

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO ISONICOTÍNICO FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis*

Daisy Nakamura SATO*
Catarina Terezinha M. BACHA***
Daniel GARIBOTTI***
Marcelo BÖTTCHER***
Maria Clarice ERRERA*
Pablo PRESOTTO***
Carmo Elias Andrade MELLES**

RIALA 6/847

SATO, D. N.; BACHA, C. T. M.; GARIBOTTI, D.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M.C.; PRESOTTO, P. & Carmo Elias Andrade MELLES, C. E. A. - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de compostos derivados do Ácido Isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58 (1): 25-31, 1999.

RESUMO: O aumento significativo dos casos de tuberculose multidroga resistentes tem incentivado as pesquisas na busca de novas drogas e esquemas terapêuticos alternativos, que possam minimizar estes problemas. Compostos sintéticos derivados do ácido isonicotínico foram avaliados em relação a sua atividade *in vitro* frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela metodologia da macrodiluição em tubos. Todos os compostos estudados apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*, com valores de CIMs que variaram de 0,062 a 0,250 µg/mL. Os valores de CBM foram, em geral, duas diluições mais altos do que os valores de CIM correspondentes. Os valores de CIMs e CBMs obtidos neste estudo estão próximos daqueles apresentados para a isoniazida, que consideramos como droga padrão.

DESCRIPTORIOS: *Mycobacterium tuberculosis*, Atividade antibacteriana, Perfil de sensibilidade, Concentração Inibitória Mínima.

INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença que tem a sua magnitude ligada à situação socioeconômica da região ou do país^{18,30}. Atualmente com o advento da AIDS, a coinfeção TB/HIV tem provocado um impacto na epidemiologia da tuberculose em todo o mundo, fato observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente nas Américas^{9,13,17,27,34}.

A Organização Mundial da Saúde fez uma estimativa de 30.000.000 mortes por tuberculose nos próximos

dez anos e calcula que pelo menos 8.000.000 casos novos de tuberculose ocorreram no ano passado⁴¹.

No Brasil, apesar dos esforços do Programa de Controle Nacional da Tuberculose, onde até o ano de 1995, a cobertura vacinal em menores de 1 ano foi de 90% e a descoberta de casos novos atingiu 75% do esperado, os dados apontam para 90.000 casos novos e mais de 5.000 mortes por tuberculose, anuais⁷.

O diagnóstico definitivo da tuberculose pulmonar depende do isolamento e identificação do agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que as medi-

* Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto

** Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central

*** Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

das de controle, principalmente no que diz respeito à terapêutica, dependem dos resultados dos testes de sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento. Dessa maneira, o laboratório tem um papel de extrema importância na quebra da cadeia de transmissão desse agente etiológico e para tal deve estar em constante parceria com o serviço de vigilância epidemiológica local³⁵.

O tratamento da tuberculose passou por várias fases até o advento dos novos quimioterápicos utilizados nos esquemas terapêuticos atuais; chamamos a atenção para a era dos sanatórios, onde o "isolamento sanatorial" e o "regime higiênico terapêutico" eram considerados fundamentais para o êxito da cura da tuberculose²⁸.

Desde o aparecimento de drogas que atuam no tratamento da tuberculose como a estreptomina, descoberta em 1944 e a isoniazida descrita em 1912 porém reconhecida como eficaz contra o *Mycobacterium tuberculosis* somente em 1952, a quimioterapia da tuberculose tem sido modificada no sentido de se buscar a cura para a doença e dessa maneira diminuir as taxas de incidência e mortalidade²⁸. A partir da década de 60 com a introdução da rifampicina no esquema terapêutico o sucesso do tratamento tem sido garantido com a utilização do chamado esquema de curta duração, que consiste na associação da isoniazida, pirazinamida e rifampicina^{19,36}.

Apesar da utilização de esquemas terapêuticos eficazes, nos últimos anos têm-se observado, em nível mundial, um aumento na incidência de tuberculose causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* resistente às principais drogas, o que reflete em uma falha dos programas de controle da tuberculose^{26,43}. Mesmo onde o programa de controle da tuberculose é eficiente, como é o caso da cidade de São Francisco, Estados Unidos, tem havido um grande aumento dos casos em que o *Mycobacterium tuberculosis* apresenta resistência às drogas⁶.

Dessa maneira, vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados no sentido de se traçar um perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* que vem circulando na população mundial^{5,10,12,14,16,20,23,25,39}. No Brasil, vários inquéritos foram realizados porém de maneira esporádica e regionalizada^{3,4,31,33}.

O constante aumento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à diferentes drogas, tem chamado a atenção dos pesquisadores para o desenvolvimento e a pesquisa de novos agentes antibacterianos quer sejam sintéticos ou naturais⁴¹.

Compostos sintéticos, formulados a partir de quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico convencional da tuberculose, estão sendo testados quanto à sua atividade antibacteriana. YAMAMOTO et al.⁴² testando 39 compostos derivados da pirazinamida, detectaram que 4 deles apresentavam atividades bacteriostática e bactericida contra 03 espécies de micobactérias de cres-

cimento lento, o *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* e o *Mycobacterium tuberculosis*.

Entre os compostos sintéticos derivados do ácido isonicotínico, a etionamida apresenta uma grande atividade frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, e hoje já se encontra incorporada ao Esquema III de tratamento da tuberculose^{24,29}. Outros derivados do ácido isonicotínico como o isonicotinoil e a cianoacetil hidrazona, demonstraram resultados satisfatórios quanto à atividade *in vitro* e *in vivo* frente ao *Mycobacterium tuberculosis*⁴¹. Já os derivados halogenados de isoniazida não mostraram atividade antimicrobiana, quando testados frente a micobactérias e fungos³⁸.

Recentemente, um grupo de pesquisadores do Departamento de Produção de Matéria Prima, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sintetizaram 36 novos compostos derivados do ácido nicotínico e isonicotínico. Este compostos foram testados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* frente à cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, sendo que 04 deles apresentaram bons resultados¹².

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

MATERIAL E MÉTODOS

Compostos: Os compostos derivados do ácido isonicotínico, arilideno isonicotinil hidrazidas (tabela I), foram sintetizados no Departamento de Produção de Matéria Prima, da Faculdade da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e nos foi fornecido gentilmente pela Dra. Catarina Terezinha M. Bacha, professora titular do referido Departamento.

Cepa de micobactéria: A cepa de micobactéria utilizada neste estudo foi a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177.

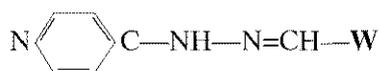
Concentração Inibitória Mínima: Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos derivados do ácido isonicotínico e da isoniazida, considerada como droga padrão, frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra - ATCC 25177 utilizou-se a técnica proposta por ERICSSON & SHERIS¹⁵, adaptada para realização em meio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO), que denominaremos a seguir, meio 7H9. Os compostos derivados do ácido isonicotínico e a isoniazida foram diluídos em meio 7H9 para se obter a concentração final de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 µg/mL. Foi adicionado a cada

tubo contendo as diferentes concentrações de compostos derivados do ácido isonicotínico e da isoniazida, 50 µL de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, previamente incubado a 37°C durante 10 dias, com a turvação ajustada para a escala McFarland nº 1. Foi preparado um tubo controle positivo, inoculando-se 50 µL da suspensão bacteriana preparada como descrito acima, em 2,0 mL de meio 7H9. Os tubos assim preparados foram mantidos em estufa a 37°C e a leitura da CIM realizada após 10 dias de incubação. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento das micobactérias, ou seja a CIM é definida pela diluição que não apresenta turvação visível a olho nu.

Concentração Bactericida Mínima: A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada através do método proposto por HAWKINS et al.²¹. Esta técnica consiste no subcultivo em meio sólido das diluições iguais e/ou superiores à CIM determinada. Para tal semeou-se 100 µL dessas diferentes diluições em meio de Lowenstein-Jensen. Em paralelo, realizou-se um controle semeando-se 100 µL do tubo controle positivo em meio de Lowenstein-Jensen. Todas as preparações foram incubadas por 28 dias a 37°C, para posterior leitura. A CBM é definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais do que 99,9% da população bacteriana no meio de cultura.

TABELA 1

Estrutura química dos compostos derivados do ácido isonicotínico.
Arilideno-isonicotinil hidrazidas:



IDENTIFICAÇÃO	SUBSTITUINTES(W)	DENOMINAÇÃO
1	C ₇ H ₄ O ₂	Piperilideno
2	C ₄ H ₂ O-NO ₂	5-nitro-2furfurilideno
3	2,5-C ₆ H ₄ -OCH ₃	2,5-dimetoxibenzilideno
4	p-C ₆ H ₄ -NO ₂	p-nitrobenzilideno
5	m-C ₆ H ₄ -NO ₂	m-nitrobenzilideno
6	p-C ₆ H ₄ -OH	p-hidroxibenzilideno
7	p-C ₆ H ₄ -CN	p-cianobenzilideno
8	C ₄ H ₃ O	2-furfurilideno
9	p-C ₆ H ₄ -F	p-fluorbenzilideno
10	p-C ₆ H ₄ -CF ₃	p-trifluormetilbenzilideno
11	3,4-C ₆ H ₄ -OCH ₃	3,4-dimetoxibenzilideno
12	p-C ₆ H ₄ -OCH ₃	p-metoxibenzilideno

RESULTADOS

Os resultados das CIMs e CBMs dos compostos derivados do ácido isonicotínico e isoniazida, frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, estão descritos na tabela 2.

A tabela 2, demonstra ainda os valores da relação CIM/CBM da isoniazida e dos compostos testados, onde podemos fazer uma avaliação de atividade bactericida ou bacteriostática dos referidos compostos.

TABELA 2

Determinação da CIM, CBM e relação CIM/CBM para isoniazida e os doze compostos derivados do ácido isonicotínico frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

COMPOSTOS TESTADOS	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM/CBM
INH	0,062	2,0	0,031
1	0,125	2,0	0,062
2	0,062	1,0	0,062
3	0,125	2,0	0,062
4	0,125	2,0	0,062
5	0,250	2,0	0,125
6	0,062	0,25	0,248
7	0,250	2,0	0,125
8	0,125	2,0	0,062
9	0,125	2,0	0,062
10	0,250	2,0	0,125
11	0,125	2,0	0,062
12	0,125	2,0	0,062

DISCUSSÃO

Considerando a problemática da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos diferentes quimioterápicos¹², várias têm sido as tentativas no sentido de encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose pulmonar.

A determinação da atividade *in vitro* de novos quimioterápicos em conjunto com dados de farmacocinética da droga propiciam o desenvolvimento de esquemas terapêuticos alternativos a serem avaliados em ensaios clínicos clássicos⁸.

A isoniazida, hidrazida do ácido isonicotínico, foi sintetizada no início deste século, porém como já foi dito anteriormente, somente foi introduzida como medicação contra tuberculose por volta de 1950³⁹. CHAKRAVARTY et al.¹¹ realizando modificações na estrutura química da hidrazida do ácido nicotínico, demonstraram que compostos com substituintes (W) dos grupos p-dimetilamino e p-hidroxi apresentaram atividade antibacteriana semelhante à isoniazida. Entretanto, os compostos sintetizados foram diluídos em meio de

Lowenstein-Jensen antes de sofrer a coagulação a 85°C. Dessa maneira, fica difícil ter um controle sobre a real manutenção da atividade antibacteriana do composto testado, devido ao aquecimento do meio por 50 minutos. Após a coagulação do meio e adição do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* os frascos vão para a estufa a 37°C por pelo menos 28 dias, quando também pode haver perda da atividade antibacteriana. Já VOYATZAKIS et al.⁴⁰ sintetizando compostos isonicotinoil hidrazonas e adicionando ions cobre e cobalto, verificaram um aumento na atividade antibacteriana destes compostos quando testados frente a uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazida. Verificaram entretanto, que os resultados de inibição antibacteriana foram independentes da concentração do composto isonicotinoil, porém dependentes da presença do ion cobre, onde a formação de quelatos talvez propiciassem a inibição do crescimento bacteriano.

O valor da determinação da CIM *in vitro*, incorporando os compostos a serem testados em meios sólidos, sejam à base de ovo, como o Lowenstein-Jensen ou

Ogawa ou à base de agar como o Middlebrook 7H10 (Difco) já foi muito discutido, pois além de serem métodos mais demorados e trabalhosos, podem comprometer a estabilidade dos compostos a serem testados, principalmente pelo longo período de incubação^{22,32}.

Para a determinação da CIM de novos quimioterápicos, o meio de cultura líquido tem sido muito utilizado, seja pelo método convencional da macrodiluição em tubos ou pelo radiométrico (BACTEC). Este meio além de fornecer resultados mais rápidos, promove uma interação maior entre droga-bactéria, uma vez que a população bacteriana fica submergida no meio de cultura contendo a droga a ser testada. Diferente do meio sólido, onde a bactéria cresce na superfície do meio e o gradiente de concentração da droga pode sofrer variações quando incorporada ao meio. Pode-se contar ainda com as alterações provocadas pelo período de incubação e crescimento da bactéria³².

Avaliando os resultados da atividade antibacteriana dos doze compostos derivados do ácido isonicotínico frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, pudemos observar que estes, pouco diferem do valor da CIM apresentada pela isoniazida, que consideramos como droga padrão. É interessante notar que pelo menos dois compostos, aqueles que têm como substituinte (W) o 5-nitro-2-furfurilideno e o p-hidroxibenzilideno, identificados como compostos 2 e 6 (tabela 2), respectivamente, revelaram o mesmo valor de CIM que a isoniazida (0,062 µg/mL). Dados de literatura demonstram que os valores de CIM para isoniazida frente ao

Mycobacterium tuberculosis variam de 0,02 a 0,05 µg/mL^{29,37}, em experimentos que utilizaram também diluições da isoniazida em meio líquido, resultados estes que estão próximos dos identificados neste trabalho.

Em relação aos resultados de CBM de nosso experimento, pudemos observar que para a maioria dos compostos derivados do ácido isonicotínico obtivemos o valor de 2,0 µg/mL (tabela 2). Este resultado se analisado isoladamente pode não ter grande significado, mas se comparado com o cálculo da proporção CIM/CBM, expressa a potência bactericida das drogas testadas²². Os baixos valores obtidos pela relação CIM/CBM (tabela 2) sugerem que os compostos derivados do ácido isonicotínico apresentam alta atividade bactericida, à semelhança do que ocorre com a isoniazida, largamente estudada quanto à sua atividade bactericida²⁹. Chamamos a atenção para o composto derivado do ácido isonicotínico que tem como substituinte o p-hidroxibenzilideno (nº 6) teve o valor de CIM igual ao da isoniazida, revelando na relação CIM/CBM um valor mais alto, (0,248) o que sugere ter boa atividade bacteriostática.

A partir dos resultados de CIM dos compostos derivados do ácido isonicotínico obtidos, nossos estudos vão continuar no sentido de se avaliar a toxicidade, parâmetros farmacocinéticos, biodisponibilidade, e interação com outras drogas. Devemos prosseguir ainda os estudos em relação à atividade antibacteriana intracelular destes compostos, utilizando para isto culturas de células, em especial, os macrófagos.

RIALA 6/847

SATO, D. N.; BACHA, C. T. M.; GARIBOTT, D.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M.C.; PRESOTTO, P. & Carmo Elias Andrade MELLES, C. E. A. - Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration determination of isonicotinic acid derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 25-31, 1999.

ABSTRACT: Tuberculosis still remains as a worldwide Public Health problem with high morbidity and mortality in developing countries. The increase of strains of *Mycobacterium tuberculosis* that are resistant to antimycobacterial agents is a worldwide problem. Consequently, it is urgently necessary to develop antimycobacterial drugs which are more effective than those used in conventional treatment of tuberculosis. Twelve isonicotinic acid derivatives were evaluated for *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177. The MIC and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra was determined by broth macrodilution method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of all derivatives showed a range of 0,062 to 0,250 µg/mL. In general, the MBC values for all derivatives were two-fold higher than their corresponding MICs values. These MICs and MBCs values are close to isoniazid, that was considered the gold standard in this study.

DESCRIPTORS: *Mycobacterium tuberculosis*, Antimycobacterial activity, Susceptibility test, Alamar Blue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACHA, C.T.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BOTTCHER, M.; GARAKE, J.E.; GARIBOTTI, D.P. e PRESOTTO, P. Síntese de novos compostos com potencial atividade antibacteriana e antifúngica derivados do ácido isonicotínico. In: 49 a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Belo Horizonte, 1997. Programas e Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1997a.
2. BACHA, C.T.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BOTTCHER, M.; GARAKE, J.E.; PRESOTTO, P. e GARIBOTTI, D.P. Síntese de novos compostos com potencial atividade antibacteriana e antifúngica derivados do ácido nicotínico. In: 49 a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Belo Horizonte, 1997. Programas e Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1997b.
3. BARRETO, A.M.W. e MARTINS, F.M. Estudo da resistência primária no Brasil no período de 1986 a 1988. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 21-5, 1988.
4. BEZEM, L.S.; VIEIRA, L.M.T.; ABRAHÃO, J.S.; GOMES, C. e ANDRADE, A.J.S. Resistência primária aos tuberculostáticos no Estado de Santa Catarina. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 34-44, 1988.
5. BLOCH, A.B.; CAUTHEN, G.M.; ONORATO, I.M.; DANBURY, K.G.; KELLY, G.D.; DRIVER, C.R. and SNIDER Jr, D.E. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *JAMA*, 271: 665-71, 1994.
6. BRADFORD, W.Z.; MARTIN, J.N.; REINGOLD, A.L.; SCHECTER, G.F.; HOPEWELL, P.C. and SMALL, P.M. The changing epidemiology acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, USA, *Tubercle*, 348: 928-31, 1996.
7. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de Normas para o controle da tuberculose. Série A: Normas e Manuais Técnicos, 13, Brasília, 1995.
8. BURMAN, W.J. The value of in vitro drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. *Am. J. Med. Sci.*, 313: 355-63, 1997.
9. CANTWELL, M.F.; SNIDER JR, D.E.; CAUTHEN, G.M. and ONORATO, I.M. Epidemiology of Tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA*, 272: 535-9, 1994.
10. CARPELS, G.; FISSETTE, K.; LIMBANA, V.; VAN DEUN, A.; VANDENBULCKE, W., PORTAELS, F. Drug resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: an estimation of incidence and cost for the year 2000. *Tuber. Lung. Dis.*, 76: 480-6, 1995.
11. CHAKRAVARTY, D.; BOSE, A. and BOSE, S. Synthesis and antitubercular activity of isonicotinoyl and cyanoacetyl hydrazones. *J. Pharmac. Sci.*, 53: 1036-9, 1963.
12. COHN, D.L.; BUSTREO, F. and RAVIGLIONE, M.C. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of de Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin. Infec. Dis.* 24(suppl 1): S121-30, 1997.
13. DROBNIIEWSKI, F.; TAYLER, E.; IGNATENKO, N.; PAUL, J.L. NYE, P.; LYAGOSHINA, T. and BESSE, C. Tuberculosis in Siberia: I. An epidemiological and microbiological assessment. *Tuber. Lung Dis.*, 77: 199-206, 1996.
14. EL BAGHDADI, J.; LAZRAQ, R.; IBRAHIMY, S.; BOUAYAD, Z.; GUINET, R. and BENSLIMANE, A. Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1: 309-13, 1997.
15. ERICSSON, H.M. and SHERIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, [B] Suppl 217: 3-90, 1971.
16. FRIEDEN, T.R.; SHERMAN, L.F.; MAX, K.L.; FUJIWARA, P.I.; CRAWFORD, J.T.; NIVIN, B.; SHARP, V.; HEWLETT Jr, D.; BRUDNEY, K.; ALLAND, D. and KREISWORTH, B.N. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA*, 276: 1229-35, 1996.
17. GARCIA, M.L.G.; GÓMEZ, J.L.V.; SANCHO, M.C.G.; ÁLVAREZ, R.A.S.; ZACARIAS, F. y AMOR, J.S. Epidemiologia del SIDA y la tuberculosis. *Bol. Oficina Sanit. Panam*, 116: 546-64, 1994.
18. GERHARDT FO., G. e HIJJAR, M.A. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J. Pneumol.*, 19: 4-10, 1993.
19. GRASSI, C. and PEONA, V. New drug for tuberculosis. *Eur. Resp. J.*, Suppl. 20P: 714s-8s, 1995.
20. GRUPO DE ESTUDIO DE TUBERCULOSIS RESISTENTE DE MADRID, Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resisten-

