

LUÍS MANUEL PIRES VERÍSSIMO

**PROPRIEDADES DE TRANSPORTE EM
FARMACOLOGIA ANTI-TUBERCULÓSICA:
ESTUDO DO DI-HIDROCLORETO DE ETAMBUTOL**

Mestrado em Química

Departamento de Química
FCTUC

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

LUÍS MANUEL PIRES VERÍSSIMO

**PROPRIEDADES DE TRANSPORTE EM
FARMACOLOGIA ANTI-TUBERCULÓSICA:
ESTUDO DO DI-HIDROCLORETO DE ETAMBUTOL**

Relatório do Projecto Científico do 2º ano do
Curso de Mestrado em Química, realizado sob
Orientação Científica de Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro.



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Departamento de Química

FCTUC

2014

Agradecimentos

Nenhum percurso científico é solitário. Durante o período que dediquei ao Projecto de Mestrado em Química, muitas foram as pessoas que me ajudaram, de múltiplas formas e em tempos muito variados, com disponibilidade e saberes que foram marcantes – em alguns casos, criticamente marcantes – para poder completar o meu programa de trabalho, positivamente marcado por encontros e reencontros felizes.

O desafio de seguir um programa de Mestrado em Química foi-me lançado pela orientadora deste trabalho, Doutora Ana Cristina Ribeiro, no seguimento de uma colaboração profícua de muitos anos e sou, hoje, muito grato pelo seu apoio incondicional. Mas a sua amizade, o incentivo contínuo e a disponibilidade para a discussão científica foram, de facto, os principais guias deste Projecto.

O tema deste trabalho certamente seria outro, não fora o feliz reencontro com a Professora Ana Cabral. Pelas nossas conversas, rapidamente a TB passou, de um vago referencial, ao reconhecimento da vastidão científica e do impacto, brutal e global, desta área de saber. Poder trabalhar e descobrir este tema seguindo as suas conhecedoras sugestões é um privilégio, e saber poder contar com o seu apoio, uma inspiração.

O Professor Miguel Ángel Esteso recebeu-me no seu Laboratório, na Universidade de Alcalá, em Espanha, onde tive o seu completo apoio e incentivo. Mas, certamente, foram igualmente marcantes as discussões científicas e o reconhecimento de interesse mútuo em valores intemporais da Ciência e na fascinante herança ibérica.

Uma menção e um agradecimento especiais são devidos à Doutora Luísa Ramos; sem a sua motivação e disponibilidade pessoais não poderia incluir os trabalhos de RMN neste Projecto – algo que almejava desde o seu planeamento inicial.

Este Projecto foi também uma oportunidade para reencontrar momentos de reflexão e de colaboração com o Professor Victor Lobo, o Professor Artur Valente e o Sr. Joaquim Natividade, pessoas que me acompanham, há muito, com a sua amizade e conselho. Mas também uma oportunidade para, finalmente, conhecer e trabalhar, em presença, com a Doutora Cecília Santos e a Mestre Marisa Barros, com quem partilhei esforços científicos no passado, sem nunca nos encontrarmos – apesar de trabalharmos no mesmo laboratório e no mesmo equipamento !

E, finalmente, um agradecimento especial aos outros amigos – sem esquecer os que começaram por ser colegas. São eles afinal, juntamente com a família, a matriz sobre a qual construímos todos os nossos Projectos.

Índice

	Página
Índice	i
Abreviaturas.....	ii
Resumo	iii
Abstract / Sinopsis	iv
Capítulo 1. Introdução	1
1.1 Tuberculose	1
1.1.1 Enquadramento global	
1.1.2 Mecanismos patológicos da <i>M. tuberculosis</i>	
1.2 Etambutol.....	5
1.2.1 Mecanismos de acção biocida do DHCEMB	
1.3 Propriedades de transporte em farmacologia anti-TB	9
Capítulo 2. Resultados e Discussão	12
2.1 Densitometria	12
2.1.1 Densidade de soluções aquosas de DHCEMB	
2.1.2 Volumes molares aparentes de DHCEMB	
2.2 Viscosimetria	14
2.2.1 Viscosidade de soluções aquosas DHCEMB	
2.2.2 Raio hidrodinâmico do DHCEMB	
2.2.3 Aplicação do modelo de Jones-Dole	
2.3 Coeficientes de difusão	17
2.3.1 Difusão no sistema binário DHCEMB + H ₂ O	
2.3.2 Difusão no sistema ternário DHCEMB + HCl + H ₂ O	
2.4 RMN – Ressonância magnética nuclear.....	22
Capítulo 3. Conclusões	26
Capítulo 4. Experimental	28
4.1 Soluções.....	28
4.2 Densitometria.....	29
4.3 Viscosimetria	29
4.4 Coeficientes de difusão	30
4.5 RMN – Ressonância magnética nuclear.....	32
Referências	34
Anexos	38

Abreviaturas

COSY	Experiência de RMN de correlação homonuclear
D	Coeficientes de difusão
σ	Desvio padrão
ρ	Densidade
DHCEMB	Di-hidroclorato de etambutol
Eq.	Equação
HSQC	Experiência de RMN de correlação heteronuclear
M. Tuberculosis	Mycobacterium. Tuberculosis
MIC	Minimal inhibitory concentration
O.M.S.	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
SIDA	Síndrome de imuno-deficiência adquirida
T	Temperatura
TB	Tuberculose
V	Volume
VIH	Vírus da imuno-deficiência humana
η	Viscosidade
W.H.O.	World Health Organization; m.q. O.M.S.

Resumo

A tuberculose foi declarada emergência mundial pela O.M.S., em 1993. Vivemos pois, neste momento, a confluência de um duplo desafio: o expedito e pragmático tratamento das populações infectadas, e o controlo da resistência ao tratamento, procurando quebrar o ciclo infeccioso. No entanto, são limitados ainda os conhecimentos dos mecanismos envolvidos no tratamento, quer nas defesas bacilares, quer na acção dos fármacos.

Tivemos oportunidade, durante o Projecto de Mestrado em Química, de conhecer melhor esta temática e estudar algumas propriedades de transporte do di-hidroclorato de etambutol, um fármaco anti-tuberculósico de primeira linha. Na abordagem experimental foram determinados valores de densidade, de viscosidade e de coeficientes de difusão e algumas das suas relações. Foram ainda realizados estudos com espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Pretendemos não só contribuir para o acervo de conhecimentos nesta área de objectiva importância, mas, concomitantemente, defender o relevante papel que os estudos das propriedades de transporte podem ter nos actuais e futuros processos de desenvolvimento farmacológico.

Abstract

Tuberculosis was declared a global emergency by W.H.O. in 1993. We live therefore in the confluence of a double challenge, expeditious and pragmatic treatment of infected populations, and control of resistance to treatment, bound to break the cycle of infection. However, knowledge of the mechanisms involved is still limited, both in terms of bacillary defenses and the action of drugs.

We had the great opportunity, during this Project included in the Chemistry MSc, to become more aware of this issue and study some transport properties of ethambutol dihydrochloride, a first-line TB treatment drug. In the experimental work, density, viscosity and diffusion coefficients were determined and some of their relationships studied. Also, studies have been conducted with nuclear magnetic resonance spectroscopy.

We intend to not only contribute to the body of knowledge of this critical disease, but concurrently defend the important role that studies of transport properties may have on current and future drug development pipelines.

Sinopsis

La Tuberculosis és una emergencia mundial, asi declarada por la OMS en 1993. Vivimos pues, en este tiempo, la confluencia de un doble desafío: el tratamiento rápido y pragmático de las poblaciones infectadas, y el control de la resistencia al tratamiento, tratando de romper el ciclo de la infección. Sin embargo, todavía és limitado el conocimiento de los mecanismos implicados en el tratamiento, sea de las defensas bacilares sea de la acción de los fármacos.

Tuvimos la oportunidad, en el presente Proyecto de Máster en Química, de conocer mejor esta cuestión y estudiar algunas propiedades de transporte de di-hidrocloruro de etambutol, fármaco anti-tuberculósico de primera línea. En el enfoque experimental se determinaron valores de densidad, viscosidad y coeficientes de difusión, bien como algunas de sus relaciones. Además, se han realizado estudios con espectroscopia por resonancia magnética nuclear.

Tenemos la intención de contribuir no sólo al conocimiento de esta enfermedad global, pero al mismo tiempo defender el papel que los estudios de las propiedades de transporte pueden tener en los actuales y futuros procesos de desarrollo farmacológico.

1

Capítulo 1

Introdução

1.1 Tuberculose

Neste Relatório de Projecto do Mestrado em Química julgamos útil enquadrar o nosso trabalho experimental, o estudo de propriedades de transporte do di-hidroclorato de etambutol (DHCEMB) em solução aquosa, abordando a temática da tuberculose (TB). Efectivamente, o composto estudado encontra a principal aplicação pelas suas características de bactericida anti-tuberculósico.

Durante o Projecto, procurámos obter informação extensa e actual sobre a doença e a Ciência Farmacológica aplicável, quer na literatura científica, quer por formação específica. Tivemos, neste período, a oportunidade de integrar o *Global Tuberculosis Clinical Management and Research Course*, a primeira formação à distância sobre este tema da *Johns Hopkins School of Nursing* (E.U.A.).

Não pretendemos aqui, no entanto, abarcar a complexa realidade envolvida mas, antes, coligir uma envolvente que permita enquadrar o trabalho realizado e, assim o esperamos, evidenciar a importância do estudo de propriedades de transporte na investigação farmacológica.

1.1.1 Enquadramento global

A tuberculose é um quadro patológico pandémico global. Os dados da Organização Mundial de Saúde, no seu mais recente Relatório Anual Global de 2013, mostram que um terço da população mundial está infectada, na forma latente. A bactéria *Mycobacterium. Tuberculosis* (*M. Tuberculosis*), vector desta doença, tem grande viabilidade no

pulmão humano, com mecanismos de acção patogénica parasita complexos e muito eficazes.

Com cerca de 8.6 milhões de novos casos activos anuais, a TB é a segunda doença infecciosa em número de óbitos humanos, decorrentes de quadros simples ou em co-morbilidade – 1.3 milhões de óbitos, no mesmo período. Existe uma alta incidência de associação da TB com os quadros de vírus da imuno-deficiência humana (VIH/SIDA) e com a *diabetes mellitus* [1,2]. É a principal causa de óbito em indivíduos VIH-positivos (300 000 óbitos, numa população de mais de 12 milhões de co-infectados).

Em 1993, a O.M.S. declarou a doença uma emergência global de saúde pública, iniciando grandes programas de controlo e investigação da doença (*DOTS, Stop TB Strategy, Countdown 2015*), que trataram, cumulativamente entre 1995 e 2012, 56 milhões de infectados, salvando um número estimado de 22 milhões de vidas. Pretende atingir, já no próximo ano, objectivos bem estabelecidos, nomeadamente, a redução de incidência a 50 % da linha de base de 1995.

Este esforço de contenção e regressão conta com programas regionais, como o da Comunidade Europeia, gerido pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC). No seu último relatório bi-anual, este organismo confirma a preocupações que a TB representa no espaço europeu, mesmo tendo em conta os notáveis avanços obtidos [3].

Em Portugal, é o Programa Nacional para o VIH/SIDA e Tuberculose, da Direcção Geral da Saúde, que faz o acompanhamento da realidade da TB. Tradicionalmente, lança o seu relatório anual no dia 24 de Março, Dia Mundial da Tuberculose. Na última edição, são reportados resultados positivos na erradicação da TB no espaço nacional, com uma incidência actual – para 100 000 habitantes – de 20.4 casos e o objectivo declarado de ultrapassar a barreira dos 20 casos em 2015 [4]. Estão mobilizados interesses multi-disciplinares na TB, e, por exemplo, novos modelos de co-infecção foram propostos recentemente por cientistas nacionais [5].

Limitamos o nosso interesse, neste Relatório, à TB pulmonar humana, por acção da bactéria *M. tuberculosis*. De facto, a tuberculose pode manifestar-se em vários órgãos. Recentemente, uma equipa do Hospital de S. João (Porto) pôde identificar TB num paciente por análise do líquido sinovial, uma solução rica em ácido hialurónico que preenche a cavidade capsular do joelho [6]. Também a tuberculose veterinária apresenta especificidades tão marcantes que ainda não foi encontrado nenhum modelo animal que espelhe efectiva e completamente a TB em humanos [7].

Um diagnóstico de infecção por *M. Tuberculosis* susceptível ao tratamento tem excelentes hipóteses de recuperação, dado que o tratamento adequado é eficaz em mais de 95 % dos casos. Os protocolos, há muito tempo bem estabelecidos, seguem uma estratégia de associação de quatro fármacos anti-bacilares – etambutol, isoniazida, pirazinamida e rifampicina – denominados de primeira linha.. O objectivo principal desta estratégia é evitar o aparecimento de resistências ao tratamento, uma casuística comum no tratamento com um activo único [8].

No entanto, é requerido um tratamento supervisionado de, no mínimo, seis meses – um desafio que nem todos os pacientes conseguem superar. A incorrecta realização do tratamento resulta, frequentemente, na evolução de estirpes resistentes a fármacos, devida a mutações dos genes específicos dos sítios activos de actividade farmacológica. A acumulação sequencial de mutações resulta em estirpes extremamente resistentes ao tratamento [9,10].

