

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE NOVO DERIVADO ACILISATINA DA ISONIAZIDA COM OS FÁRMACOS DO ESQUEMA TERAPÊUTICO BÁSICO DA TUBERCULOSE

Fernanda L. Lopes¹; Nicholas M. Monteiro¹; Frederico S. Castelo-Branco²; Flávia F. De C. Marques¹; Marcos M. Gouvêa¹

¹ Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Analítica, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

² Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras-Chave: cromatografia líquida, hidrazidas, cinética.

Introdução

A tuberculose (Tb) é uma doença transmissível causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTb). Antes da pandemia de COVID-19, era a principal causa de morte por um único agente infeccioso (OMS, 2022a) e segue sendo uma das maiores preocupações de saúde pública. A transmissão ocorre pelo ar através do contato com pessoas doentes durante a fala, espirro ou tosse. Apesar da doença afetar principalmente os pulmões (Tb pulmonar), também pode atingir outros locais do corpo (Tb extrapulmonar) (WHO, 2022a). Os sintomas mais comuns incluem tosse com ou sem secreção por mais de quatro semanas, cansaço, febre baixa, suor noturno, falta de apetite, palidez, perda de peso e fraqueza (FIOCRUZ, 2022a).

O tratamento de primeira escolha recomendado pela OMS desde 2010 inclui um regime de 2 meses com 4 fármacos em dose fixa combinada: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZN) e mais 4 meses com INH e RIF (WHO, 2022b). As reações mais comuns incluem a alteração na coloração da urina, irritação gástrica, alterações cutâneas, icterícia e dores articulares (BRASIL, 2019). No entanto, podem ocorrer efeitos mais graves, como hepatotoxicidade, resultante da interação medicamentosa, além de psicose, crises convulsivas e neurite óptica (BRASIL, 2002).

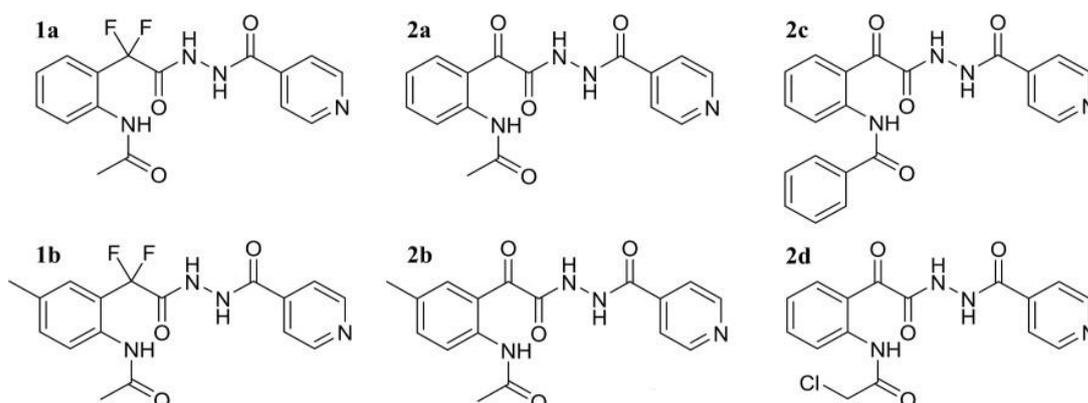
A INH é um pró-fármaco antibacteriano utilizado desde 1952 e um dos mais importantes no tratamento da Tb. A INH pode ser transformada à N-acetilisoniazida, uma forma inativa contra a micobactéria, através da enzima N-acetiltransferase (NAT), muito presente nas células do fígado (Ellard, 1976). Os metabólitos intermediários formados durante a metabolização da INH podem ser os responsáveis pela hepatotoxicidade causada ao longo da sua administração (Huang *et al.*, 2003). Os fármacos RIF e PZN também são potencialmente hepatotóxicos e, portanto, as interações entre eles ou outros medicamentos possibilitam o aumento do risco de hepatotoxicidade. Inclusive, a RIF é um potente indutor do sistema citocromo P450 (CYP450), facilitando a conversão da INH em metabólitos tóxicos (Arbex *et al.*, 2010). Além disso, a RIF é instável na presença de INH em meio ácido estomacal, diminuindo sua biodisponibilidade e aumentando o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana (Shishoo *et al.*, 2001).

Uma estratégia para desenvolver novos medicamentos contra a Tb é a síntese de novos análogos ou a modificação de fármacos antigos ou compostos com atividade comprovada, visando aprimorar e encurtar o tratamento da doença (Hu *et al.*, 2017; Eldehna *et al.*, 2015). A modificação molecular consiste em alterar a estrutura química de um protótipo ou fármaco para

melhorar a resposta biológica, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e/ou reduzir efeitos colaterais indesejados (Barreiro, 2009). Esta abordagem é considerada promissora na descoberta de novos medicamentos (Wermuth, 2008; Koul et al., 2011; Santos et al., 2014). Os novos fármacos anti-Tb devem aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade, encurtar a duração do tratamento, evitar interações medicamentosas com terapias atuais, e ser eficazes contra cepas resistentes a múltiplas drogas (TB-MDR) e extensivamente resistentes (TB-XDR), preferencialmente atuando por um novo mecanismo de ação (Hu et al., 2017; Eldehna et al., 2015).

A adição de grupos protetores ao nitrogênio terminal (grupo amino) da INH é uma estratégia utilizada para evitar reações nesta região da molécula, como a inativação da INH através da N-acetilação pela NAT e geração de metabólitos tóxicos (Simplício, Clancy e Gilmer, 2008). Sendo assim, um grupo de pesquisa do Instituto Tecnologia em Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz (Farmanguinhos, Fiocruz) vem estudando e sintetizando novos derivados da INH, utilizando isatinas como grupos protetores (Figura 1) (Castelo-Branco *et al.*, 2018).

Figura 1: Estruturas químicas dos derivados de isoniazida **1a,b** e **2a-d**.



Fonte: Castelo-Branco *et al.*, 2018.

O composto **2b** se destacou por ser mais potente e menos tóxico, apresentando potencial de toxicidade ao fígado ao menos duas vezes menor do que o da INH e, nos testes em animais, mostrou eficácia comparável ao da INH em menos da metade da dose (Oliveira, 2022). Sendo assim, um estudo para avaliar a sua interação com os outros fármacos do esquema terapêutico convencional é fundamental para permitir a substituição da INH pelo novo derivado desenvolvido. Desta forma, neste trabalho, foi desenvolvido um método por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) para determinação do derivado **2b** e dos fármacos INH, PZN, RIF e ETB com o objetivo de avaliar a sua possível interação em soluções aquosas em diferentes valores de pH e em solução com proteínas plasmáticas, simulando condições fisiológicas. Este método foi validado a partir de parâmetros analíticos de mérito, como linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão e robustez.

Materiais e Métodos

Padrões analíticos, solventes e soluções

A água ultrapura (18,2 MΩ cm) foi obtida em sistema Sartorius (Arium Confort II, Brasil) para o preparo das soluções aquosas e da fase móvel cromatográfica. Padrões analíticos de INH, RIF, ETB e PZN (pureza $\geq 99\%$) foram adquiridos da Merck (EUA). O derivado de INH e a isatina (pureza $\geq 95\%$) foram fornecidos pelo LASFAR (Farmanguinhos, Fiocruz), obtidos por métodos sintéticos descritos por Castelo-Branco *et al.* (2018). A solução de albumina para simulação de plasma foi adquirida da Merck (EUA). Soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em acetonitrila (ACN) (grau HPLC, JT Baker, México) a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e diluídas em uma mistura de ACN:H₂O (75:25 %v/v) ou tampão acetato 10 mmol L^{-1} (pH 3,0, 7,4 e 8,0) para o preparo das curvas analíticas. O tampão acetato foi feito diariamente com ajuste de pH com NaOH ou HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, Brasil). A ACN e o MeOH utilizados na fase móvel foram provenientes da TEDIA (grau HPLC, EUA), e o ácido fórmico 85% da Sinergia Científica (Brasil). As soluções foram filtradas em membrana de politetrafluoretileno ($0,45 \mu\text{m} \times 17 \text{ mm}$; Agilent, