, livres e nanoencapsulados. **A**: Isoniazida livre *versus* nanoencapsulada **B**: JVA 001 livre *versus* nanoencapsulado. Estes resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes, com leituras em triplicata, onde \* indica diferença significativa entre os grupos após a análise estatística empregando *teste t de Student*.

### 5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

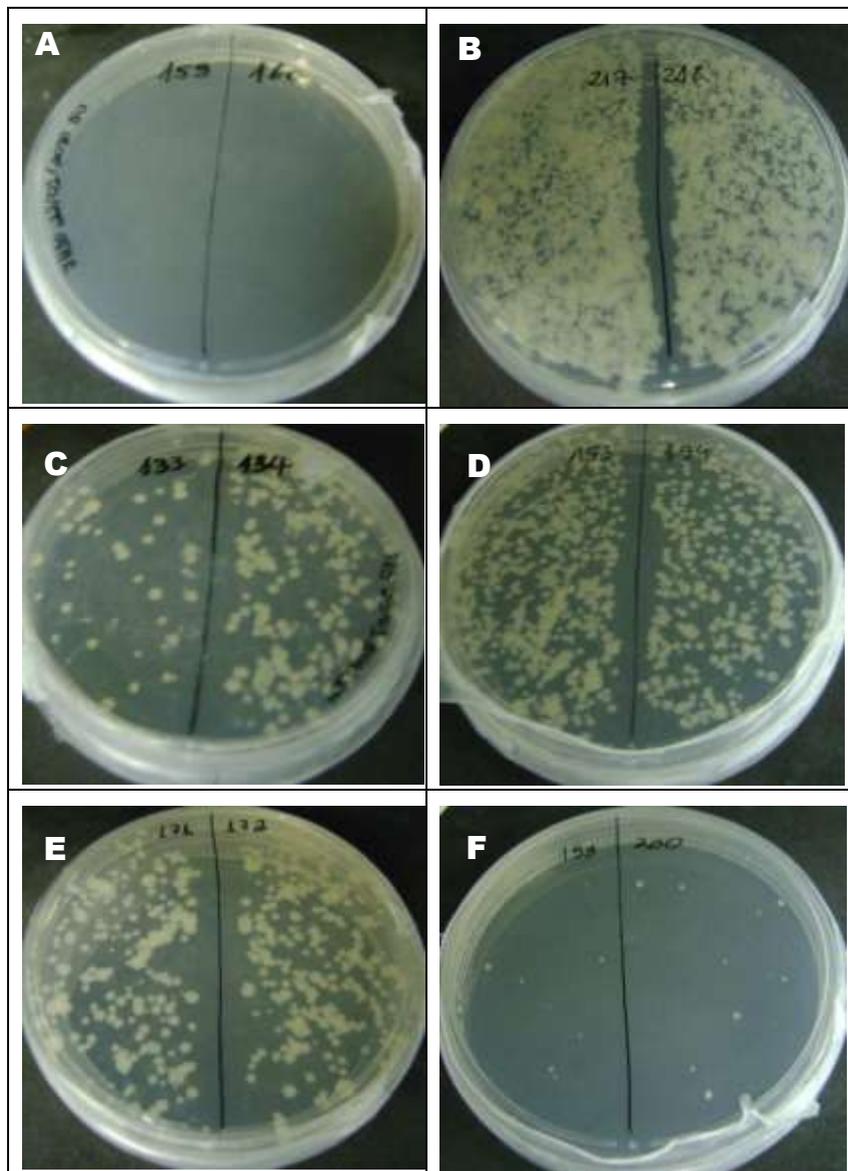
Além dos ensaios de viabilidade bacteriana pelo método do MTT, através dos quais pode-se avaliar a ação direta dos fármacos livres e nanoencapsulados sobre a viabilidade do bacilo, avaliou-se também a viabilidade antimicobacteriana em macrófagos infectados, utilizando-se o método do MTT com adaptações.

Após infecção com o *M. tuberculosis* H37Rv, os macrófagos infectados foram tratados e cultivados por 2, 4 e 6 dias. Após este período as células foram lisadas e as bactérias intracelulares liberadas a partir da lise foram semeadas em placas de Petri contendo meio 7H10. As colônias bacterianas foram contadas na placa após 28 dias de incubação, conforme descrito anteriormente. Para fins ilustrativos, imagens de culturas de macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* H37R estão representadas na figura 23.



**Figura 23** - Macrófagos em cultura infectados com *M. tuberculosis* corados com Kinyoun. A. MOI 3; B. MOI 30. As células foram incubadas por 24 horas, infectadas durante 4 horas, lavadas, e observadas em aumento de 40X.

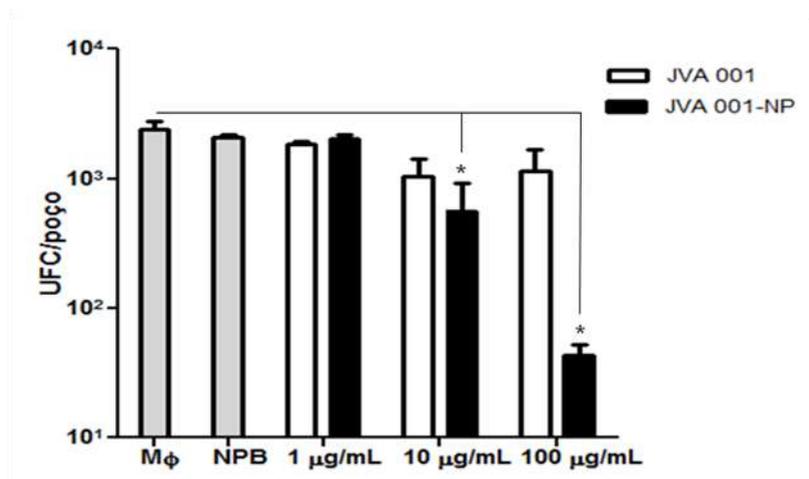
Estes macrófagos infectados foram postos em placas de Petri e, após realizada a lise celular, as bactérias liberadas para o meio de cultura, plaqueadas e incubadas, como mostra a figura 24.



**Figura 24** - Ensaio de morte intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv em macrófagos após exposição a diferentes tratamentos.

A figura 24A mostra o grupo controle negativo, com macrófagos sem tratamento, após 6 dias de incubação. Já na figura 24B observa-se o grupo controle positivo, contendo macrófagos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv, sem tratamento, após 6 dias de incubação. A figura 24C apresenta o grupo tratado com INH [100µg/mL] em cultura de macrófagos infectados pelo H37Rv, após 6 dias de incubação. A figura 24D mostra o grupo tratado com JVA [100µg/mL] composto por macrófagos infectados após 6 dias de incubação. A figura 24E mostra o grupo tratado com nanopartículas contendo INH [100µg/mL] e a figura 24 F mostra o grupo tratado com nanopartículas contendo JVA [100µg/mL], após 6 dias de incubação.

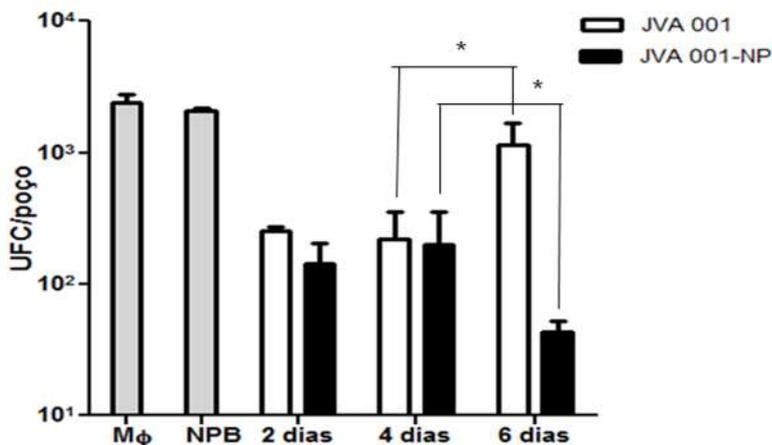
Os resultados obtidos a partir do modelo experimental de infecção de macrófagos por *M. tuberculosis* H37Rv em cultura, após o tratamento com diferentes concentrações de fármacos livres e encapsulados, estão representados graficamente na figura 25.



**Figura 25** - Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas contendo JVA001 6 dias pós-tratamento com diferentes concentrações de JVA 001 nanoencapsulado. As determinações foram realizadas através do método do MTT, em macrófagos murinos (MΦ) infectados com *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes, com leituras em triplicata, onde \* indica diferenças significativas entre os grupos, após a análise estatística dos dados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

Os dados apresentados na figura 25 demonstram a diminuição na viabilidade intracelular de *M. tuberculosis*, 6 dias após o tratamento único com 100 µg/mL de JVA 001 nanoencapsulado quando comparado aos demais grupos tratados, caracterizando o efeito inibitório dose-dependente efetivamente maior quando comparado ao fármaco livre.

A partir do mesmo modelo experimental, foram obtidos resultados que permitiram avaliar a atividade inibitória intracelular em culturas de macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* H37Rv após 2, 4 e 7 dias pós-tratamento com o fármaco nanoencapsulado, na concentração mais efetiva [100 µg/mL], determinada em experimentos anteriores já demonstrados. Estes resultados estão representados na figura 26.



**Figura 26** - Avaliação da atividade antimicobacteriana de nanopartículas contendo 100 µg/mL de JVA 001, após 2, 4 e 6 dias de tratamento. As determinações foram realizadas através do modelo de macrófagos murinos (MΦ) infectados com *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes, com leituras em triplicata, onde \* indica diferenças significativas entre os grupos, após a análise estatística dos dados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

Um efeito inibitório tempo-dependente foi observado após o tratamento das culturas de células infectadas pelo *M. tuberculosis* com o

fármaco eleito, JVA 001, livre e encapsulado. Tal efeito inibitório foi mais pronunciado em grupos tratados com JVA 001 nanoencapsulado, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando-s mais efetivo e prolongado em relação aos grupos tratados com o fármaco livre. Além disso, a inibição do crescimento micobacteriano persistiu durante todo o período de estudo, mostrando-se mais acentuada no sexto dia de estudo.

Por outro lado, os grupos tratados com a mesma concentração de fármaco livre apresentaram uma recuperação do crescimento bacteriano, que pode ser observada após 4 dias do início do tratamento.

## **6. DISCUSSÃO**

---

Embora potencialmente curativo, o tratamento farmacológico da tuberculose apresenta diversas limitações relacionadas à falta de adesão do paciente, atribuídas principalmente aos longos regimes terapêuticos (6 a 9 meses), ocorrência de toxicidade e à manifestação de inúmeros efeitos adversos em pacientes tratados (GELPERINA et al., 2005). Estas limitações têm sido relacionadas ao desenvolvimento de resistência bacteriana às diferentes classes de antimicrobianos, motivando a investigação e a descoberta de novas moléculas ativas contra o *M. tuberculosis*, bem como o estudo e a criação de novos esquemas terapêuticos que aumentem a eficácia do tratamento.

O Ministério da Saúde do Brasil propôs recentemente um novo esquema terapêutico para o tratamento da tuberculose, vigente a partir de 2009. Dentre as alterações, destacam-se a introdução de um quarto fármaco, o etambutol, durante os dois primeiros meses de tratamento, e a associação dos quatro fármacos – isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol – formulados em um único comprimido, formando a dose fixa combinada (VRANJAC, 2010).

A isoniazida possui uma das mais simples e eficazes estruturas químicas já sintetizadas, apresentando excelente atividade inibitória contra o *M. tuberculosis*. Por esta razão, permanece como fármaco de primeira escolha na terapia farmacológica da tuberculose (VILCHÈZE & JACOBS, 2007).

Por tratar-se de um tradicional tuberculostático, a isoniazida foi eleita como estrutura líder do presente estudo. Inicialmente, estudos de pré-formulação foram conduzidos para encapsular esta molécula em sistemas poliméricos nanoparticulados, visando o aumento da permeabilidade intracelular do fármaco. Estes sistemas foram formados a partir de um polímero bem descrito na literatura, o PLGA, e utilizado neste tipo de formulação há mais de uma década.

A escolha do polímero baseou-se na versatilidade deste copolímero, composto por monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos, além do fato de ser um polímero aprovado para o uso em humanos pelo FDA. Considerando as diferentes proporções de ácido lático e glicólico disponíveis, este polímero permite o controle de importantes características dos sistemas de liberação formados, tais como tempo de liberação, capacidade de incorporação tanto de fármacos polares como apolares e funcionalização de superfície.

Vários métodos têm sido descritos para a obtenção de nanopartículas de PLGA encapsulando fármacos, como estratégias terapêuticas promissoras para o tratamento da tuberculose. A maioria

deles pode ser inserida no grupo de técnicas envolvendo a polimerização *in situ* de monômeros ou co-polímeros pré-formados, como é o caso do PLGA.

Dentre os métodos de obtenção de nanopartículas, podemos citar a dupla emulsão com evaporação do solvente, a nanoprecipitação e *salting-out*. A seleção da técnica que melhor se adapta à obtenção de nanopartículas, resultando em elevado teor de fármaco encapsulado e características morfológicas ideais, baseou-se, sobretudo, nas características físico-químicas do fármaco combinada à escolha do polímero (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

O maior desafio para a encapsulação de fármacos hidrofílicos é a perda do fármaco para a fase aquosa da emulsão, durante a formação das nanopartículas. Juntamente com a difusão para a fase externa, o material restante pode migrar para a superfície da partícula antes que ela se endureça. Para minimizar esses problemas, as gotículas orgânicas contendo polímero devem ser endurecidas em nanopartículas o mais rapidamente possível após a sua formação (BILATI et al., 2005).

Neste trabalho, três técnicas descritas na literatura foram testadas para a nanoencapsulação dos fármacos em matrizes poliméricas compostas de PLGA. Foram elas a dupla emulsão com evaporação do solvente (PANDEY et al., 2003), *salting-out* (SONG et al., 2008) e nanoprecipitação (BARICHELLO et al., 1999).

A preparação de nanopartículas de PLGA contendo isoniazida foi primeiramente testada empregando-se uma técnica que envolve a formação de uma dupla emulsão, uma vez que é conhecido que fármacos hidrofílicos podem facilmente se difundir em direção à fase aquosa da preparação e conduzir à obtenção de baixos valores de eficiência de encapsulação (PELTONTEN et al., 2004; BILATI et al., 2005; SONG et al., 2008).