A incidência crescente de TB multi-resistente (*Multi Drug Resistant TB*, MDR-TB) e de TB extensamente-resistente (*Extensively Drug Resistant TB*, XDR-TB)¹, causadas por aquelas estirpes resistentes da bactéria, colocam um sério obstáculo aos esforços de controlo da doença. Em cerca de 450 000 casos incidentes de MDR-TB, foram registados 170 000 óbitos, um valor de mortalidade muito alto [1].

O tratamento eficaz de MDR-TB envolve um complexo processo terapêutico com 5 a 7 fármacos de segunda e terceira linha. Estes, são mais dispendiosos e mais tóxicos que os fármacos de primeira linha e o tratamento pode atingir mais de dois anos de duração, em acção supervisionada. A aplicação destes protocolos resulta de muito difícil aplicação em países em desenvolvimento, e, nessas zonas, a XDR-TB é factualmente incurável.

Neste contexto, a tuberculose foi comumente referida como uma ‘doença de pobreza’ [11]. Embora de discutível ética, aquela expressão encerra uma outra realidade: se, durante muito tempo a TB era uma doença de geografias economicamente periféricas, actualmente a TB é uma doença urbana [4,12]. Num cenário com co-morbilidade associativa, como nos casos de VIH/SIDA e a identificação de outros grupos de risco transversais num cenário global, uma muito limitada resposta efectiva de novos fármacos e um limitante conhecimento dos mecanismos envolvidos, aquela expressão não nos

¹ Considera-se o paciente portador de TB multi-resistente (MDR-TB) se apresentar resistência a, pelo menos, rifampicina e isoniazida. Será considerada TB extensamente-resistente (XDR-TB) se, adicionalmente, for resistente a uma fluoroquinolona e a canamicina/amicacina/capreomicina. Quadros de maior extensão de resistências, são referidos como de TDR-TB (*Total Drug Resistant-TB*) [AJ].

parece aceitável, porque redutora e desinformada sobre uma pandemia que é, hoje, um tema central nas emergências globais.

1.1.2 Mecanismos patológicos da *M. tuberculosis*

Usualmente, nos humanos, uma bactéria invasora desencadeia a activação de fagócitos que a incorporam e destroem. A bactéria *M. tuberculosis* apresenta actividade patogénica crítica e o seu êxito e eficácia advêm da capacidade para se incorporar viável nos macrófagos que deveriam garantir, *a priori*, a sua inviabilização. Usa-os, então, como meio de replicação, enquanto os mantém viáveis por uso de estratégias sofisticadas de inibição dos ataques à sua própria membrana lipídica, captura e retenção de alarmes químicos e expressão de proteínas, controlando o metabolismo interno do fagócito [13]. No entanto, usa mecanismos que ainda não são completamente conhecidos e é crítica a necessidade da compreensão das interacções hospedeiro-patógeno que permitem a entrada na célula hospedeira bem como a desactivação das suas defesas e a infecção de células vizinhas.

Numa comunicação recente, um racional muito interessante e inovador foi proposto por Orme, investigador da Universidade do Colorado, E.U.A. (um centro de reconhecida excelência na investigação da tuberculose), conseguindo estabelecer ligações logicamente válidas entre os vários mecanismos parciais conhecidos – e que, em alguns casos, pareciam contraditórios [13]. Em síntese, é proposto um ciclo de desenvolvimento da *M. tuberculosis* misto, intra-celular e extra-celular, onde antes se considerava apenas uma acção intra-celular. Tal, conjugado com outras evidências, permitiria explicar, por exemplo, a inacessibilidade do fluxo intercelular a zonas necrosadas pela acção da bactéria. É esse meio que transporta os fármacos (como é o caso do etambutol) até às estruturas comprometidas e este constructo pode permitir encontrar algumas explicações para a variabilidade na eficácia do tratamento, bem como novas abordagens a testes e vacinas.

Complementarmente, é proposta uma associação em biofilme para a bactéria. É bem conhecida a grande tenacidade deste tipo de associação na resistência a ataques, que seriam de sucesso facilitado se usados em populações dispersas [14].

Propostas como a descrita acima, mesmo não sendo completas e definitivas, cumprem duas tarefas muito importantes. Por um lado, integram conhecimentos prévios, procurando a unificação num mecanismo total; e permitem modelar e validar novos fármacos e estratégias, que explorem facetas expostas pela primeira.

1.2 Etambutol

No âmbito do trabalho experimental deste Projecto de Mestrado foram estudadas algumas propriedades do di-hidrocloreto de etambutol (DHCEMB). Em nomenclatura objectiva é usual a forma di-hidrocloreto de 2,2'-(1,2-etanodiildiimina)-*bis*-1-butanol, mais descritiva – na nossa opinião – do que a nomenclatura formal IUPAC, 2-[2-(1-hidroxibutano-2-ilamino)etilamino]butano-1-ol di-hidrocloreto (Figura 1.1).

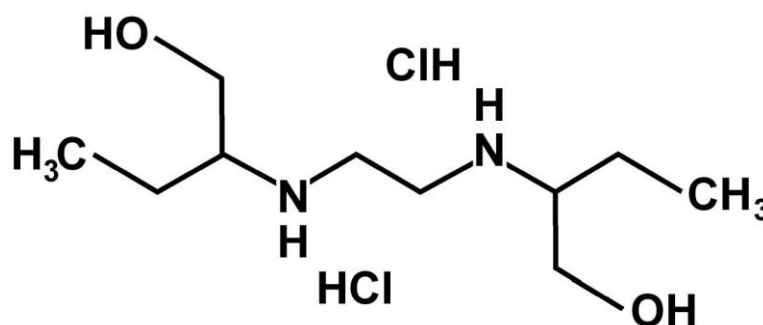


Figura 1.1 – Estrutura do di-hidrocloreto de etambutol, $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2 HCl$.

São usadas outras denominações correntes, em particular Myambutol[®], uma marca comercial; e EMB, a sigla comumente usada para o princípio activo. Tem fórmula molecular $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2 HCl$ e está referenciado nos sistemas americano e europeu como CAS 1070-11-7 e EC 213-970-7, respectivamente, sendo ainda um padrão primário (EPE1850000) na Farmacopeia Europeia [15,16].

A denominação etambutol foi registada pela American Cyanamid Co. em 1961, na sequência dos trabalhos de Wilkinson *et al.* [17,18,19]. A obtenção de etambutol é referenciada na literatura usando muito variadas abordagens sintéticas [20,21,22,23,24,25,26,27], sendo a mais recente comunicação já do corrente ano (2014) [28].

É um composto muito solúvel em água, com $pK_{a1} = 6.35$ e $pK_{a2} = 9.35$ [29]. Assim, pode existir em três estados diferentes, em solução aquosa. Íntegro, em meio ácido até $pH = 6.35$, e como base para valores superiores de pH ; com perda de um hidrocloreto para pH entre 6.35 e 9.35, e do segundo hidrocloreto, em meio básico de pH superior a pK_{a2} (Figura 1.2).

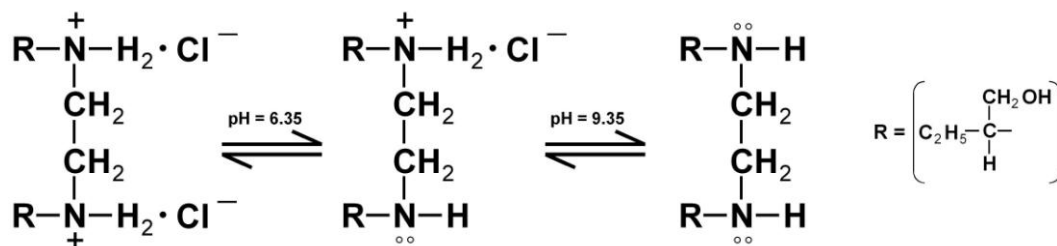


Figura 1.2 – Representação da ionização do DHCEMB (adaptado de [29]).

Os fármacos de primeira linha são apresentados, geralmente, para toma por via entérica. Assim, o DHCEMB deve ter tendência a manter-se íntegro no estômago, um meio com um pH muito baixo (1.5-2 até 4-5) [30]. No entanto, e após ser transportado até ao pulmão, deverá actuar na forma mono-hidroclorada, aquela que é previsível existir na gama local de valores de pH (7.38-7.42) [31].

A estrutura do DHCEMB apresenta quiralidade, identificando-se dois carbonos quirais. Assim, as sínteses propostas envolvem sempre um ou vários passos críticos em que se recorre às estratégias clássicas de inserção quiral, tal como a selecção de um precursor da *chiral pool* natural, catálise assimétrica enantioselectiva, auxiliares quirais ou resolução de racematos.

Usando a convenção de Cahn-Ingold-Prelog podemos referenciar os diaestereoisómeros do DHCEMB. Existindo dois carbonos assimétricos na molécula, são possíveis quatro diaestereoisómeros (2^n), mas a existência de uma variante *meso*- reduz esse número para três (Figura 1.3).

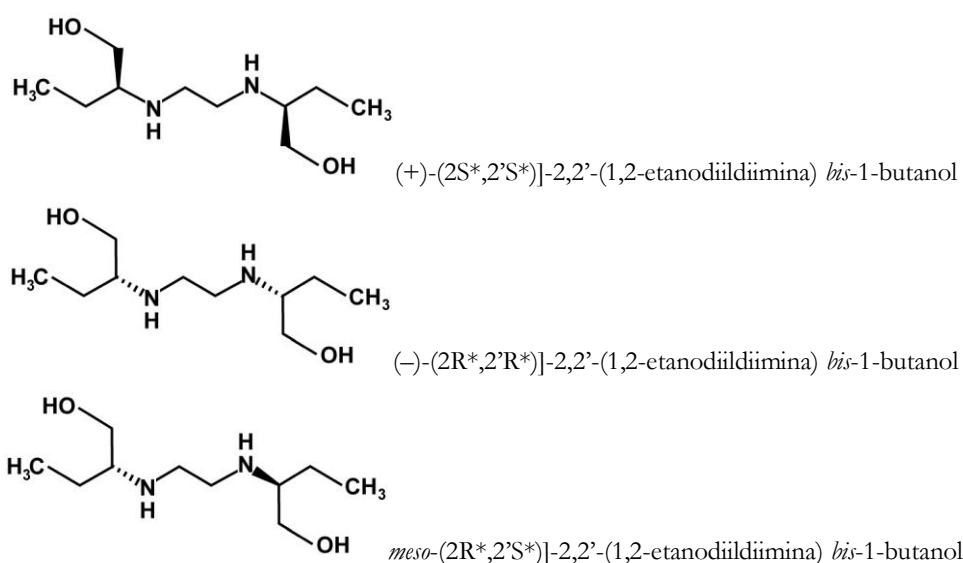


Figura 1.3 – Representação das estruturas dos estereoisómeros do DHCEMB.

Foram também Wilkinson *et al.* que comunicaram primeiro a importância da escolha de quiralidade do etambutol, não tendo havido lugar ao clássico *racemic switch* tardio. Os estereoisómeros (*S,S*)-, (*R,R*)- e *meso*- apresentam diferenças críticas no que concerne à sua acção quimioterapêutica. O enantiómero (*S,S*)-etambutol evidenciou 200 a 500 vezes melhor actividade biológica do que os restantes, como fármaco anti-bacilar, para todas as estirpes de *M.tuberculosis*. [32].

A prática de contrafacção ou adulteração da composição de fármacos comerciais, por uso de componentes de diminuto ou nulo valor farmacológico para obtenção de lucros ilícitos, é um crime organizado e atinge, hoje, escala industrial. É um flagelo global, se bem que mais presente em contextos de condições sócio-económicas limitantes e de falência do sistema regulador – tipicamente, uma agência nacional, que homologa e audita a conformidade do medicamento [33]. Num estudo do mercado indiano de etambutol, 40 amostras foram analisadas relativamente ao conteúdo de variedades opticamente activas. Dessas amostras, 13 (32.5 %) continham fracções de (*R,S*)-etambutol, sem interesse efectivo no tratamento da TB, que variavam entre 30 % e 100 %. Um centro principal de atendimento público usava um fornecimento com 97 % deste mesmo composto [34].

A síntese e teste de análogos derivados do etambutol é uma linha de investigação seguida com insistência, dado o interesse em encontrar um equivalente não patenteado, mas não foi, até agora, encontrado um substituto directo com melhores características globais [26, 35, 36].

1.2.1 Mecanismos de acção biocida do DHCEMB

O etambutol actua bloqueando o processo de síntese da parede celular da bactéria *M. Tuberculosis*. O etambutol interage com a arabinosiltransferase (EmbB), uma enzima associada à membrana celular, envolvida na síntese do arabinogalactano, um componente estrutural crítico da parede celular micobacterial (Figura 1.4). Funcionalmente, aquela interacção é codificada por três genes contíguos, e o etambutol funciona como um análogo da arabinose, substituindo esta – o que dita o *terminus* da síntese da parede bacilar, com acumulação de ácidos micólicos livres [37].

A descrição molecular da resistência ao etambutol não está completamente definida. No entanto, foram identificados três genes que, sofrendo mutação, conferem resistência à estirpe de *M. Tuberculosis* [8,38,39].