- cias em Madrid (Octubre de 1993-Abril de 1994), Med. Clin.(Barc), 106: 1-6, 1996.
21. HAWKINS, J.E.; WALACE Jr, R.J. and BROWN, B.A. Antibacterial susceptibility test: Mycobacteria. In: Balows, A. (ed.) Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., 5th Ed., 1991, p. 1138-1152.
 22. HEIFETS, L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in Mycobacteriology. Am. Rev. Resp. Dis., 137: 1217-22, 1988.
 23. HOFFNER, S.E. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; some data from Sweden, Estonia na Ethiopia. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 98: 17-8, 1995.
 24. HOK, T.T. A comparative study of the susceptibility to ethionamide, thiosemicarbazone, and isoniazid of tubercle bacilli from patients never treated with ethionamide or thiosemicarbazone. Am. Rev. Resp. Dis., 90: 468-9, 1964.
 25. KIM, S.J.; BAI, G.H. and HONG, Y.P. Drug-resistant tuberculosis in Korea, 1994. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 1: 302-8, 1997.
 26. KOCHI, A.; VARELDZIS, B.; STYBLO, K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. Rev. Microbiol., 144: 104-10, 1993.
 27. McMACKEN, M. y CASTRO, K.G. La tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en los Estados Unidos, 1985-1992, Bol. Oficina Sanit. Panam., 117: 77-83, 1994.
 28. MELO, F.A.F. e AFIUNE, J.B. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. J. Pneumol., 19: 42-9, 1993
 29. MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev., 8: 496-514, 1995.
 30. RAVIGLIONE, M.C.; DYE, C.; SCHMIDT, S.; KOCHI, A. & The WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Assessment of worldwide tuberculosis control. Lancet, 350: 624-9, 1997.
 31. SALEM, J.I.; GOH, K.S.; LITAIFF, L.R.L.; CARCLOSO, M.S.L. e BRIGLIA, M.F.S. An investigation of primary and acquired drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). J. Pneumol., 16: 6-8, 1990.
 32. SIDDIQI, S.H.; HEIFETS, L.B.; CYNAMON, M.H.; HOOPER, N.M.; LAZLO, A.; LIBONATI, J.P.; LINDHOLM-LEVY, P.J. & PEARSON, N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. J. Clin. Microbiol., 31: 2332-8, 1993.
 33. SILVA, E.A.M.; SATO, D.N.; TELLES, M.A.S.; MARTINS, M.C.; PALACI, M. e UEKI, S.Y.M. Perfil de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 52: 37-40, 1992.
 34. SNIDER, D.E.Jr.; RAVIGLIONE, M. and KOCHI, A. Global burden of tuberculosis. In: Bloom, B.R. (ed.) Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1st Ed., 1994, p. 3-11
 35. TENOVER, F.C.; CRAWFORD, J.T., HUEBNER, R.E.; GEITER, L.J.; HORSBURGH Jr, C.R. and GOOD, R.C. The resurgence of Tuberculosis: Is your laboratory ready? J. Cl. Microbiol., 31: 767-70, 1993.
 36. TOMAN, K. Tuberculosis: case-finding and chemotherapy. Questions and answers. World Health Organization, 1979.
 37. TSUKAMURA, M. In vitro bacteriostatic and bactericidal activity of isoniazid on the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. Tubercle, 71:199-204, 1990.
 38. VIGORITA, M.G.; BASILE, M.; ZAPPALÀ, C.; GABRIELLI, G. and PIZZIMENTI, F. Halogenated isoniazid derivatives as possible antitubercular and anticneoplastic agents. Note 1. Il Farmaco, 47: 893-903, 1992.
 39. VISKUM, K. and JOK-JENSEN, A. Multidrug-resistant tuberculosis in Denmark 1993-1995. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 1: 299-301., 1997.
 40. VOYATZAKIS, V.A.E.; VASILIKIOTIS, G.S.; KARAGEORGIU, G. & KASSAPOGLOU, I.R. Influence of metallic ions on the antituberculous activity of isonicotinoyl hydrazones. J. Pharm. Sci., 57: 1255-7, 1968.
 41. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Report on the Tuberculosis Epidemic. Tuberculosis (TB) Annual Report - DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course) - A Breakthrough in TB Control, 40 p., 1997.
 42. YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WATANABE, N. and URA, T. In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. Antimicrob. Agents Chemother., 39: 2088-91, 1995.
 43. YEW, W.W. and CHAU, C.H. Drug-resistant tuberculosis in the 1990s. Eur. Resp. J., 8: 1184-92, 1995.
 44. YOUNG, D.B. Strategies for new drug development. In: Bloom, B.R. (ed.) Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1st Ed., 1994, p. 559-567.