No entanto, o estudo preliminar utilizando diferentes proporções fármaco:polímero através desta técnica resultou em eficiências de encapsulação muito baixas, com valores entre 0,77 e 8,14%. Além disso, o diâmetro médio de partícula obtido com esta técnica foi avaliado microscopicamente, apresentando valores de tamanho de partícula superiores a 1 micrômetro, como observado na tabela 7.

No entanto, estes resultados iniciais foram importantes e possibilitaram a comparação entre as eficiências de encapsulação obtidas com diferentes proporções de fármaco:polímero, mostrando uma tendência de aumento nos valores de eficiência de encapsulação na

proporção 1:5, empregada nas formulações F1 e F6. Desta forma, tal proporção foi selecionada como base para o início dos estudos de pré-formulação com outras técnicas de obtenção de nanopartículas.

Desta forma, compreende-se que os valores de eficiência de encapsulação encontrados nas formulações após o ajuste da fase aquosa a pH 5,0 não foram significativamente maiores, provavelmente porque a hidrofília do fármaco não tenha sido afetada pela variação do pH.

Estes resultados iniciais levaram à conclusão de que a técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente não se mostrou adequada para a nanoencapsulação desta entidade química, a isoniazida. Por esse motivo, um novo estudo de formulação foi conduzido utilizando-se desta vez outra técnica indicada para encapsulação de fármacos hidrofílicos. Esta técnica foi a nanoprecipitação, adaptada da metodologia descrita por BILATI e colaboradores, em 2005. Este método de preparação foi ainda combinado com outra técnica de obtenção descrita na literatura, o *salting-out*, entretanto não apresentou vantagens em relação à nanoprecipitação. Desta forma, a técnica de nanoprecipitação foi padronizada para utilização nos experimentos com a molécula de JVA 001 e de avaliação da atividade antimicrobacteriana, conforme descrito a seguir.

Nanopartículas obtidas pela técnica de nanoprecipitação apresentaram uma eficiência de encapsulação da isoniazida três vezes maior que aquelas obtidas utilizando-se a técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente, partindo-se de um valor máximo de 8,14%, obtido pela técnica de dupla emulsão, para um valor máximo de 22,59%, obtido por nanoprecipitação.

Além disso, nanopartículas formadas por esta técnica apresentaram dimensões nanométricas e o valor de pH mais próximo ao fisiológico; enquanto que partículas obtidas pela técnica de dupla emulsão apresentaram diâmetro médio maior que 1 micrômetro. A análise estatística destes dados indicou que a técnica empregada afetou significativamente a eficiência de encapsulação de fármaco no interior das nanopartículas. Além disso, estudos na literatura (GOVENDER et al., 1999; SHARMA et al., 2004) sugerem que, no caso de fármacos hidrofílicos como a isoniazida, uma fração do fármaco adicionado à formulação esteja associada às nanopartículas poliméricas por adsorção, em decorrência da alta hidrofília do fármaco e da superfície hidrofílica das partículas.

Após a análise comparativa dos resultados obtidos por dupla emulsão, nanoprecipitação e *salting-out*, apresentados nas figuras 11 e

12, a técnica utilizada para a obtenção das nanopartículas poliméricas foi a deposição interfacial do polímero ou nanoprecipitação, primeiramente descrita em 1989 por FESSI e colaboradores.

O princípio de formação das nanoesferas por esta técnica tem sido explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, permitindo que gotas submicrométricas sejam formadas e estabilizadas por uma camada de polímero que se deposita na interface entre a fase interna, contendo o fármaco, e a fase externa da emulsão, fornecendo uma barreira mecânica para a coalescência (BILATI et al., 2005).

A utilização desta técnica mostrou inúmeras vantagens, tais como rapidez e facilidade de preparação, não sendo necessários longos períodos de agitação ou sonicação das amostras, nem tampouco a utilização de altas temperaturas, o que poderia resultar em degradação dos fármacos. Além disso, a nanoprecipitação foi capaz de produzir partículas de tamanhos bastante reduzidos, com baixos índices de polidispersão (BILATI et al., 2005).

A nanoprecipitação pode ser utilizada para a encapsulação de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas. Porém, a eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas é geralmente baixa, devido à migração destas para a fase aquosa (SONG et al., 2008). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos. A variação de parâmetros como o pH da fase aquosa e a adição de novos excipientes às formulações vem sendo explorada com sucesso na melhoria da encapsulação destes fármacos (GOVENDER et al., 1999; BARICHELLO et al., 1999).

No entanto, com o aumento da hidrofobicidade molecular obtida através da conjugação do grupamento citral à molécula de isoniazida, obteve-se aumento de cerca de 200% na eficiência de encapsulação, o que equivale a um aumento de aproximadamente 7 vezes no teor de fármaco encapsulado. Este aumento foi atribuído ao modo de associação do fármaco à matriz polimérica, e à diminuição da afinidade do fármaco pela fase aquosa da emulsão.

Trabalhos na literatura demonstram a empregabilidade de ferramentas, como por exemplo, DSC e difração de raios X em estudos de pré-formulação. No caso das nanopartículas, esta técnica é utilizada para a verificação da presença e intensidade de interações intermoleculares entre o fármaco e a matriz poliméricas (GUTERRES et al., 1995).

Diferenças na forma cristalina do análogo sintetizado foram detectadas através da análise dos difratogramas de raios-X apresentados na figura 18, nos quais a isoniazida apresenta 6 picos principais de difração, o que caracteriza sua cristalina ortorrômbica. Já o JVA 001 apresenta em seu espectro um número maior de picos de difração, além do surgimento de uma intensa reflexão em  $42,9^\circ$ , evidenciando que a conjugação de um grupamento provocou alterações na estrutura cristalina da molécula.

A técnica de difratometria exploratória diferencial permite a rápida avaliação de possíveis interações entre fármacos e excipientes através do aparecimento, deslocamento ou desaparecimento de eventos endotérmicos ou exotérmicos nas curvas DSC de misturas de fármaco-excipiente (RABEL, 1999).

A análise térmica engloba um grupo de técnicas nas quais uma propriedade da amostra é analisada em função do tempo ou temperatura, enquanto é aquecida ou resfriada, em uma atmosfera específica, em proporção fixa de mudança de temperatura ou temperatura constante. A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC), tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização das matérias-primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (GIRON, 1986).

Na área de micro e nanoencapsulação, os métodos termoanalíticos vêm sendo amplamente utilizados para a análise dos polímeros, principalmente através da avaliação do grau de cristalinidade, bem como para verificar a presença de interações entre o fármaco e a matriz polimérica (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; GRUNENBERG et al., 1996).

Neste trabalho, as curvas DSC do polímero empregado para preparação das nanopartículas, o PLGA, e dos fármacos utilizados na preparação dos sistemas nanoestruturados, isoniazida e JVA 001, foram obtidas na faixa de temperatura compreendida entre 0 e  $230^\circ\text{C}$ , e encontram-se demonstradas na figura 17.

A curva DSC obtida para o PLGA evidencia a transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero na temperatura de  $49,3^\circ\text{C}$ , condizente com a  $T_g$  descrita na literatura (TÜRK et al., 2009). Além disso, não foi observado evento endotérmico característico de fusão, sugerindo assim que o polímero não apresenta um estado cristalino definido, o que demonstra sua natureza amorfa.

Observa-se que o polímero apresenta um comportamento tipicamente amorfo e, à medida que o processo de degradação avança,

ocorre o aparecimento de picos endotérmicos nas curvas DSC dos fármacos livres e nanopartículas contendo fármacos. Picos indicam eventos térmicos relacionados à degradação térmica dos cristais de fármaco (LI & MCCARTHY, 1999).

As curvas DSC referentes à isoniazida pura, JVA 001 e às nanopartículas brancas e contendo fármaco estão representadas na figura 13. A amostra de isoniazida caracterizada termicamente apresentou um evento endotérmico na faixa de temperatura entre 170,45 – 177,31 °C, característico do processo de fusão deste fármaco ( $T_{\text{pico}} = 172,51$  °C;  $\Delta H_{\text{fusão}} = -234,22$  J/g). Já no caso do seu derivado hidrofóbico, alterações na estrutura cristalina do fármaco refletiram em seu comportamento térmico, apresentando um evento endotérmico na faixa de temperatura entre 113,55 – 132,10 °C, relativo ao processo de transição cristalina ( $T_{\text{pico}} = 124,83$  °C;  $\Delta H_{\text{fusão}} = -81,88$  J/g).

Em relação à amostra de nanopartículas contendo isoniazida, é possível observar a ocorrência de um evento endotérmico, ainda que sutil, na faixa de temperatura entre 169,02 – 189,73 °C, próxima à faixa de temperatura observada com o fármaco livre. Entretanto o comportamento térmico de nanopartículas contendo isoniazida foi muito semelhante àquele observado na análise de nanopartículas brancas (placebo). Por outro lado, a análise da amostra de nanopartículas contendo JVA 001 apresentou um comportamento térmico distinto, tendo sido observados dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 121,42 °C ( $\Delta H_{\text{fusão}} = -4,30$  J/g) e 184,95 °C ( $\Delta H_{\text{fusão}} = -6,04$  J/g).

Conclui-se, portanto, que a presença de JVA 001 em nanopartículas de PLGA deslocou o evento endotérmico ocorrido em 124,83 °C para 121,42 °C, com o surgimento de um novo evento endotérmico na temperatura de 184,95 °C, sugerindo a presença de interação entre o fármaco e a matriz polimérica. Cabe salientar que, no caso de sistemas nanoestruturados poliméricos, a interação entre o fármaco e o sistema é esperada, demonstrando assim que o fármaco encontra-se encapsulado ou de certa forma ligado à matriz polimérica.

A baixa eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos é um problema conhecido e relatado na literatura (GOVENDER et al., 1999; BILATI et al., 2005; PELTONEN et al., 2004), sendo que sua encapsulação constitui um grande desafio para os pesquisadores desta área. Deste modo, atribuiu-se a baixa eficiência de encapsulação da isoniazida à sua alta hidrossolubilidade (140 mg/mL) e grande afinidade pela fase aquosa durante o processo de preparação das nanopartículas, mais especificamente na etapa de emulsificação, onde a isoniazida tende

a se difundir do interior das partículas para a fase externa da emulsão. Visando contornar este problema, algumas técnicas foram empregadas como artifícios para aumentar a eficiência, como a variação do pH da fase externa e saturação da solução aquosa através da adição de  $\text{CaCl}_2$  (*salting-out*). As nanopartículas obtidas por nanoprecipitação com diferentes valores de pH da fase externa, ajustados para 5,0; 7,0 e 9,0, apresentaram diferenças significativas relacionadas à eficiência de encapsulação da isoniazida. Além disso, associada à nanoprecipitação, a técnica de *salting-out* foi empregada através da adição de 0,1 e 1,0% de cloreto de cálcio visando a saturação da solução aquosa da emulsão.

Estudos mostram que a adição de sais eletrólitos à formulação afeta o gradiente osmótico entre a fase interna e a fase externa, e que isto pode ter um impacto na eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos (UCHIDA et al., 1997; FREYTAG et al., 2000). Além disso, a adição de sais de cloreto alteram as propriedades da fase externa de uma emulsão óleo/água. No entanto, a adição de sal à fase externa da emulsão tem um impacto maior nas características superficiais de partícula, apesar da eficiência de encapsulação não ter sido marcadamente beneficiada na prática (PELTONEN et al., 2004).

No presente estudo, resultados obtidos experimentalmente demonstram que a adição de eletrólitos à fase externa da emulsão não foi efetiva em aumentar a eficiência de encapsulação da isoniazida em nanopartículas de PLGA obtidas pela técnica de nanoprecipitação.

Trabalhos demonstram que sistemas constituídos de PLGA encapsulando a isoniazida apresentam eficiência de encapsulação entre 11-16% (DUTT et al., 2001). Neste trabalho, sistemas carreadores poliméricos nanoparticulados, contendo isoniazida, apresentaram eficiência de encapsulação média de 20%.

Visto os baixos valores de encapsulação obtidos para nanopartículas poliméricas, obtidas através do emprego de três diferentes técnicas de preparação, partiu-se para uma nova estratégia visando o aumento da eficiência de encapsulação, que consistiu na derivatização molecular da isoniazida. Buscando-se o aumento da hidrofobicidade molecular, de modo a diminuir a tendência de difusão do fármaco para a fase aquosa, conjugou-se através de síntese orgânica, grupamento citral à molécula de isoniazida, tornando-a mais hidrofóbica.

No ano de 2002, ZHOU e colaboradores demonstraram um aumento de 220 vezes na hidrofobicidade da isoniazida, obtido através da conjugação da molécula com cátions hidrofóbicos provenientes de

tetralquilamônio, mostrando uma estratégia alternativa para a encapsulação da isoniazida em micropartículas de PLGA.

A lipofilicidade é uma das mais importantes características físico-químicas da molécula, a qual determina significativamente o comportamento de novas entidades químicas em um sistema bifásico. Em termos biológicos, a lipofilicidade determina a solubilidade de fármacos em fluidos biológicos, penetração através de membranas, taxa de absorção no trato gastrointestinal, afinidade pelo plasma e proteínas teciduais e distribuição em compartimentos específicos do corpo ou acumulação no organismo (PLISKA et al., 1996).

Além de estar relacionada com a farmacodinâmica, a lipofilicidade afeta também a farmacocinética de potenciais novos fármacos. Portanto, a determinação da lipofilicidade no estágio inicial do desenvolvimento pode evitar problemas relacionados a baixas propriedades de ADME - absorção, dissolução, metabolização e excreção - melhorando desta forma sua eficácia terapêutica (MRKVICKOVÁ et al., 2008).

O método experimental para determinação da lipofilicidade baseia-se na partição da molécula em um sistema composto por duas fases imiscíveis. Além dos métodos experimentais, o log P pode ser estimado através de programas computacionais baseados em diversos modelos matemáticos. Os modelos matemáticos mais freqüentemente utilizados baseiam-se nas subestruturas, o qual prediz o log P considerando a contribuição de cada fragmento da molécula; ou na molécula como um todo, no qual características moleculares como lipofilicidade potencial, propriedades moleculares como volume, peso molecular e área de superfície (MRKVICKOVÁ et al., 2008).

O aumento da hidrofobicidade molecular, caracterizada pelo coeficiente de partição óleo / água e representado pelo log P, aumenta não só a permeabilidade de fármacos através de membranas celulares lipoprotéicas, como também facilita a encapsulação de fármacos em sistemas poliméricos nanoestruturados formados por PLA e PLGA (WISCHKE et al., 2008).

Neste trabalho, valores obtidos experimentalmente mostraram-se muito próximos aos valores preditivos estimados por quimioinformática. O valor experimental obtido nas análises com JVA 001 foi  $\log P=3,174$ , condizente com o valor preditivo,  $\log P=3,203$ . Estes valores confirmam o aumento de hidrofobicidade, resultante da conjugação de um grupamento hidrofóbico à molécula de isoniazida do novo análogo da isoniazida, JVA 001, em relação aos valores teóricos e

preditivos da molécula de isoniazida,  $\log P = -0,8$ . Valores negativos de  $\log P$  indicam que a molécula é hidrofílica, ou seja, apresenta maior afinidade pela água; enquanto que valores positivos de  $\log P$  indicam hidrofobicidade molecular.

O JVA 001 apresentou atividade inibitória equivalente à da isoniazida *in vitro*, além de ter proporcionado um aumento na eficiência de encapsulação na ordem de 200%. O aumento na encapsulação do novo análogo refletiu em aumento da atividade de nanopartículas contendo o JVA 001, consistente com a maior inibição do crescimento do patógeno intracelular, observado em cultura de macrófagos infectados *in vitro*.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície de nanopartículas poliméricas, o qual é influenciado por mudanças na interface entre o polímero e o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão.

As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Quando administrados intravenosamente, sistemas de nanopartículas convencionais são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação. Diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico como o polietilenoglicol.

A determinação do potencial zeta também pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas. Um exemplo desta abordagem é dado no trabalho de BLANCO & ALONSO em 1997, onde o potencial zeta de nanoesferas foi determinado para se inferir sobre o mecanismo pelo qual o fármaco, sulfato de amicacina, interage com o PLGA.

Desta forma, foi verificado que, quando o fármaco foi adicionado às nanopartículas em quantidades crescentes, a redução, em módulo, do potencial zeta foi concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco. Naquele trabalho, os autores sugerem que ocorre uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero.

Informações relevantes sobre a estabilidade de nanopartículas em suspensão podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de

degradação do polímero. Em trabalho realizado por CALVO e colaboradores (1996) foi verificada uma diminuição da massa molar da PLGA em suspensões de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com conseqüente diminuição do pH destas formulações.

No entanto, a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PLGA apresentaram redução dos valores de pH, em período de 3 a 5 meses. Este fato foi atribuído à exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pelo relaxamento das cadeias poliméricas.

Neste trabalho, realizou-se o monitoramento do pH nas suspensões de nanopartículas durante o período de armazenamento. Não foram observadas diferenças significativas na diminuição do pH das suspensões de nanopartículas placebo (NPB), nem daquelas contendo os fármacos isoniazida e JVA 001. Esta estabilidade aumentada em relação à literatura foi atribuída às condições de armazenamento, nas quais as partículas permaneceram congeladas a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Diferentes técnicas de microscopia têm sido empregadas para a caracterização morfológica de nanopartículas poliméricas, afim de observar a forma e características de superfície, como porosidade e deposição de cristais na superfície das partículas. Além disso, partículas obtidas utilizando a técnica de nanoprecipitação apresentaram diâmetro médio submicrônico, ou seja, menor do que  $1\ \mu\text{m}$ , o que pode ser observado através da análise das imagens obtidas por microscopia óptica. O diâmetro médio da partícula obtido com a técnica de nanoprecipitação encontrou-se dentro da faixa de tamanho desejável para administração pela via pulmonar (VERMA et al., 2008).

O emprego da nanotecnologia torna possível a vetorização de agentes antimicrobianos e tem sido bem descrito na literatura, especialmente relacionado à entrega intracelular de agentes antimicobacterianos a macrófagos infectados. Muitos microrganismos são capazes de sobreviver dentro de células fagocíticas, através de mecanismos de proteção e subversão da resposta imune do hospedeiro e de resistir ao tratamento farmacológico, devido à baixa penetração destes fármacos nos macrófagos infectados (HEARN et al., 2009).

Infecções por *M. tuberculosis* e *M. avium* têm recebido atenção especial devido ao aumento da incidência, freqüentemente associada à infecção pelo vírus HIV. A encapsulação de vários antibióticos tem sido

bem sucedida, apresentando aumentos na atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados *in vitro* e em modelos de infecção *in vivo* (ZHANG et al., 2010).

No caso da tuberculose, a incorporação de fármacos em nanopartículas visa o aumento da biodisponibilidade intracelular, através da indução da fagocitose por estas células de forma a facilitar a entrega intracelular de fármacos, caracterizando seu emprego como carreador (PANDEY et al., 2003, SHARMA et al., 2004, VERMA et al., 2008).

O pH da fase aquosa afeta o grau de ionização de fármacos e, logo, sua solubilidade. Um fármaco ionizado tende a permanecer na fase aquosa, enquanto que sua forma molecular estará mais provavelmente associada à fase orgânica contendo o polímero, o que favorece a encapsulação de fármacos. Estudos sugerem que o simples ajuste do pH da fase externa poderia aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos no interior de nanopartículas de PLGA (FREYTAG et al., 2000; PELTONEN et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a variação de parâmetros como o pH da fase aquosa e a adição de novos excipientes às formulações podem melhorar significativamente a encapsulação de fármacos hidrofílicos (GOVENDER et al., 1999; BARICHELLO et al., 1999; LEO et al., 2004). Desta forma, a tentativa de aumentar a eficiência de encapsulação de fármaco baseou-se no trabalho de FARIA e colaboradores (2005) que demonstra melhores eficiências de encapsulação obtidas através da acidificação da fase aquosa, ajustada a pH 3,0.

Apesar de estudos sugerirem que o controle do pH da fase aquosa poderia favorecer a encapsulação de fármacos, mudanças significativas nos valores de encapsulação de isoniazida não foram observadas no presente estudo. Já que a alteração do pH não ofereceu benefícios, os estudos seguintes foram realizados com pH 7,0 devido simplesmente à maior proximidade das condições fisiológicas.

Neste trabalho, a eficiência de encapsulação média da isoniazida foi de 21%. A baixa eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas é amplamente descrita na literatura (GOVENDER et al., 1999; BARICHELLO et al., 1999; LEO et al., 2004), principalmente devido à facilidade de migração do fármaco para a fase externa.

Em 2000, GOVENDER e colaboradores estudaram as propriedades de incorporação do cloridrato de procaína em

nanopartículas preparadas por nanoprecipitação, e encontraram valores de eficiência que variaram de 6,44 a 10,67 %. Estes baixos valores de eficiência foram atribuídos à ampla área de superfície das partículas devido à presença do copolímero que, juntamente com a natureza hidrossolúvel do fármaco, acelera a perda do fármaco para a fase aquosa durante a nanoprecipitação.

A avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenamento, é de fundamental importância (MAGENHEIM & BENITA, 1991). O tamanho de partícula, potencial zeta, teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitoramento da estabilidade de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). Entretanto, poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas comparando diferentes fármacos são encontrados na literatura.

Considerando a importância do estudo de estabilidade destes sistemas coloidais, nanopartículas de PLGA contendo isoniazida e JVA 001 foram armazenadas à temperatura de congelamento (-20 °C) para a avaliação, em tempos pré-determinados, de parâmetros como teor de fármaco, pH em suspensão, tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial, representado pelo potencial zeta.

O diâmetro médio de partícula foi avaliado nas suspensões de nanopartículas brancas e contendo os fármacos, nos tempo zero e após 15, 30 e 60 dias de preparação, mantida à temperatura de -20 °C.

Após 60 dias de armazenamento, todas as formulações apresentaram um aumento significativo do tamanho de partícula. O aumento do diâmetro médio das nanopartículas após o armazenamento poderia estar relacionado com a diminuição do pH das formulações, conforme proposto por CALVO e colaboradores (1995), em estudo que demonstra que modificações no pH provocam uma diminuição no potencial zeta em suspensões de nanopartículas e, como consequência, diminuição das forças repulsivas entre as partículas favorecendo a coalescência e aumentando o tamanho.

Outro fator que pode estar relacionado ao aumento do tamanho de partícula é a degradação do polímero. O processo de degradação diminui o efeito estabilizador da cobertura polimérica, facilitando assim os processos de agregação e coalescência que conseqüentemente aumentam o tamanho médio das partículas. Através da avaliação macroscópica das formulações, durante todo o período de armazenamento, foi possível observar que após os 45 dias todas as

formulações se apresentaram aglomerados e precipitados, o que certamente contribuiu para o aumento do tamanho médio das partículas e do índice de polidispersão, que sofreu um aumento estatisticamente significativo após os 60 dias em todas as formulações avaliadas (*teste t de Student*,  $p < 0,05$ ).

A concentração total de fármaco nanoencapsulado, isoniazida ou JVA 001, foi verificada nos tempos zero, 15, 30 e 60 dias, sendo que as médias dos valores quantificados, expressas como teor de fármaco ( $\mu\text{g/mL}$ ), encontram-se na figura 19.

Em relação às nanopartículas de PLGA obtidas neste trabalho, é possível concluir através de uma análise da variância ( $p < 0,05$ ) que não há diferença significativa nas concentrações totais de isoniazida e JVA 001 nas formulações mantidas sob condições de congelamento considerando-se o período compreendido entre sua obtenção (tempo zero) e 60 dias de armazenamento.

As concentrações dos fármacos permaneceram constantes no decorrer do período até a conclusão do estudo. Os dados obtidos no estudo de estabilidade garantem a qualidade das nanopartículas utilizadas nos experimentos *in vitro*, assegurando a concentração de fármaco administrado às culturas bacterianas durante a avaliação de atividade antimicobacteriana.

Informações relevantes sobre a estabilidade dos sistemas nanoestruturados podem ser obtidas mediante monitoramento do pH em função do tempo. Neste trabalho, nanopartículas de PLGA, mantidas em condições de congelamento mantiveram seus valores de pH constantes ao longo de 60 dias de avaliação, conforme observa-se na figura 19.

Os valores de pH não apresentaram diferenças significativas ao longo do estudo, ressaltando a estabilidade das formulações após 2 meses de armazenamento sob as condições de armazenamento, ressaltando que a diminuição nestes valores poderiam caracterizar a liberação de ácido láctico e glicólico no meio aquoso da suspensão, provenientes da degradação da matriz polimérica como consequência de processos hidrolíticos (CALVO et al., 1995). A diminuição do pH também poderia ser atribuída à ionização ou hidrólise de grupos carboxílicos terminais presentes no PLGA (GUTERRES et al., 1995).

Finalmente, a análise estatística dos resultados indicou uma diminuição significativa, em módulo, nos valores de potencial zeta das suspensões de nanopartículas avaliadas durante o estudo de estabilidade, tanto para as formulações contendo isoniazida quanto para aquelas contendo JVA 001 (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Esta redução foi atribuída à

redução dos valores de cargas repulsivas o que provavelmente favoreceu a coalescência e, conseqüentemente, o aumentando no diâmetro médio de partícula na etapa final do estudo.

Sendo assim, é possível concluir que, apesar do aumento no tamanho médio das partículas após 60 dias de estudo, bem como a diminuição do potencial zeta ocorrida após 30 dias de armazenamento não interferem de forma significativa no teor de fármaco encapsulado nas nanopartículas poliméricas utilizadas nos testes em cultura.

Em relação ao modelo experimental utilizado, testes de viabilidade bacteriana com a cepa de laboratório *M. tuberculosis* H37Rv foram conduzidos utilizando-se o método do MTT para a avaliação da atividade antimicobacteriana dos fármacos livres e nanoencapsulados. A viabilidade celular do *M. tuberculosis* foi avaliada após o tratamento das culturas bacterianas com diferentes concentrações, tanto de fármaco livre quanto nanoencapsulado, e apresentou-se variável e dependente da concentração de fármaco administrada.

Contudo, estes resultados obtidos a partir de cepas de laboratório, corroboram com dados de MIC (concentração inibitória mínima) apresentados na literatura onde o tratamento com os fármacos livres, tanto isoniazida como JVA 001, inibiu o crescimento micobacteriano a partir de 1  $\mu$ M.

Já nos testes com os fármacos nanoencapsulados, foi possível observar que enquanto o tratamento com a isoniazida inibiu o crescimento micobacteriano a partir da concentração de 3  $\mu$ M, o JVA 001 nanoencapsulado mostrou-se mais eficaz, impedindo a proliferação do bacilo em concentrações mais baixas, a partir de 1  $\mu$ M.

Em relação ao tempo de tratamento das culturas de *M. tuberculosis* com concentrações de fármaco que se mostraram mais efetivas *in vitro*, tanto o tratamento com JVA 001 quanto com isoniazida apresentaram inibição de crescimento a partir do 5º dia de tratamento.

Os fármacos nanoencapsulados mostraram-se mais eficazes neste estudo preliminar, considerando que estes dados precisam ser melhores avaliados frente à cepas clínicas resistentes e sensíveis aos fármacos utilizados neste trabalho, isoniazida e JVA 001. Além disso, estes resultados são promissores e sugerem uma melhor avaliação através de estudos *in vivo*.

No entanto, o conjunto de dados obtidos neste trabalho confirma a empregabilidade de sistemas de liberação nanoestruturados no tratamento da tuberculose, permitindo sugerir uma melhor investigação destes sistemas visando sua utilização no incremento do

esquema terapêutico no tratamento da tuberculose, doença esta intimamente ligada à situação social que acomete principalmente países subdesenvolvidos, e em desenvolvimento como é o caso do Brasil.

## **7. CONCLUSÕES**

---

O acoplamento do grupo citral à molécula de isoniazida resultou em um análogo hidrofóbico, denominado JVA 001, o que possibilitou o aumento significativo da eficiência de encapsulação do fármaco em nanopartículas de PLGA, com conseqüente aumento de atividade antimicobacteriana *in vitro*.

Neste trabalho, nanopartículas de PLGA contendo JVA 001 apresentam-se como promissores sistemas de liberação de fármacos para posteriores estudos de atividade *in vivo* e de toxicidade.

## **8. REFERÊNCIAS**

---

ALTAMIRANO, M., MAROSTENMAKI, J., WONG, A., FITZGERALD, M., BLACK, W.A., SMITH, J. A. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of Infectious Disease** (169) 1162-5, 1994.

AMIDON, G. **Biopharmaceutics Classification System**. FDA – U.S. Food and Drug Administration, 2006.

ATHANASIOU K.A., NIEDERAUER G.G., AGRAWAL C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials** (17) 93-102, 1996.

ATS (American Thoracic Society). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the Infectious Disease Society of America. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** (161) 1376-1395, 2000.

AZARMI, S. ROA, W.H. LÖBENBERG, R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews** (60) 863–875, 2008.

BAFICA A, SCANGA CA, FENG CG, LEIFER C, CHEEVER A, SHER A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Experimental Medicine**. 19;202(12) 1715-24, 2005.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; SUN UM, K.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G.; JACOBS J. R. W. R. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science** (263) 227-230, 1994.

BARICHELLO J, MORISHITA M, TAKAYAMA K, NAGAI T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Development Industry Pharmaceutical** (25) 471-476, 1999.

BHUTANI, K. A., SINGH, S.A, VIR, S.B, BHUTANI, K.K., KUMAR, R., CHAKRABORTI, K.A., JINDAL, K.C. LC and LC-MS study of stress decomposition behavior of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (43) 1213–1220, 2007.

BILATI, U., ALL'EMANN, E., DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** (24) 67–75, 2005.

BIRRENBACH, G., SPIESER, P., Nanosphere synthesis using Polyacrylate. **Journal of Pharmaceutical Sciences** (1763) 1976.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, **Annual Reviews Biochemistry** (65) 215-239, 1996.

BLANCO, M. D., ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics** (43) 287-294, 1997.

BODMEIER R., OH K.H., CHEN H. The effect of the addition of low molecular weight poly (DL lactide) on drug release from biodegradable poly (DL lactide) drug release systems. **International Journal Pharmaceutical** (51) 1-8, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª Edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002.

BRENNAM, P. J. & NAKAIDO, H. The envelop of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry** (64) 29-63, 1995.

C. T. TÜRK, C. HASÇIÇEK, N. GÖNÜL Evaluation of drug-polymer interaction in polymeric microspheres containing diltiazem

hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** 95 (3) 865–869, 2009.

CALLERI E.A., LORENZI E.A., FURLANETTO B.S., MASSOLINI A.G., CACCIALANZA, G. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (29) 1089–1096, 2002.

CALVO, M. P. S. **Desarrollo de nuevos sistemas coloidais y su aplicación en la administración tópica ocular de medicamentos.** Santiago de Compostella. Tese (Doutorado em Farmacia) – Departamento de Farmacologia y Tecnologia Farmacêutica, Universidad de Santiago de Compostela, Espanha, 1995.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsiones, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Science** (85) 530-536, 1996.

DALCOLMO, M. P.; MELO, F. A. F.; AFIUNE, J. B.; IDE-NETO, J.; SEISCENTO, M.; NORONHA, A. M. L., GERHARD-FILHO, G. Esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente. **Boletim de Pneumologia Sanitária** (3) 26-34, 1995.

ERTL, P. e SELZER, P. in: GASTEIGER, J. **Handbook of Chemoinformatics: from Data to Knowledge.** Wiley-VCH, Weinheim, p. 1336–134, 2003.

FARIA, T.J., CAMPOS, A.M., SENNA, E.L. Preparation and characterization of poly (D,L-lactide) (PLA) and poly(D,L-lactide)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. **Macromolecular Symposium** 229 (1) 228-233, 2005.

FESSI H, PUISIEUX F, DEVISSAGUET JP, AMMOURY N, BENITA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics** (55) 1-4, 1989.

VIRGINIA K. QUENZER,<sup>3</sup> ROBERT M. FERGUSON,<sup>5</sup> AND ROBERT H. GILMAN<sup>2,4</sup> FORTES, A. M. & DALCOLMO, M. P. Tuberculose multirresistente. **Pulmão** (6) 68-80, 1996.

FREYTAG T, DASHEVSKY A, TILLMAN L, HARDEE GE, BODMEIER R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. **Journal of Controlled Release** (69) 197-207, 2000.

FRANZBLAU, S.G., WITZIG, R.S., MCLAUGHLIN, J.C., TORRES, P., MADICO, G., HERNANDEZ, A., DEGNAN, M.T., COOK, M.B., Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology** 36 (2) 362–366, 1998.

GELPERINA, S. E., KHALANSKY, A. S., SKIDAN, I. N., SMIRNOVA, Z. S., BOBRUSKIN, A. I., SEVERIN, S. E., TUROWSKI, B., ZANELLA, F. E., KREUTER, J. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. **Toxicology Letters** (126) 2, 131-141, 2005

GILL, S. LÖBENBERG, R. AZARMI, T. KU, S. ROA, W. PRENNER, E. J. Nanoparticles: characteristics, mechanisms of action, and toxicity in pulmonary drug delivery—A review, **Journal of Biomedical Nanotechnology** (3) 107–119, 2007.

GILLESPIE, S.H. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 46 (2) 267-274, 2002.

GIRON, D. Applications of the termal analysis in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, 4 (6), 755-770, 1986.

HARDMAN, J.G., GILMAN, A.G., LIMBIRD, L.E. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10<sup>th</sup> Edition. Mc Graw-Hill, 2005.

GÖPFERICH A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials** (17) 103-114, 1996.

GOVENDER T, STOLNIK S, GARNETT MC, ILLUM L, DAVIS SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release** (57) 171-185, 1999.

GRUNENBERG, A., HENCK, J.O., SIESLER, H.W., Theoretical derivation and practical application of energy/temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances. **International Journal of Pharmaceutics**. (129) 147-158, 1996.

S. S. GUTERRES, H. FESSI, G. BARRATT, J. -P. DEVISSAGUET, F. PUISIEUX. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics** 113 (1, 2) 57-63, 1995.

HEARN, M.J., CYNAMON, M. H., CHEN, M.F., COPPINS, R., DAVIS, J., KANG, H.J., NOBLE, A., TU-SEKINE, B., TERROT, M.S., TROMBINO, D., THAI, M., WEBSTER, E.R. WILSON, R. Preparation and antitubercular activities in vitro and in vivo of novel Schiff bases of Isoniazid. **European Journal of Medicinal Chemistry** 1-10, 2009.

HOLZER, M.A., VOGEL. V. B., MÄNTELE, W. B, SCHWARTZ, D.C., HAASE, W. D, LANGER, K. A, Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics** (72) 428-437, 2009.

ICDD. **International Center for Diffraction Data**. Cambridge Structural Database System, 1980.

ISEMAN, M.D. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. **Procedure Natural Academic Science USA**, 91:2428-2429, 1994.

ISEMAN, M.D.; COHN, D.L., and SBARDARO, J.A. Directly observed treatment of tuberculosis. **New England Journal of Medicine** (328) 576-578, 1993.

KATZUNG, B.G. **Basic and Clinical Pharmacology**. 10<sup>th</sup> Edition, Mc Graw-Hill, 2007.

KELLEY, C.L.; ROUSE, D.A., and MORRIS, S.L. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 41 (9) 2057-2058, 1997.

KOMMAREDDY, S., AMIJI, M. Poly(ethylene glycol)-modified thiolated gelatin nanoparticles for glutathione-responsive intracellular DNA delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** (3) 1, 32-42, 2007.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B., and JAMAL, L. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. **Boletim de Pneumologia Sanitária** (2) 53-61, 1998.

LANGER, K., ZIMMER, A., KREUTER, J. Acrylic nanoparticles for ocular drug delivery. **Pharmaceutical Sciences** 7 (6) 445-451, 1997.

LANGER, R., FOLKMAN, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. **Nature** 263 (5580) 797-800, 1976.

LI S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **Journal of Biomedical Material Research** (48) 342-353, 1999.