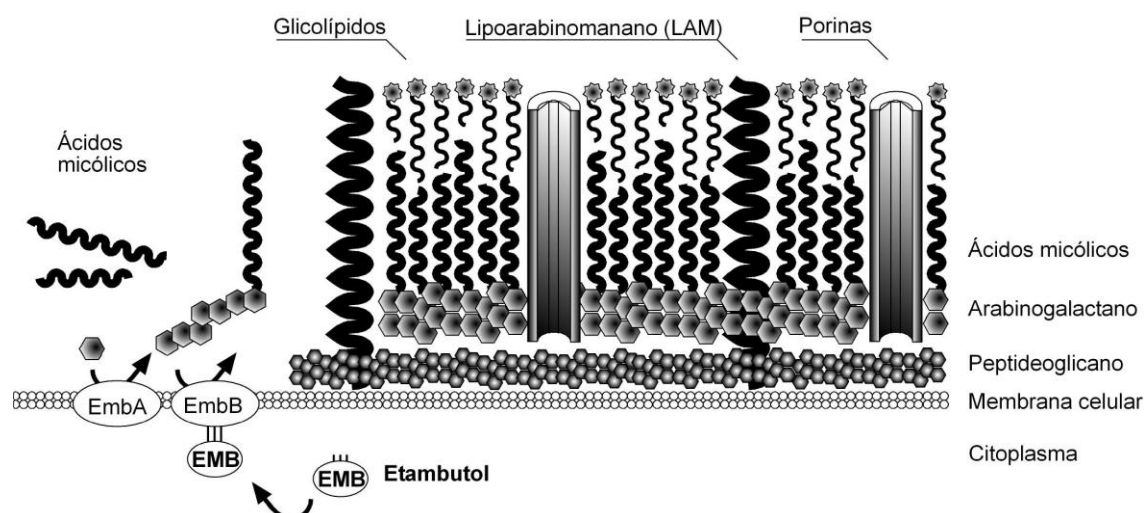


Figura 1.4 – Representação da síntese da parede celular da *M. Tuberculosis*, evidenciando a acção do etambutol.

Como antes descrito, no pulmão a forma mono-hidroclorada do DHCEMB é a predominante – por efeito do pH – e o efeito biocida é muito estereoselectivo. Curiosamente, a actividade biocida do etambutol é mais baixa na gama intermédia de pH do que a valores mais altos e mais baixos [29], o que torna a hipótese de reactividade apenas dependente da variação energia livre da molécula pouco descritiva. No limite, podemos inferir da possibilidade de diminuição de defesas da bactéria, nestes meios extremos, por exemplo, por ataque a um possível biofilme. Do exposto, deverão existir, no modelo cinético, barreiras de energia de activação.

Pode-se então considerar uma proposta em que a acção terapêutica seja obtida por conjugação de factores estereo e electrostáticos. A estereo-estrutura do enantiómero (*S,S*)-etambutol permite a melhor aproximação entre a zona reactiva molecular (o átomo de azoto com um par de electrões disponível) e o local activo na enzima; e, na forma semi-ionizada, as zonas carregadas electrostaticamente poderão sofrer efeitos coloumbicos e a molécula ser atraída.

A forma completamente ionizada duplicaria a probabilidade de aproximação, aumentando a actividade biocida e diminuindo a biodisponibilidade necessária para atingir o valor de MIC, mas só existe nas acima referidas gamas extremas de pH, portantos inviáveis no pulmão humano.

1.3 Propriedades de transporte e farmacologia anti-tuberculósica

O desafio de controlar e fazer regredir o ciclo de infecção da TB representa um dos principais desafios da O.M.S.. Desde logo, porque foi preciso mudar muitas abordagens, que se revelaram, no mínimo, pouco produtivas – por exemplo, o modelo murino, que foi seguido tradicionalmente durante muitos anos, provou ser extremamente limitado [7]. Os enquadramentos sócio-económicos, que muito condicionaram no passado a assistência correcta das populações, não avaliaram o óbvio risco de tentar limitar geograficamente um vector aéreo que, por definição, não tem fronteiras.

Presentemente, é o *pipeline* de investigação de novos fármacos que capta as maiores atenções. Efectivamente, vinte anos após a declaração de emergência mundial, os esforços de investigação e os processos de aceitação de novos fármacos começam a dar frutos visíveis. Não é, no entanto, um processo linear.

A emergência global foi declarada pelo aumento do número casos com resistência ao tratamento, verificado num momento em que historicamente a investigação novos fármacos anti-tuberculósicos havia praticamente parado, porque não havia a necessidade no mercado de alternativas diversificadas e porque a produção de fármacos estava direccionada para a massificação, em consonância com as políticas regionais de controlo da doença. Assim, a investigação teve de ser efectivamente reiniciada.

Dois factos contribuem para uma substantiva diferenciação do *status quo* da investigação actual. A sofisticação das ferramentas de investigação *in silico* [40], e o crescente conhecimento dos mecanismos celulares, permitem a identificação e prioritização de moléculas potencialmente activas para uma aplicação em períodos temporais muito curtos – em comparação com os percursos tradicionais *in vitro*, *in ex-vivo*, *in vivo* e testes humanos.

No entanto, esta disponibilidade para encontrar moléculas de notável especificidade, em tempo muito curto, num processo marcado por interesse emergente, encontra uma limitação, aliás previsível: a falta de tempo de acumulação de saber, em que as comunidades profissionais envolvidas estruturam experiência, com amostras e estatísticas cada vez mais significativas para as populações em causa. Sem esta componente, a resultante é um aumento de mortalidade no período inicial de utilização de novos fármacos, enquanto as suas acções colaterais são registadas, analisadas e o novo conhecimento difundido [41].

A necessidade de controlar uma pandemia com variáveis muito complexas, e que em várias zonas geográficas está objectivamente fora de controlo, criou a necessidade de projectos que articulassem as valências específicas de cada parte; e a oportunidade de

produzir fármacos de interesse global, com fortes projecções comerciais e baixo risco, motiva necessariamente a maior indústria mundial.

Um número significativo de moléculas promissoras estão em vários estádios de validação. No entanto, apenas uma – até ao momento – cumpriu as formalidades necessárias para se tornar produto comercial [42]. O princípio activo é a bedaquilina™ (também referenciado como BDQ, TMC207 ou R207910) é uma nova diarilquinolina registada pela farmacêutica Johnson & Johnson e desenvolvida clinicamente pela Tibotec em colaboração com TB Alliance. É distribuída nos E.U.A., sob a marca Sirturo®, desde 1 de Janeiro de 2013. Foi a única nova forma anti-tuberculósica a ser comercializada desde a rifampina (1971). O fármaco foi aprovado para o espaço da Comunidade Europeia em Março de 2014.

A este novo fármaco aplicam-se as considerações acima feitas, no que se refere aos processos de investigação e tempo de desenvolvimento (*time-to-market*). De um grupo inicial de 70 000 moléculas estudadas, foram seleccionadas as mais promissoras, resultando numa única forma farmacêutica, optimizada para uma acção de grande especificidade.

A bedaquilina tem uma acção anti-tuberculósica muito eficaz, com uma abordagem diferente dos fármacos de primeira linha. Enquanto estes são inibidores da síntese da parede celular da bactéria, o novo fármaco explora a capacidade de inibir a cadeia de transferência de protão na ATP-sintase micobacterial, inviabilizando a bactéria. Foi proposta após a observação de estirpes resistentes à bedaquilina. A sequenciação genética revelou a mutação dos genes de síntese de ATP, origem da resistência verificada.

Apresentada com um mediatismo pouco comum, a bedaquilina, que *in vitro* apresentava resultados excelentes, incluindo acção sobre bacilos em estado latente, nos ensaios de Fase II ($n = 47$, 24 semanas) obteve valores de conversão de 78 % vs. 58 %, em comparação com o grupo placebo. No entanto, a necessidade de novos fármacos promoveu a aprovação em tempo mínimo pela FDA. Recentes revisões evidenciam que as expectativas foram claramente limitadas pelos factos. Não só a toxicidade do fármaco é reconhecida, como a entrada em utilização resultou em valores de mortalidade anormalmente altos. Resta, portanto, em aberto a necessidade de novos fármacos, validados em eficácia e efeitos colaterais, desenhados para produção massificada e de eficiência metabólica optimizada [43].

Alia a indústria farmacêutica a produção global à gestão global. Do ponto de vista do Químico são as linhas analíticas e sintéticas as que sobressaiem na análise dos inúmeros processos envolvidos. Mas, antes de massificar, há que validar efeitos e

processos, bem como estudar, entre outras, formas de obter biodisponibilidade, entrega localizada e resiliência a factores de ambiente.

O estudo de propriedades de transporte tem demonstrado ser um aliado útil quando aplicado à investigação farmacológica, em todos os pontos acima enunciados. A modelagem e teste de segmentos metabólicos, o ensaio de soluções de encapsulamento de fármacos para transporte, protecção ou *targeting*, bem como base científica fundamental em novas abordagens de produção, como a microfluídica, permitem identificar o estudo de propriedades de transporte como uma ferramenta poderosa e agregadora.

A indústria farmacêutica, no prosseguimento das melhores práticas de gestão, soube sempre incorporar novas abordagens técnicas. Há duas décadas, teve de recomeçar a investigação em TB e teve oportunidade de integrar métodos e saberes extremamente avançados. Mas ficou presa em hábitos que pertencem a outros processos, já ultrapassados.

Dartois & Barry, num excelente artigo, sintetizaram, de forma crua mas certa, a tese que aqui defendemos:

‘Em vez de propôr um único perfil de produto-alvo para a TB, seria muito melhor articular uma série de perfis de agentes-alvo que, combinados, atingiriam os objectivos de encurtar e simplificar o tratamento. Estes, devem basear-se nos conhecimentos da bacteriologia e patologia da TB e deveriam ser validados em modelos da doença antes de embarcar em ensaios clínicos muito mais caros. Simplesmente repetir o paradigma, esperando ter sorte na Fase III, é uma falsa economia. Podemos poupar tempo e recursos nas primeiras fases, mas o nosso capital de conhecimento não crescerá e o número de mortes e o custo dos ensaios clínicos não pararão de crescer’ [44].

O muito recente crescimento do interesse público na temática da resistência a fármacos, após comunicações da O.M.S. à comunidade médica e farmacológica, demonstra que as preocupações antes referidas não são exclusivas do restrito âmbito da TB. Antes passam por uma mudança de abordagens, em que, acreditamos, o estudo de propriedades de transporte tem características extremamente positivas para promover um estudo mais dirigido, menos oneroso e mais humano de novos fármacos.

2

Capítulo 2

Resultados e Discussão

2.1 Densitometria

2.1.1 Densidade de soluções aquosas de DHCEMB

Na Tabela 2.1 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de densitometria e, na Figura 2.1, a sua representação gráfica. Foram também calculados valores para os volumes molares aparentes das soluções em estudo.

Tabela 2.1 – Densidades, ρ , e volumes molares aparentes, ϕ_v , para soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K.

$10^3 m$ / (mol.kg ⁻¹)	ρ / (g.cm ⁻³)	$10^6 \sigma$ (a)	ϕ_v / (cm ⁻³ .mol ⁻¹)
0.000000	0.997048		
0.525648	0.997141	0.00	100.07
1.068824	0.997145	4.78	186.74
2.065847	0.997225	0.79	191.83
5.044478	0.997406	2.26	206.59
10.01862	0.997710	3.95	211.45
49.89092	0.999995	2.90	217.99
99.86323	1.002932	0.54	217.50

(a) σ representa o desvio padrão para as medidas

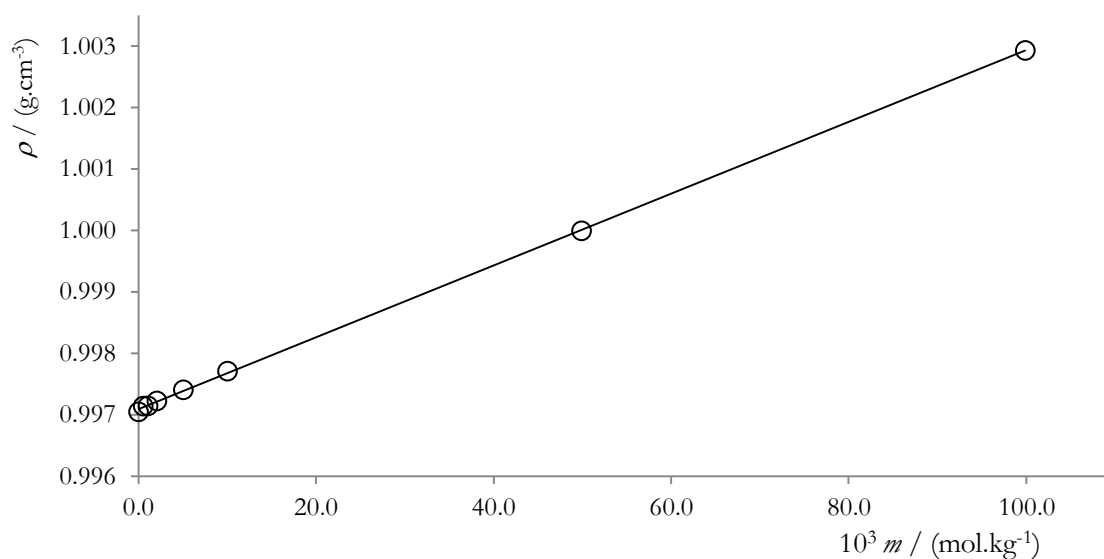


Figura 2.1 – Densidades, ρ , para soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K, em função da molalidade da solução, m .

Verifica-se um crescimento monótono e linear da densidade com o aumento da concentração de DHCEMB. Os resultados apresentam muito boa coerência interna e a densidade a concentração infinitesimal, ρ_0 , mostra excelente coerência com os valores da literatura [45]. Assim, é proposto o seguinte modelo para a densidade do DHCEMB, a 298.15 K (Eq. 2.1),

$$\rho_{298.15} = 0.9971 + 5.841 \cdot 10^{-5} m \quad R^2 = 0.9999 \quad (2.1)$$

sendo m a molalidade da solução.

2.1.2 Volumes molares aparentes de DHCEMB em solução aquosa

Na Figura 2.2 são apresentados graficamente os valores dos volumes molares aparentes, ϕ_v , de soluções aquosas de DHCEMB. O cálculo dos valores foi realizado pela relação proposta para electrólitos por Masson, derivada com base nas teorias de Debye e Huckel [46].

Verifica-se um rápido aumento até $m = 0.01$ m e estabilização a partir desse valor. Podemos especular sobre este comportamento, como sendo indicador de interações soluto-solvente. Há aumento do valor do volume molar aparente com a concentração, no intervalo de concentrações diluídas 0-0.01 m – indicando interação com o solvente. Mas, para maior concentração, o valor mantém-se estável, o que significa que não haverá efeito

de concentração na interação com o solvente, para soluções de concentração acima de 0.01 m.

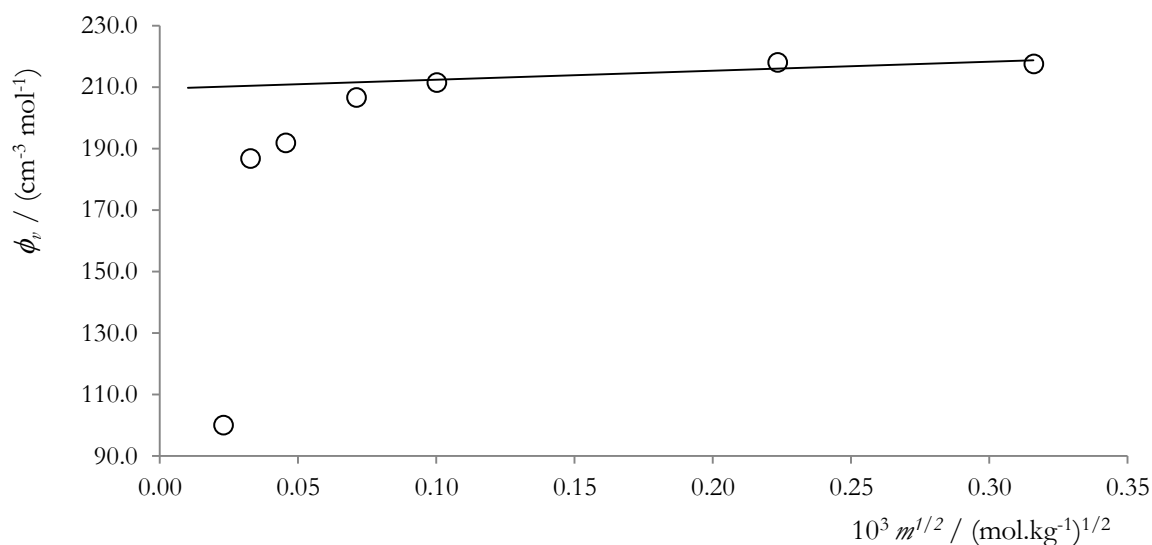


Figura 2.2 – Volumes molares aparentes, ϕ_v , para soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K.

2.2 Viscosimetria

2.2.1 Viscosidade de soluções aquosas DHCEMB

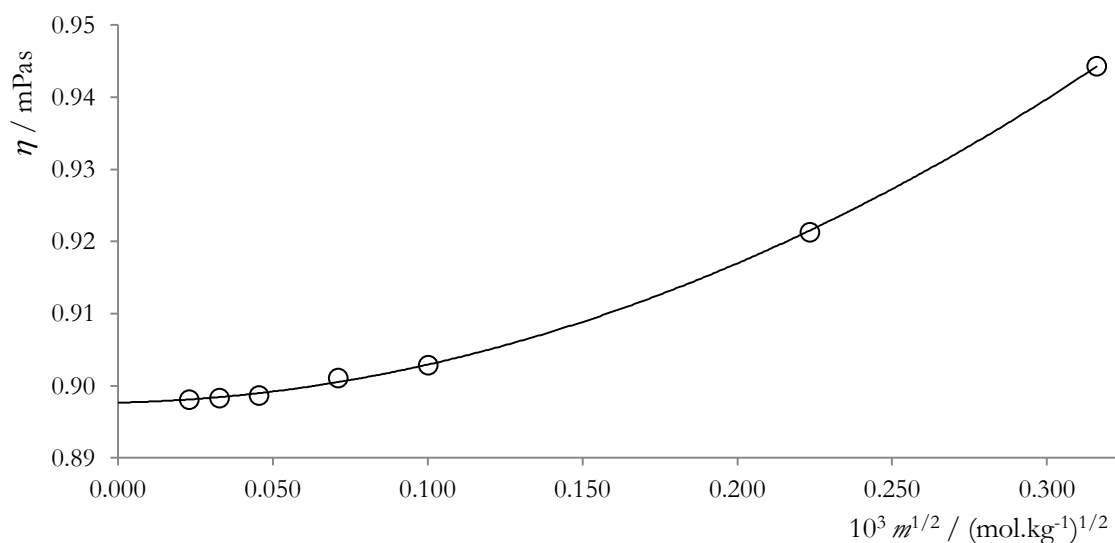
Na Tabela 2.2, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de viscosimetria e, na Figura 2.3, a sua representação gráfica.

Verifica-se o aumento da viscosidade com a concentração. Os resultados apresentam boa coerência interna e a viscosidade a concentração infinitesimal, η_0 , é coerente com a literatura a menos de 1.0 % [47]. Assim, é proposto o seguinte modelo para a viscosidade do DHCEMB, a 298.15 K (Eq. 2.2)

$$\eta_{298.15} = 0.8977 + 0.0088 m^{-1/2} + 0.4382 m \quad R^2 = 0.9997 \quad (2.2)$$

Tabela 2.2 – Viscosidades, η , para soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K.

$10^3 m$ / (mol.kg ⁻¹)	η / mPas	$10^6 \sigma$ (a)
0.000000	0.8902	0.16
0.52565	0.8977	0.18
1.06882	0.8983	0.02
2.06585	0.8987	0.03
5.04448	0.9011	0.53
10.0186	0.9029	0.03
49.8909	0.9213	0.04
99.8632	0.9443	0.23

(a) σ representa o desvio padrão para as medidas**Figura 2.3** – Viscosidades, η , para soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K.

2.2.2 Raio hidrodinâmico do DHCEMB em soluções aquosas

É possível derivar da equação expandida de Stokes-Einstein (Eq. 2.3) uma estimativa do valor do raio hidrodinâmico, a . Este modelo considera o solvente como um contínuo caracterizado pela sua viscosidade, actuando como uma força que limita a mobilidade [48].

$$D_T^0 = (k_B T) / (6 \pi \eta^0 a) \quad (2.3)$$

Na Eq. 2.3, k_B é a constante de Boltzmann e η^0 é a viscosidade do solvente à temperatura T considerada. D_T^0 é o coeficiente de difusão a concentração infinitesimal.

Usando valores da literatura [FB] e o coeficiente de difusão limite (*cf.* Eq. 2.5), calculamos o raio hidrodinâmico, $a_{298,15} = 0.204$ nm para o DHCEMB.

2.2.3 Aplicação do modelo de Jones-Dole

O modelo de Jones-Dole foi usado para estimar a influência da concentração na viscosidade das soluções aquosas de DHCEMB, tratando-as como electrólitos [49].

Neste modelo, é considerada a relação da Eq. 2.4:

$$\eta / \eta_0 = 1 + A c^{1/2} + B c + D c^2 \quad (2.4)$$

sendo A, B e D parâmetros de ajuste, dependentes da temperatura, e considerados representativos de interações na solução.

O factor A é associado a interações de longa distância soluto-soluto; o factor B é associado a interações soluto-solvente e ao carácter estruturante ou desestruturante do soluto no solvente. Não existe, no entanto, nenhuma proposta de relacionamento directo do parâmetro B com a estrutura da solução aquosa.

Considerando as concentrações menores que 0.05 (mol.dm⁻³) e desprezando o termo D, em c^2 , conforme proposto por Jenkins *et al.* [50], obtemos os valores de A = 0.01 e B = 0.49. Assim, podemos inferir uma muito pequena interação soluto-soluto e interações soluto-solvente substantivas na solução. Estas últimas têm carácter estruturante (*structure-making*), atendendo ao valor positivo do parâmetro B.

2.3 Difusão

A técnica de dispersão de Taylor foi usada para estimar coeficientes de difusão de soluções aquosas de DHCEMB a 298.15 K.

2.3.1 Difusão no sistema binário DHCEMB + H₂O

Os resultados obtidos para os coeficientes de difusão binária, D , do DHCEMB em fluxo de água são apresentados na Tabela 2.3. Os coeficientes de difusão com fluxo de concentração finita, D , do DHCEMB são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.3 – Coeficientes de difusão binários de DHCEMB, D , em fluxo de H₂O, a 298.15 K, e respectivos coeficientes de variação da média, C_p .

c / (mol.dm ⁻³)	$D \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	C_p / %
0.1001	0.955 ± 0.001	0.16
0.0500	0.961 ± 0.004	0.42
0.0100	1.040 ± 0.006	0.52
0.0040	1.087 ± 0.014	1.25
0.0010	1.152 ± 0.022	1.95

Tabela 2.4 – Coeficientes de difusão binários, D , para soluções aquosas de DHCEMB, a 298.15 K, e respectivos coeficientes de variação da média, C_p .

c / (mol.dm ⁻³)	Δc / (mol.dm ⁻³)	$D \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	C_p / %
0.1001	0.1001	0.738 ± 0.002	0.25
0.0500	0.0500	0.772 ± 0.001	0.18
0.0040	0.0040	0.956 ± 0.003	0.30
0.0010	0.0010	1.055 ± 0.003	0.27

Na Figura 2.4 estão coligidos graficamente os resultados para os coeficientes de difusão binários, acima tabelados.

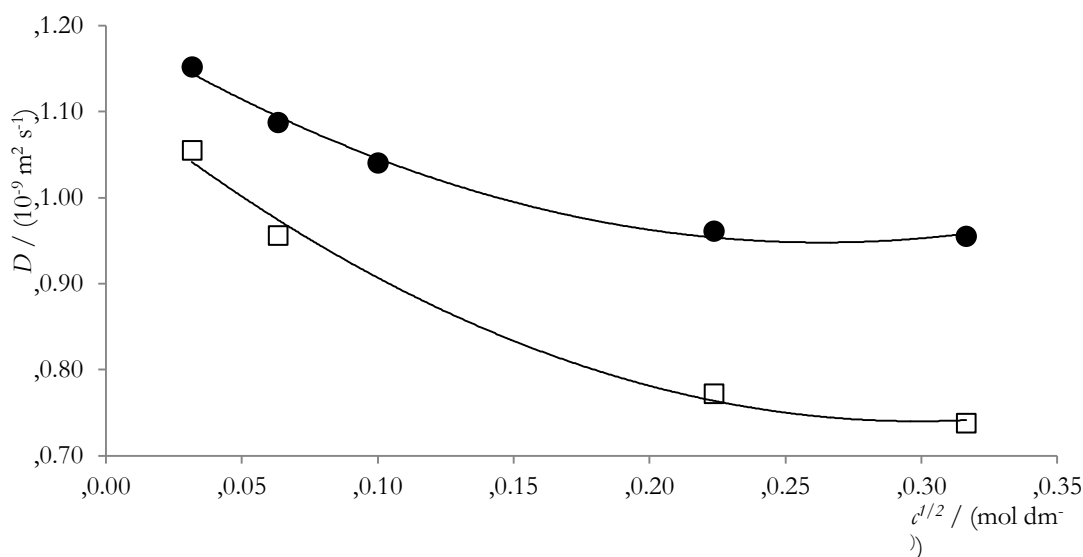


Figura 2.4 – Coeficientes de difusão binários, D , para soluções aquosas de DHCEMB, a 298.15 K.

Com base nos valores apresentados, podemos propôr modelos para os coeficientes de difusão binários, D , pelas Eq. 2.5 e Eq. 2.6, bem como o valor de $D_0 = 1.202 \cdot (10^9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$.

$$D = 1.202 - 1.926 c^{1/2} + 3.655 c \quad R^2 = 0.993 \quad (2.5)$$

$$D = 1.117 - 2.525 c^{1/2} + 4.227 c \quad R^2 = 0.991 \quad (2.6)$$

Verifica-se alguma variação no valor de D_0 entre os modelos apresentados, de cerca de 7 %, um valor relativamente alto e que se crê dever a factores experimentais. No entanto, a aplicação de uma limitação a baixas concentrações e um modelo linear permitem considerar o erro perfeitamente aceitável.

2.3.2 Difusão no sistema ternário DHCEMB + HCl + H₂O

Os resultados obtidos para os coeficientes de difusão isotérmica (D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22}) do sistema ternário DHCEMB (1) + HCl (2) + H₂O, a 298.15 K, são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Coeficientes de difusão (D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22}) do sistema ternário DHCEMB (1) + HCl (2) + H₂O, a 298.15 K.

c_1 / (mol.dm ⁻³)	c_2 / (mol.dm ⁻³)	X_{EMB}	$D_{11} \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	$D_{12} \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	$D_{21} \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	$D_{22} \pm \sigma$ / (10 ⁹ m ² s ⁻¹)	D_{12} / D_{22} (^a)	D_{21} / D_{11} (^b)
0.000	0.010	0.00	0.628 ± 0.023	0.299 ± 0.299	0.202 ± 0.007	2.325 ± 0.096	0.129	0.322
0.001	0.010	0.09	0.628 ± 0.026	-0.608 ± 0.064	0.444 ± 0.021	3.186 ± 0.032	-0.191	0.707
0.005	0.005	0.50	0.553 ± 0.016	-1.557 ± 0.231	0.338 ± 0.021	3.768 ± 0.193	-0.413	0.611
0.050	0.010	0.83	0.685 ± 0.006	-1.607 ± 0.044	0.161 ± 0.070	3.345 ± 0.0311	-0.480	0.235
0.100	0.010	0.91	0.604 ± 0.036	-2.628 ± 0.430	0.081 ± 0.392	4.008 ± 0.056	-0.656	0.134
0.010	0.000	1.00	0.815 ± 0.046	-3.264 ± 0.140	0.022 ± 0.076	5.109 ± 0.147	-0.639	0.027

(^a) D_{12} / D_{22} representa o número de moles de DHCEMB co-transportados por 1 mol de HCl;

(^b) D_{21} / D_{11} representa o número de moles de HCl co-transportados por 1 mol de DHCEMB.

Na Figura 2.5 estão reunidos os resultados obtidos para os coeficientes de difusão ternários da Tabela 2.5, em função da fracção molar, X_{EMB} , do DHCEMB.

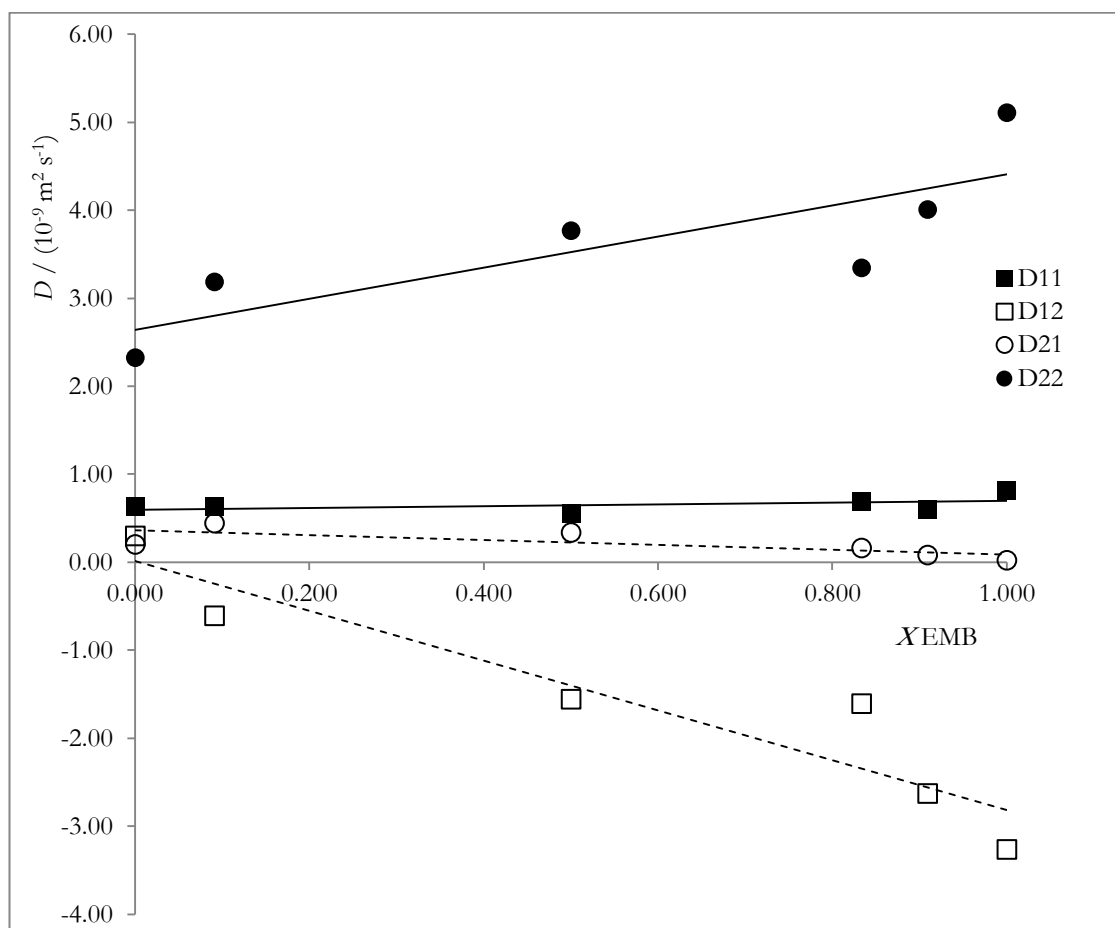


Figura 2.5 – Coeficientes de difusão ternários do sistema DHCEMB (1) + HCl (2) + H₂O, a 298.15 K.

Os coeficientes de difusão principais, D_{11} e D_{22} , representam os fluxos molares dos componentes respectivos (DHCEMB (1) e HCl (2)) na parte que é resultante do seu próprio gradiente de concentração.

Os coeficientes de difusão cruzados, D_{12} e D_{21} , representam os fluxos molares que são originados pelo gradiente contrário, do outro componente. Efectivamente, um gradiente principal pode ser causa de transporte de uma parte variável do fluxo reverso.

Valores negativos representam inversão de sentido do transporte. Assim, a relação D_{12} / D_{22} representa o número de moles de DHCEMB contra-transportados por 1 mol de HCl em fluxo; e, da mesma forma, D_{21} / D_{11} representa o número de moles de HCl co-transportados pelo fluxo de 1 mol de DHCEMB. Na Figura 2.6 estão representados os valores dos coeficientes de co-transporte secundário da Tabela 2.5.

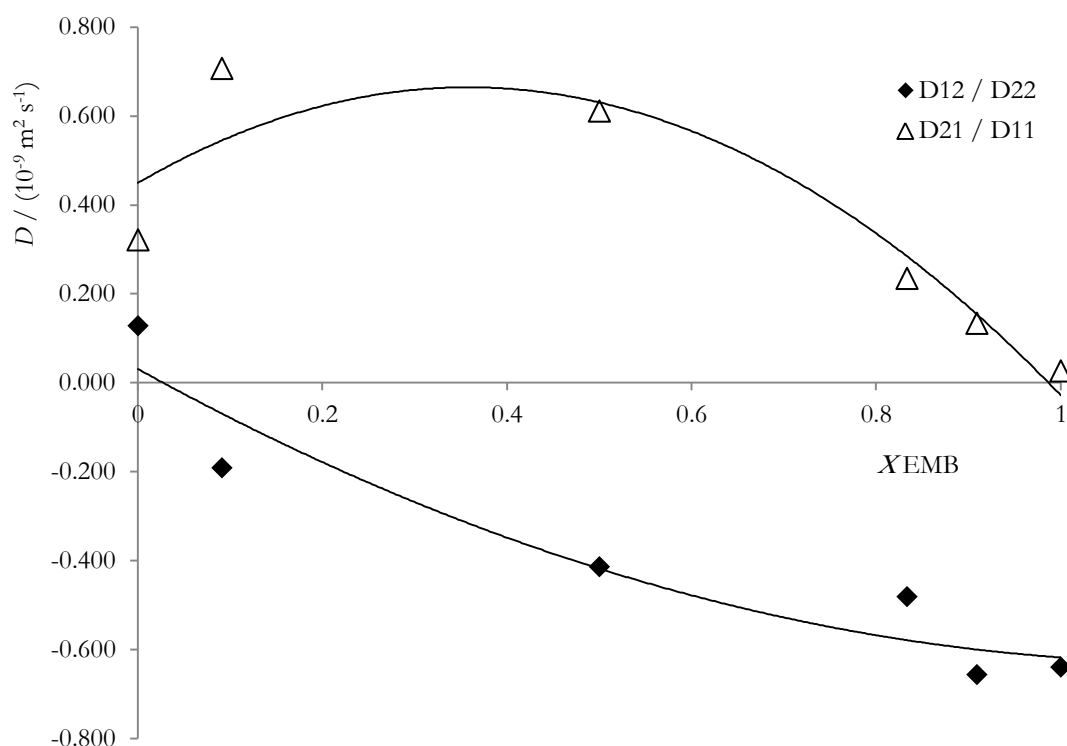


Figura 2.6 – Coeficientes de co-transporte secundário do sistema ternário DHCEMB (1) + HCl (2) + H_2O , a 298.15 K.

Podemos então afirmar que o fluxo de difusão do DHCEMB tem um efeito de aumento do co-transporte do HCl. De forma contrária, o fluxo de HCl parece causar o contra-transporte do DHECEMB, conforme se pode avaliar pelos valores negativos obtidos.

2.4 RMN – Ressonância magnética nuclear

Foram obtidos espectros de RMN de duas soluções em D₂O de DHCEMB 0.4 mol dm⁻³, diferindo entre si no valor de pH – uma solução com pH = 2 e a outra com pH = 7.

A Figura 2.7 apresenta o espectro RMN de ¹H, para as duas soluções, a 298 K, usando como referência *tert*-butanol (1.3 ppm) e mostrando as integrações relativas.

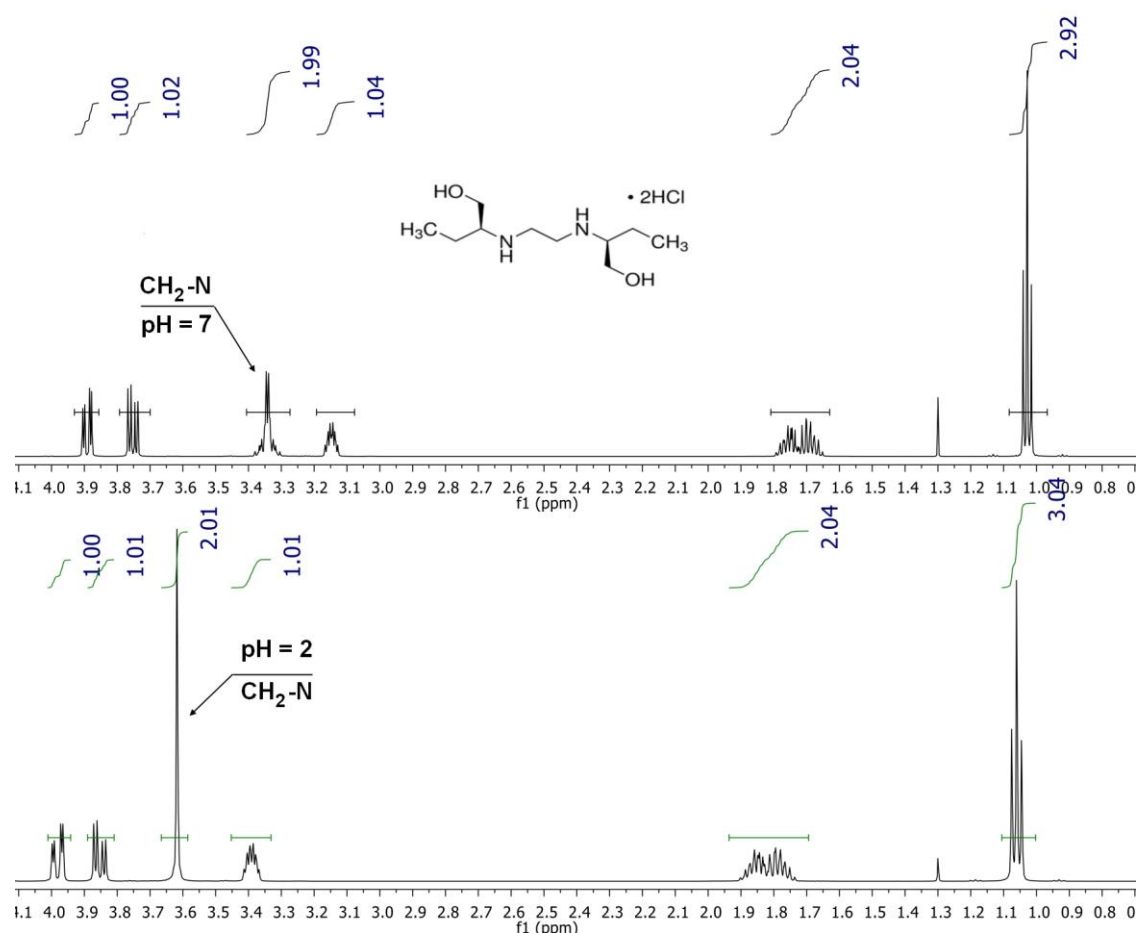


Figura 2.7 – Espectros RMN de ¹H de duas soluções D₂O / DHCEMB 0.4 mol dm⁻³, pH = 2 e pH = 7, a 298.15 K. Referência: *tert*-butanol (1.3 ppm).

A simetria da molécula estudada origina equivalências resultando em integrações que registam metade dos átomos que efectivamente respondem à experiência de RMN ¹H.

Existem alguns desvios assinaláveis, mas o facto mais interessante é que, a pH mais elevado, os dois grupos CH₂ directamente ligados aos átomos de azoto, deixam de ser equivalentes. Isto é, em vez de um sinal único, originam um espectro de um sistema

do tipo AB, mostrando que se mantêm muito semelhantes, mas não exactamente equivalentes. Tal resultado pode ser interpretado à luz do conhecimento do comportamento ácido-base do DHCEMB, anteriormente descrito. Efectivamente, a $\text{pH} = 7$ a espécie existente será a forma mono-hidroclorada, ou seja, exactamente, a forma assimétrica em relação ao plano que passa entre os dois grupos CH_2 ligados aos átomos de azoto, o que ditará a diferença de ambiente para os átomos de hidrogénio considerados.

A Figura 2.8 apresenta o espectro RMN de ^{13}C , para as duas soluções, a 298 K, usando como referência *tert*-butanol (31.2 ppm) e mostrando os desvios químicos respectivos.

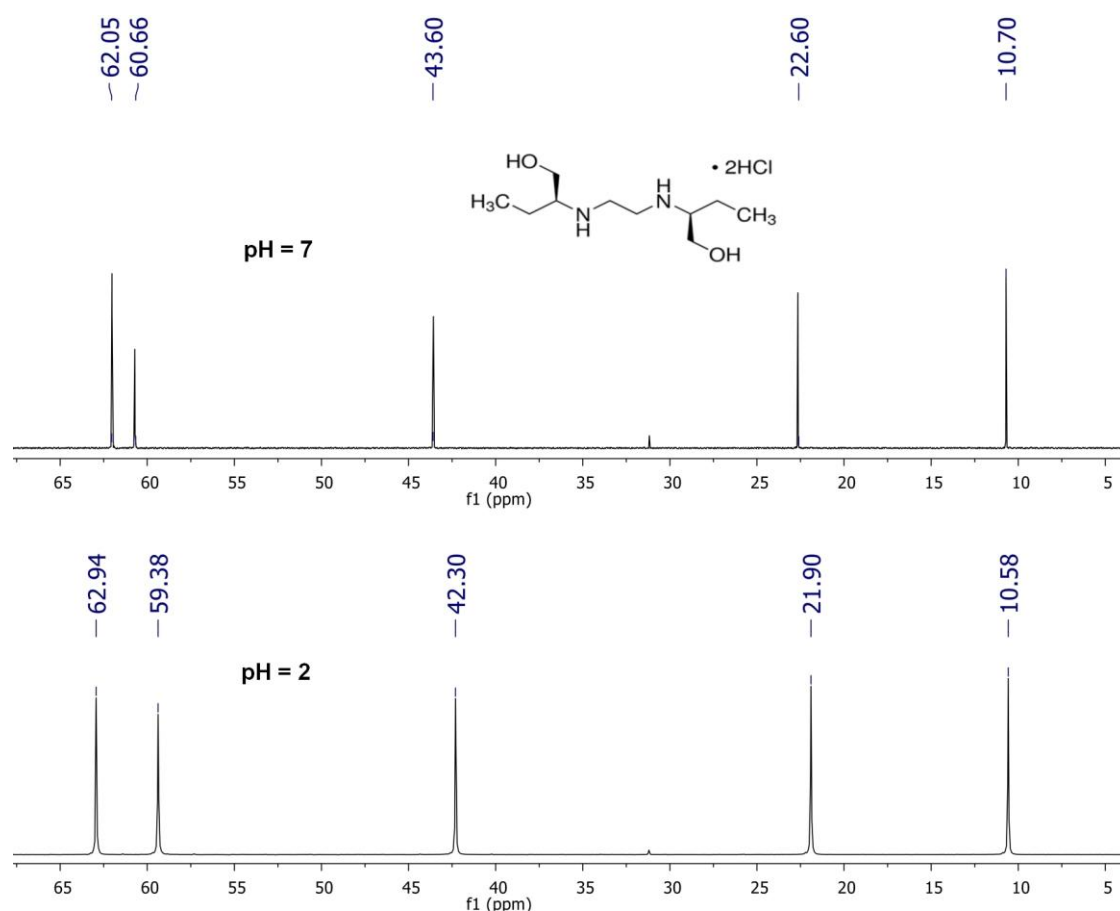


Figura 2.8 – Espectros RMN de ^{13}C de duas soluções D_2O / DHCEMB 0.4 mol dm^{-3} , $\text{pH} = 2$ e $\text{pH} = 7$, a 298.15 K. Referência: *tert*-butanol (31.2 ppm).

Os espectros de RMN ^{13}C evidenciam os cinco tipos de carbonos existentes (cada sinal representa dois átomos, devido à simetria da molécula). Não há lugar a alterações que mostrem mudança fundamental da estrutura carbonada. No entanto, são visíveis, a

pH = 7, ajustes da estrutura, com pequenas mudanças no valor de desvio químico. O carbono com menor ajuste (10.58 → 10.70) é o do grupo metil, o mais afastado do átomo de azoto.

A Figura 2.9 apresenta o espectro 2D RMN de gCOSY, para a solução pH = 2, a 298 K, usando como referência *tert*-butanol (1.3 ppm).

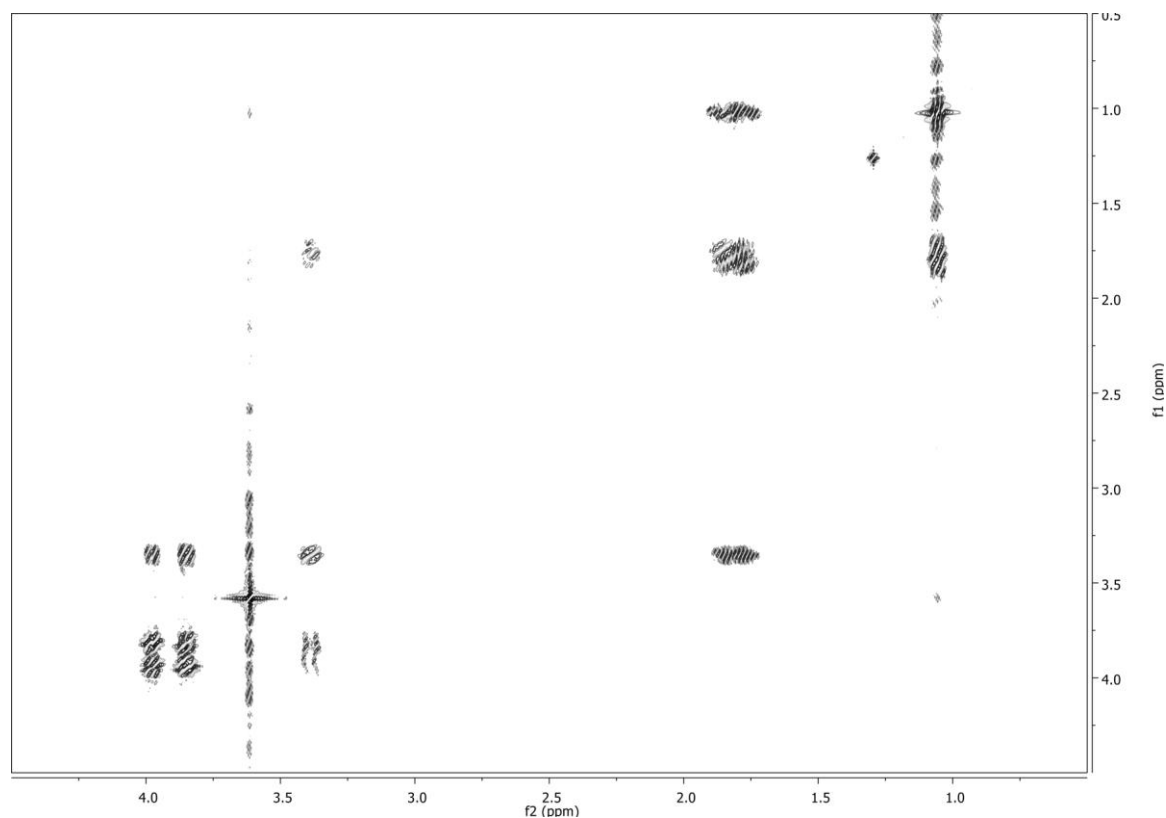


Figura 2.9 – Espectro RMN de correlações homonucleares (gCOSY) de uma solução D_2O / DHCEMB 0.4 mol dm^{-3} , pH = 2.0, a 298.15 K. Referência: *tert*-butanol (1.3 ppm).

Neste espectro podemos identificar facilmente as correlações homonucleares, pelas relações de simetria relativamente à diagonal principal.

A Figura 2.10 apresenta o espectro 2D RMN de HSQC, para a solução pH = 2, a 298 K, usando como referência *tert*-butanol (1.3 ppm).

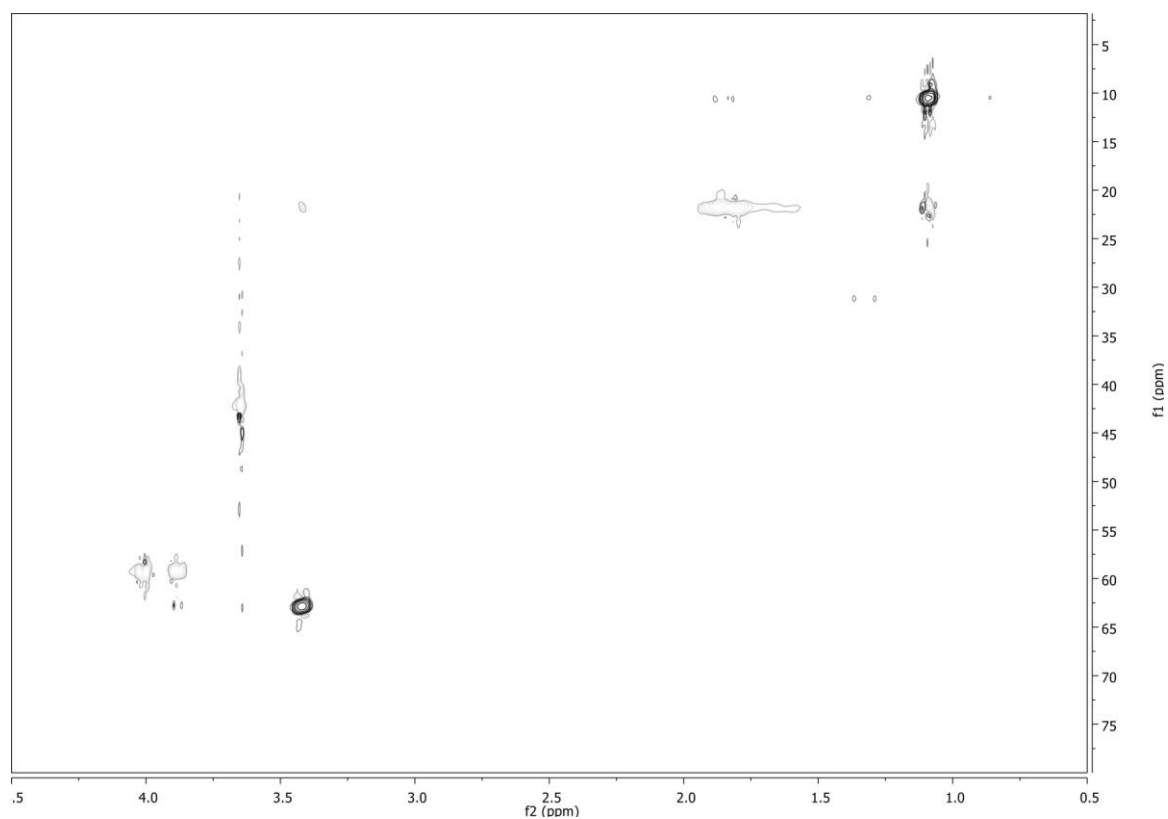


Figura 2.10 – Espectro RMN de correlações heteronucleares (HSQC) de uma solução D_2O / DHCEMB 0.4 mol dm^{-3} , $\text{pH} = 2.0$, a 298.15 K .
Referência: *tert*-butanol (1.3 ppm).

O espectro 2D RMN HSQC ^1H ^{13}C , de correlações heteronucleares, correlaciona os dois espectros 1D nas Figuras 2.7 e 2.8. Permite assim identificar relações entre átomos dos dois diferentes elementos.

3

Capítulo 3

Conclusões

Neste Projecto de Mestrado em Química, utilizámos várias técnicas de propriedades de transporte – densidade, viscosidade e difusão – para caracterizar o di-hidrocloro de etambutol, um bactericida anti-tuberculósico de primeira linha. Usámos ainda outras técnicas – pH, RMN – para apoio ou confirmação.

Estamos certos que o contributo mais valioso deste trabalho foi a determinação de coeficientes de difusão ternários de DHCEMB (1) + HCl (2) + H₂O, a 298.15 K, dado que o mecanismo de activação do DHCEMB é baseado nas variações de pH do meio, como foi descrito.

A determinação de coeficientes de difusão mútuos ternários representa um trabalho longo e minucioso. Não existe nenhum modelo que permita prever, com boas aproximações, valores coeficientes de difusão, sendo, portanto necessária – ainda – a abordagem experimental.

No entanto, as outras medidas e estimativas foram integradas e, obtidos os valores directos das propriedades de transporte por trabalho experimental, torna-se possível combinar esses resultados e obter informação mais completa do que a simples soma das partes – permitindo interpretações mais sofisticadas.

A TB está, desde 1993, listada como emergência global pela O.M.S. Apesar de uma actividade de investigação longa e intensa, os mecanismos completos da acção bacilar

ainda não estão completamente esclarecidos. Começam também agora a ficar disponíveis as propostas resultantes de duas décadas de investigação coordenada pela O.M.S.. Estudos de propriedades de transporte de fármacos anti-tuberculosos, quer na caracterização de sistemas, quer na avaliação de propostas conducentes a melhorias na eficácia do tratamento, terão certamente reconhecimento pela necessidade de informação que os autores especialistas comunicam.

Acreditamos, assim, ter feito uma contribuição substantiva para o conhecimento, nomeadamente comunicando agora a nova informação à comunidade que estuda a doença e a Farmacologia associada.

4

Capítulo 4

Experimental

4.1 Soluções

Para o estudo experimental, foram preparadas soluções de di-hidrocloreto de etambutol (DHCEMB).

Foi usado di-hidrocloreto de (+)-(S,S')-2,2'-(1,2-etanodiildiimina) *bis*-1-butanol (*Sigma-Aldrich*, > 99.9 %, lote SLBF2556V, M = 277.23), sem nenhum tratamento adicional. Foi solicitado o Certificado de Análise do lote utilizado [51]. Foram tomados cuidados no uso do reagente, atendendo às recomendações da literatura, bem como estritamente evitada a manipulação do sólido em presença de grávidas [52].

Foi usada água ultra-pura Tipo I (*Millipore* mod. Direct Q[®] 3UV-R, 18.2 Mohm cm⁻¹ a 298.15 K), produzida localmente.

Não havendo dificuldade em solubilizar o composto, foi no entanto usado um banho ultra-sónico (*Sonorex* RK106) de modo a garantir a solubilização da solução e o seu desarejamento.

O material de vidro volumétrico calibrado, utilizado na preparação – bem como todo o material em contacto com o reagente e solução – passou por um processo de lavagem, terminando em múltiplos enxaguamentos com água *Millipore* e posterior secagem ao ar.

Foi usada uma balança de laboratório (*Mettler* mod. H80, max. 160 g, sensibilidade 0.0001 g).

4.2 Densitometria

A densitometria de soluções aquosas de DHCEMB foi realizada no Laboratório de Química-física da Faculdade de Farmácia da Universidade de Alcalá (Espanha). Para determinar as densidades de soluções foi utilizado um densímetro de líquidos digital (*Antón Paar*, mod. DMA 5000, sensibilidade 10^{-6} g cm⁻³ e uma reprodutibilidade de $\pm 5 \times 10^{-6}$ g cm⁻³, nas gamas de temperatura 0–90 °C e de pressão 0–10 bar).

A construção deste equipamento está centrada numa célula em U, que está montada rigidamente como oscilador mecânico, do qual é conhecida a frequência de ressonância natural. O sistema de aquisição mede o período da vibração, calculando e apresentando a densidade do líquido estudado [53]. O controlo termostático funciona por célula de Peltier e é integrado no equipamento ($\pm 5 \times 10^{-3}$ °C).

Depois de ligar e estabilizar termicamente o equipamento, procedeu-se à calibração com o solvente puro (água) e ar. Conseguida a reprodutibilidade ($\pm 1 \times 10^{-3}$ g cm⁻³), pôde então realizar-se o ensaio das soluções, sendo feitos, para cada concentração, pelo menos quatro ensaios.

Foram ensaiadas soluções com valores de molalidade entre 0.000526 mol kg⁻¹ e 0.099863 mol kg⁻¹, além de água pura, a $T = 298.15$ K.

4.3 Viscosimetria

A viscosimetria de soluções aquosas de DHCEMB foi realizada no Laboratório de Química-física da Faculdade de Farmácia da Universidade de Alcalá (Espanha). Foi usado um viscosímetro de Ostwald (capilar de 0.30 mm de diâmetro).

O viscosímetro foi termostatizado num banho de água de 30 litros, a água foi permanentemente agitada e a temperatura controlada com um termómetro digital (± 0.02 °C).

Foi usado um cronómetro digital (± 0.2 s) para medir o tempo de escoamento.

Dado que os tempos de escoamento foram sempre maiores do que 350-400 s, não foi considerada a correcção de energia cinética de Hagenback.

Os valores de viscosidade, nestas condições, podem ser obtidos pelo tempo de escoamento, t (s), e densidade, ρ (g cm⁻³), (Eq. 4.1)

$$\eta = K \rho t \text{ (mPas)}, \quad (4.1)$$

com a constante do viscosímetro, $K = .0025314 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$, para $T = 298.15 \text{ K}$.

Para cada solução foram realizados pelo menos três ensaios. Também foi realizado um ensaio com água. Recombinando XX, para cada solução pode ser calculada a relação Eq. 4.2,

$$(\eta / \eta_0) = (\rho \cdot t) / (\eta_0 \cdot t_0), \quad (4.2)$$

em que os termos com índice zero são os do solvente. O valor de 0.8902 mPas para a viscosidade da água e $0.997048 \text{ g cm}^{-3}$ para a densidade, ambos para $T = 298.15 \text{ K}$, foram encontrados na literatura [45,47].

4.4 Difusão

Os trabalhos de estudo de difusão de DHCEMB foram realizados no Departamento de Química da Universidade de Coimbra. Para estimar os coeficientes de difusão foi usado um sistema baseado na Técnica de dispersão de Taylor, também conhecida como técnica de Taylor-Aris.

Taylor foi o primeiro autor a descrever a difusão usando a deslocação do solvente em perfil de velocidades característico de um tubo cilíndrico [54]. Pouco tempo depois, o seu trabalho, foi melhorado, do ponto de vista matemático, por Aris, [55].

O sistema usado está descrito na literatura. (ex. [56]) e está representado na Figura 4.1, com os seus componentes principais.

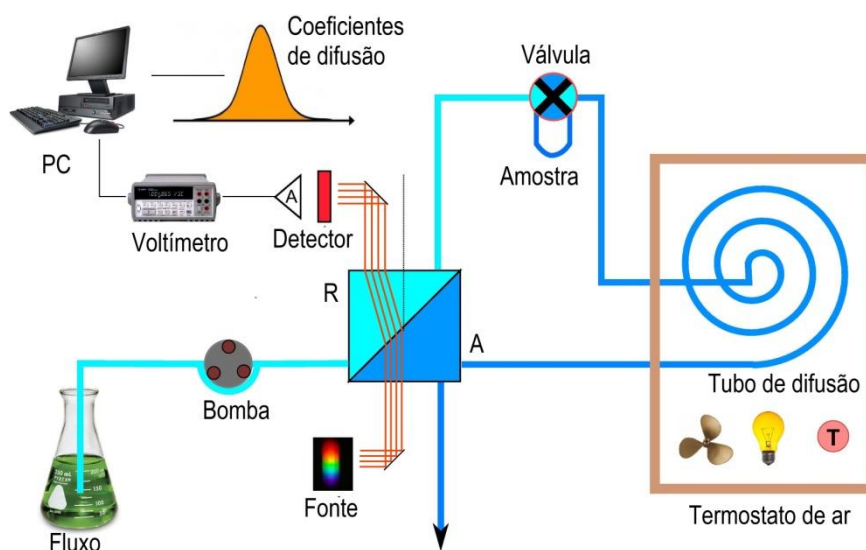


Figura 4.1 – Sistema de Taylor, com representação dos principais componentes.

Cada ensaio foi iniciado com a limpeza do sistema de eluição e passagem de água até estabilização da linha de base. Seguidamente, foi bombeada solução de fluxo, até estabilização da linha de base.

Uma seringa de 3 mL foi usada para encher o *loop* de amostra com a solução a ser dispersa, cuidando-se que não existissem bolhas de ar no tubo. O sistema de aquisição e registo de dados foi preparado.

O accionamento da válvula permite que o fluxo integre a amostra (*plug*) e depois é retomada a posição inicial, libertando o *loop* para operações de limpeza e reenchimento subsequentes. A amostra, durante o caminho de fluxo, sofre dispersão. Eventualmente, se o caminho for suficientemente longo, originará um perfil gaussiano de diferencial de concentração relativamente à linha de base do fluxo eluente (Figura 4.2).

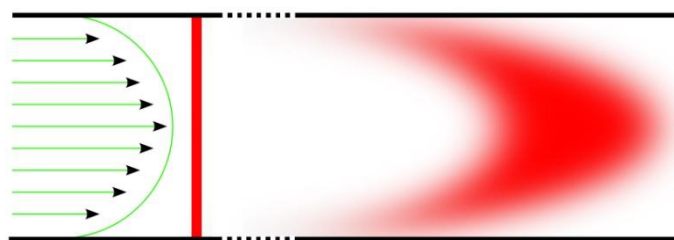


Figura 4.2 – Evolução do perfil de dispersão da amostra (*plug*), no caminho do fluxo eluente.

Na extremidade distal do caminho de eluição o fluxo passa pela célula de amostra do refractómetro diferencial, obtendo-se um sinal proporcional à diferença dos índices de refração do eluente puro e do sistema de soluções eluente/amostra.

Na descrição acima, é de assinalar que na célula de amostra passa, permanentemente, um fluxo de eluente. Assim, os dados registados de rácio de índices incluem – e anulam – o factor referente à velocidade do fluxo, admitindo que as massas de fluxo nas células se movem à mesma velocidade (assumindo a incompressibilidade dos líquidos e uma estrutura sólida da tubagem, o que os trabalhos realizados anteriormente permitem admitir como válido).

Este parâmetro experimental é significativo, pois pode-se observar que a alteração da velocidade de escoamento, obtida por variação da velocidade de bombagem, origina

alterações concomitantes dos dados registados – mesmo depois de um tempo razoável para a estabilização de possíveis diferenciais de pressão.

Esta abordagem experimental não é a usada por outros autores, que anulam o fluxo na célula de referência durante todo o ensaio. Considerando apenas a natureza de referência desta célula no sistema, será aceitável esta opção. Mas, considerando que é registado um rácio de índices e que, conforme já descrito, a velocidade de bombagem é um factor significativo, então parece ser defensável que a instalação aqui usada enquadra experimentalmente melhor o conceito da técnica e permitirá obter dados de melhor qualidade.

Finalmente, o perfil de saída (Figura 4.3) é tratado estatisticamente por um método de mínimos desvios quadrados, para obtenção do valor estimado do coeficiente de difusão.

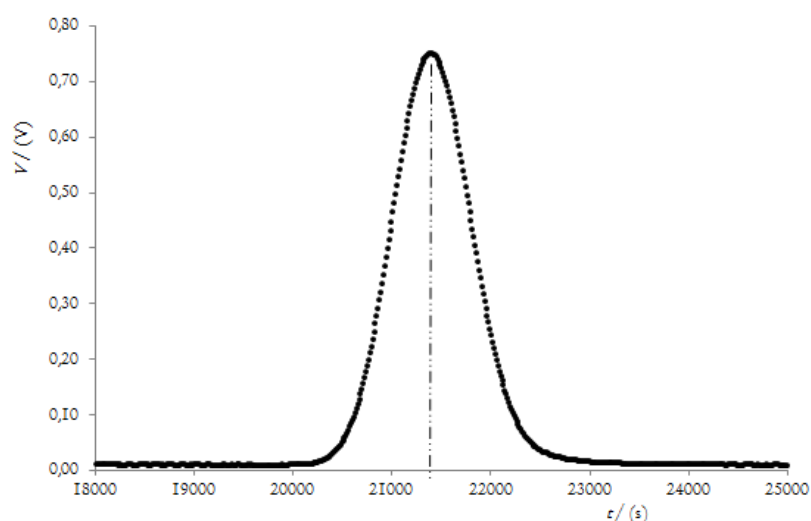


Figura 4.3 – Perfil de saída de dispersão da amostra típico.

4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os trabalhos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram realizados no LabRMN-CNC (*Nuclear Magnetic Resonance Laboratory, Center of Neurosciences and Cell Biology*, Universidade de Coimbra). Todas as medidas foram realizadas num espectrómetro de RMN de 500 MHz (*Varian*, mod. Unity 500 System, U500), operado pelos técnicos do Laboratório.

No entanto, o autor considerou útil obter formação avançada nesta área, tendo frequentado dois cursos de RMN extra-curriculares, organizados pelo CNC (NMR Basics e NMR Focus).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma poderosa técnica de estudo de estrutura molecular. Baseia-se na medida de interações entre um campo electro-magnético de radio-frequência oscilante e um conjunto de núcleos atômicos, na estrutura de moléculas, sob a acção de um forte campo magnético. Este conceito permite realizar vários tipos de experiências, que resultam em espectros de vários tipos, com informação específica [57].

Um espectro de RMN pode, assim, evidenciar informação detalhada da estrutura e dinâmica moleculares que seria difícil, senão impossível, de obter por outros métodos.

Foram obtidos espectros de RMN de duas soluções em água deuterada de DHCEMB 0.4 (mol dm⁻³), diferindo entre si no valor de pH. Foi preparada uma solução única de D₂O (*Deutero*, 99.9 %), que foi depois dividida em dois volumes idênticos. Cada solução foi ajustada ao valor de pH pretendido – uma a pH = 2 e a outra a pH = 7. Para este fim, foram usados NaOD (*Deutero*, 99.5 %, 40 % em D₂O) e DCl (*Deutero*, 99.5 %, 37 % em D₂O).

A referência mais usualmente utilizada é o TMS. No entanto, dado que o TMS não é solúvel em D₂O, optou-se por usar como referência o *tert*-butanol (1.3 ppm ¹H; 13.2 ppm ¹³C).

Foram obtidos espectros unidimensionais de RMN de protão (¹H), de carbono (¹³C), bem como espectros 2D de RMN de relações homonucleares (gCOSY) e de relações heteronucleares (HSQC).

A experiência de RMN 2D gCOSY (*gradient COrrrelation SpectroscopY*) correlaciona os desvios químicos de núcleos de ¹H. Os picos cruzados relativamente à diagonal relacionam prótons acoplados entre si. O desvio químico do ¹H é registado na dimensão directa (f1) e depois de novo adquirida na dimensão indirecta (f2).

A experiência de RMN 2D HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) correlaciona os desvios químicos de heteronúcleos ligados directamente entre si. O desvio químico do ¹H foi registado na dimensão directa (f1) e o desvio químico do ¹³C na dimensão indirecta (f2). A HSQC não apresenta uma diagonal primária como outras experiências de RMN 2D. A experiência HSQC é preferível à HETCOR por ser muito mais sensível.

Referências

- [1] World Health Organization (2013) Global tuberculosis report 2013, France:World Health Organization.
ISBN: 978 92 4 156465 6
- [2] World Health Organization (2011) Collaborative framework for care and control of tuberculosis and diabetes 2011-2015, Switzerland:World Health Organization.
ISBN: 978 92 4 150225 2
- [3] European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe (2014) Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014 Report, Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
DOI 10.2900/1956
- [4] Relatório Anual do Programa Nacional para a infeção VIH/SIDA e Tuberculose (2014) Direcção Geral da Saúde, Governo de Portugal.
ISSN: 2183-0754
- [5] Pinto, C., Carvalho, A. (2014) New findings on the dynamics of HIV and TB coinfection models; *Appl. Math. Comp.* 242 (2014) 36-46.
DOI: 10.1016/j.amc.2014.05.061
- [6] Van Zeller, M., Monteiro, R., Ramalho, J., Almeida, I., Duarte, R. (2012) Multidrug resistant tuberculosis diagnosed by sinovial fluid analysis; *Revista Portuguesa de Pneumologia (English edition)*, 18, 5, 247-250.
DOI: 10.1016/j.rppnen.2012.03.001
- [7] Kumar, N., Vishwas, K.G., Kumar, M., Reddy, J., Parab, M., Manikanth, C.L., Pavithra, B.S., Shandil, R.K. (2014) Pharmacokinetics and dose response of anti-TB drugs in rat infection model of tuberculosis; *Tuberculosis*, 94, 282-286.
DOI: 10.1016/j.tube.2014.02.004
- [8] Almeida da Silva, P.E., Palomino, J.C. (2011) Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs; *J. Antimicrob. Chemoth.* 66, 1417-30.
DOI: 10.1093/jac/dkr173
- [9] Ahmad, S., Mokaddas, E. (2014) Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis; *Journal of Infection and Public Health*, 7, 75-91.
DOI 10.1016/j.jiph.2013.09.001
- [10] Safi, H., Lingaraju, S., Amin, A., Kim, S., Jones, M., Holmes, M., McNeil, M., Peterson, S.N., Chatterjee, D., Fleischmann, R., Alland, D. (2013) Evolution of high level ethambutol resistant tuberculosis through interacting mutations in Decaprenylphosphoryl arabinose biosynthetic and utilization pathway genes; *Nature Genetics*, 45, 1190–1197.
DOI:10.1038/ng.2743
- [11] Saviola, B. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*, adaptation to survival in a human host; in *Tuberculosis – current issues and management* (Mahboub, B. e Vats, M., Eds.), InTech:Rijeka, Croatia; 3-18.
DOI 10.5772/54956
- [12] Hasan, R. (2014) Drug resistant tuberculosis: Challenges of urbanization; *International Journal of Mycobacteriology*, 3, 79-81
DOI 10.1016/j.ijmyco.2014.01.005
- [13] Orme, I.M. (2013) A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis; *Tuberculosis*, 1-7.
DOI: 10.1016/j.tube.2013.07.004

- [14] Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N. (2013) The in vivo biofilm; *Trends in Microbiology*, 21, 9, 466-474.
DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002
- [15] European Pharmacopoeia 2013-2015, 8th Ed., (2013) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Cymit Química S.L., Barcelona.
- [16] *Prontuário Terapêutico*, 11^a Ed. (2013) INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP, Lisboa:Ministério da Saúde.
ISBN: 978-989-8369-11-6
- [17] Wilkinson, R.G., Shepherd, R. G., Thomas, J. P., Baughn, C. (1961) Stereospecificity in a new type of synthetic antituberculosis agents; *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2212-2213.
DOI: 10.1021/ja01470a052
- [18] Shepherd, R. G., Wilkinson, R. G. (1962) Antituberculosis agents.II. N,N'-diisopropyl ethylene diamine & analogs; *J. Med. Chem.*, 5, 823-835.
DOI: 10.1021/jm01239a017
- [19] Wilkinson, R. G., Cartrall, M., Shepherd, R. G. (1962) Antituberculosis agents. III. (+)-2,2-(ethylenediimino)-di-1-butanol & some analogs; *J. Med. Chem.*, 5, 835-845.
DOI: 10.1021/jm01239a018
- [20] Blessington, B. (1977) *Chem. Anal.*, 142, 235.
- [21] Periasamy, M., Kumar, S. S., Reddy, M. (2003) New convenient methods of synthesis & resolution of 1,2-amino alcohols; *Synthesis*, 13, 1965-1967.
DOI: 10.1055/s-2003-41046
- [22] Svedas, V. K., Guranda, D. T., Khimiouk, A. I., Sheldon, R. A., Van, R. F., Van, L. Lukas, M. (2002) *PTC Int. Appl.*, WO 2002020821, A2 20020314.
- [23] Bevinakatti, H. S., Newadkar, R. V. (1990) Lipase catalyzed kinetic resolution of N,O-diacetyl-2-amino-1-butanol in diisopropyl ether; *Tetrahedron: Asymm.*, 1, 583-586.
DOI: 10.1016/0957-4166(90)80006-K
- [24] Trost, B. M., Bunt, R. C., Lemoine, R. C., Calkins, T. L. (2000) Dynamic kinetic asymmetric transformation of diene monoepoxides: a practical synthesis of vinylglycinol, vigabatrin and ethambutol; *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5968-5976.
DOI: 10.1021/ja000547d
- [25] Stauffer, C. S., Datta, A. (2002) Efficient synthesis of (S,S) ethambutol from L-methionine; *Tetrahedron*, 58, 9765-9767.
DOI: 10.1016/S0040-4020(02)01308-X
- [26] Yendapally, R., Lee, R. E. (2008) Design, synthesis and evaluation of novel ethambutol analogues; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 1607-1611.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.01.065
- [27] Kotkar S. P. K., Sudalai, A. (2006) Enantioselective synthesis of (S,S)-ethambutol using proline-catalyzed asymmetric α -aminoxylation and α -amination; *Tetrahedron: Asymm.*, 17, 1738-1742.
DOI: 10.1016/j.tetasy.2006.06.011
- [28] Kumar, J. K., Narsaiah, A.V. (2014) Stereoselective synthesis of tuberculostatic agent (S,S)-Ethambutol; *Org. Commun.*, 7, 1, 28-33.
EISSN: 1307-6175
- [29] Beggs, W.H., Andrews, F.A. (1974) Chemical characterization of ethambutol binding to *Mycobacterium smegmatis*; *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 5, 3, 234-239.

[30] Mukhopadhyay, P., Sarkar, K., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, A., Mishra, R., Kundu, P.P. (2014) pH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery; *Carbohydrate Polymers*, 112, 627–637.

DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.06.045

[31] Fisichella, P.M., Reder, N.P., Gagermeier, J., Kovacs, E.J. (2014) Usefulness of pH monitoring in predicting the survival status of patients with scleroderma awaiting lung transplantation; *Journal of Surgical Research*, 189, 2, 232–237.

DOI: 10.1016/j.jss.2014.03.025

[32] Hausler, H., Kawakami, R. P., Mlaker, E., Severn, W. B., Stutz, A. E. (2001) Ethambutol analogues as potential antimycobacterial agents; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 1679-1681.

[33] Dégardin, K., Roggo, Y., Margot, P., (2014) Understanding and fighting the medicine counterfeit market; *J. Pharm. Biom. Analysis*, 87, 167-175.

DOI: 10.1016/j.jpba.2013.01.009

[34] Prasad, B , Kumar, V., Bhutani H., Singh S. (2008) Screening of bulk drug samples and anti-tuberculosis products for the presence of therapeutically less active diastereomeric (R,S) form of ethambutol dihydrochloride; *Indian J Tuberc.*, 55, 4, 192-198.

[35] Cremieux, A., Baghdadi, N., Berthelot, P., Debaert, M., Martino, M. (1983) Activité antituberculeuse d'analogues cycliques de l'ethambutol; *Ann. Institut Pasteur/Microbio.*, 134, 2^a, 177-182.

ISSN: 0300-5410

[36] Musa, M.A., Khan, M.O.F., Aspedon, A., Cooperwood, J.S. (2010) Synthesis and Antimicrobial Activity of N,N'-Bis(2-hydroxybenzyl)-1,2-ethanediamine Derivatives; *Lett Drug Des Discov.*, 7, 3, 165–170.

DOI: 10.2174/157018010790596678

[37] Telenti A, Phillip W, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stock-bauer KE, Wieles B, et al. (1997) The emb operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol; *Nature Medicine*, 3, 567-570.

DOI: 10.1038/nm0597-567

[38] Ahmad S, Jaber A-A, Mokaddas E. (2007) Frequency of embB codon306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait; *Tuberculosis (Edinburgh)*, 87, 123-129.

DOI: 10.1016/j.tube.2006.05.004

[39] Ahmad, S, Mokaddas, E. (2014) Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis; *Journal of Infection and Public Health*, 7, 75-91.

DOI: 10.1016/j.jiph.2013.09.001

[40] Linderman, J., Kirschner, D.E. (2014) In silico models of *M. tuberculosis* infection provide a route to new therapies; *Drug Discovery Today: Disease Models*, In Press

DOI: 10.1016/j.ddmod.2014.02.006

[41] Zumla, A.I., *et al.* (2014) New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects; *Lancet Infect Dis.*, 14, 327–340.

DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70328-1

[42] Mirsaeidi, M. (2013) 40 years, new medicine for combating TB; *International Journal of Mycobacteriology*, 2, 1–2.

DOI: 10.1016/j.ijmyco.2013.01.004After

- [43] Kakkar, A.K., Dahiya, N. (2014) Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: Promises and Pitfalls; *Tuberculosis* 94, 357-362.
DOI: 10.1016/j.tube.2014.04.001
- [44] Dartois, V., Barry, C.E. (2013) A medicinal chemists' guide to the unique difficulties of lead optimization for tuberculosis; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 4741–4750.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.07.006
- [45] Lide, D.R. (Ed.) (2007-2008) *Handbook of Chemistry and Physics.*, 88th ed. CRC Press, Boca Raton, USA, p. 6-6.
- [46] Masson D. O. (1929) Solute molecular volumes in relation to solvation and ionization; *Phil. Mag.*, 8, 7, 218-235.
DOI: 10.1080/14786440808564880
- [47] Kestin, J., Sokolov, M., Wakerham, W.A., (1978) Viscosity of liquid water in the range -8 °C to 150 °C; *J. Phys. Chem. Ref. Data* 7, 941-948.
- [48] Erdey-Gruz, T. (1974) *Transport phenomena in aqueous solutions*, 2nd ed., Adam Hilger, London, p.151.
ISBN-13: 978-0470243718
- [49] Jones G., Dole M. (1929) The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride; *J. Am. Chem. Soc.*, 51, 2950–2964.
DOI: 10.1021/ja01385a012
- [50] Donald H., Jenkins B., Marcus Y. (1995) Viscosity B-coefficients of ions in solution; *Chem. Rev.*, 95, 8, 2695-2724.
DOI: 10.1021/cr00040a004
- [51] Sigma-Aldrich (2012) Ethambutol dihydrochloride E4630 Batch SLBF3556V Certificate of analysis.
- [52] Sigma, E4630 MSDS.
- [53] Manual Anton-Parr. Densimeter Manual
- [54] Taylor, G.I. (1953) Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube; *P Roy Soc Lond A Mat*, 219, 1137, p. 186.
DOI: 10.1098/rspa.1953.0139
- [55] Aris, R. (1956) On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube; *P Roy Soc.Lond A Mat*, 235, 1200, 67–77.
DOI: 10.1098/rspa.1956.0065
- [56] Ribeiro, A.C.F., Veríssimo, L.M.P., Santos, C.I.A.V., Cabral, A.M.T.D.P.V., Veiga, F.J.B., Estes, M.A. (2013) Effect of HP- β -cyclodextrin in the diffusion behaviour of hydrocortisone in aqueous solutions at T = 298.15 K, *Intern. J. Pharm.*, 441, 1-2, 352-355.
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.021
- [57] RMN Jacobsen, N.E. (2007) *NMR Spectroscopy Explained : Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
ISBN 978-0-471-73096-5

Anexos

- Curriculum Vitae