LOH, J. P., AHMED, A.E. Determination of camptothecin in biological fluids using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, (330) 367-375, 1990.

MAGENHEIM B, BENITA S. Nanoparticles characterization. A comprehensive physico- chemical approach. **Pharmaceutical Sciences** (4) 221-241, 1991.

MDLULI, K. R. A.; SLAYDEN, Z.; YAQI, S.; RAMASWAMY, X.; PAN, D.; CRANE, D. D.; MUSSER, J. M.; BARRY, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science** (280) 1607-1610, 1998.

MEHTA, S. K., KAUR, G., BHASIN, K. K. Incorporation of antitubercular drug isoniazid in pharmaceutically microemulsion: effect on microstructure and physical parameters **Pharmaceutical Research** (25) 1, 2007.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **American Review of Tuberculosis** (65) 765-767, 1952.

MIRONOV, V.L. **Fundamentals of the scanning probe microscopy**, The Russian Academy of Sciences Institute of Physics of Microstructures, Nizhniy Novgorod, 2004.

MITCHISON, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy **Tubercle** (66) 219-226. 1985.

MITCHISON, D.A., NUNN, A.J. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. **American Review Respiratory Diseases** (133) 423-430, 1986.

MORRIS, V.J.; KIRBY, A.R.; GUNNING, A.P. **Atomic force microscopy for biologists**. Second edition, Imperial College Press, London, 2001.

MRKVICKOVÁ, Z., KOVARIKOVA, P., BALIKOVA, S., KLIMES, J. Determination of lipophilicity of novel potential antituberculous agents using HPLC on monolithic stationary phase and theoretical calculations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. (48) 310-314, 2008.

MSHANA, R.N., TADESSE, G., ABATE, G., MIÖRNER, H. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology** (36) 5, 1214-1219, 1998.

MUSSER, J.M. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. **Clinical Microbiology Reviews**. (8) 496-514, 1995.

OGAWA Y., YAMAMOTO M., TAKADA S., OKADA H., SHIMAMOTO T. Controlled-release of leuprolide acetate from polylactic acid or copoly(lactic / glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and copolymer ratio of polymer. **Chemotherapy Pharmaceutical Bulletin** (36) 1502-1507, 1988.

PABLOS-MENDÉZ, A.; RAVIGLIONE, M. C.; LAZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H. L.; BUSTERO, F.; CHN, D. L.; WEEZENBEEK, C. S. B. L.; KIM, S. J.; CHAULET, P.; NUNN, P. For WHO/IUATLD.Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. **New England Journal of Medicine** (338) 1641-1649. 1998.

PANDEY, R. G.K. KHULLER, G. K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (55) 430-435, 2005.

PANDEY, R., SHARMA, A., ZAHOOR, A., SHARMA, S., KHULLER, G.K., PRASAD, B. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (52) 981-986, 2003.

PARK T.G. Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. **Journal of Controlled Release** (30) 161-173, 1994.

PELTONEN,L., AITTA, J., HYVÖNEN, S., KARJALAINEN,M., HIRVONEN, J. Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)lactide Nanoparticles. **AAPS Pharmaceutical Science Technology** 5 (1) 2004.

PLISKA, V., TESTA, B., VAN DE WATERBEEMD, H. **Lipophilicity in Drug Action and Toxicology**, Wiley, New York, 1996.

QUINTANAR-GERRERO, D.; ALEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy** (24) 12, 1113-1128, 1998.

RABEL, S. R., JONA, J. A., MAURIN, M. B. Applications of modulated differential scanning calorimetry in preformulation studies. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis** (21) 2, 339-345, 1999.

RAVIGLIONE, M. C.; SINDER, D. E.; AND KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis – Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **Journal of American Medical Association** (273) 220-226, 1995.

RISKA, P.F.; JACOBS JR, W.R., and ALLAND, D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases** 4 (2) S4-S10, 2000.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R.; SILVA, M. S.; RODRIGUES, V. S. Resistant tuberculosis: a molecular review. **Revista de Saúde Pública** (36) 525-532, 2002.

RUFFINO-NETTO, A. Impacto da reforma do setor de saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. **Boletim de Pneumologia** (7) 7-18, 1999.

SCHAFFAZICK, S. R. e GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, (26) 5, 726-737, 2003.

SCHLESINGER R.B. Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans:a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health** (15) 2, 197-214, 1985.

SHAM, J.O., ZHANG, Y. FINLAY, W.H. ROA, W.H. LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung, **International Journal of Pharmaceutics** (269) 457-467, 2004.

SHARMA, A., SHARMA, S., KHULLER, G.K., Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (54) 761–766, 2004.

SILVA, M. S. N.; SENNA, S.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, A. M.; TELLES, M. A.; KRITSKI, A. L.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Mutations in katG, inhA and ahpC genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology** (41) 4471-74, 2003.

SMITH, P. G., AND A. R. MOSS, IN BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. ASM Press, Washington, DC. 47-59, 1994.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery systems. **Journal of Controlled Release** (70) 1-20, 2001.

SONG, X., ZHAO C.Y., SHIXIANG H. A., FANGYUAN X. A., RONGLI Z. A., JUNYAO, H., ZHENG C., YUANBO, L. QIUHONG, C. A. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** (69) 445–453, 2008.

TOMIOKA H, NAMBA K. Development of antituberculous drugs: current status and future prospects. **Kekkaku** (12) 753-74, 2006.

TRUJILLO, W. F. C., e A. L. KRITSKI. **Tuberculose em Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Ed. Cultura Médica (62) 594-610, 2000.

UCHIDA T, YOSHIDA K, NAKADA Y. Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing water-soluble anesthetics with small molecular weight. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** (45) 513-517, 1997.

VERMA, R.K., KAUR, J. KUMAR, K., YADAV, A.B., MISRA, A. Intracellular time course, pharmacokinetics, and biodistribution of isoniazid and rifabutin following pulmonary delivery of inhalable

nanoparticles to mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 3195–3201 (52) 9, 2008.

VILCHÈZE, C. JACOBS, A.R.JR. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. **Annual Reviews of Microbiology** (61) 35–50, 2007.

VRANJAC, A. Changes in tuberculosis treatment. Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Revista Saúde Pública** 44 (1) 197-9, 2010.

WATTS, P. J., DAVIES, M. C., MELIA, C. D. Microencapsulation Using Emulsification/Solvent Evaporation: An Overview of Techniques and Applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems** (7) 235-259, 1990.

WHO - World Health Organization. **Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report**. March, 2009.

WILSON, T. M. & COLLINS, D. M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Molecular Microbiology** (5) 1025-1034, 1996.

WISCHKE, C., SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics** (364) 298–327, 2008.

ZAINUDIN B.M. Therapeutic aerosol: principles and practices. **Medical Journal of Malaysia**. (48) 259-268, 1993.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. (5) n. 60, p.179-88, 1999.

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, In: G. F. Harful & W. R. Jacobs Jr. **Molecular Genetics of Mycobacteria** ASM Press, 2000.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature** 358:591-593, 1992.

ZHANG, L., PORNPATTANANANGKUL, D., HU, C.M.J., HUANG, C.M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry** (17) 585-594, 2010.

ZHOU H, LENGSELD C, CLAFFEY DJ, RUTH JA, HYBERTSON B, RANDOLPH TW, NG KY, MANNING MC. Hydrophobic ion pairing of isoniazid using a prodrug approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences** (6) 1502-11, 2002.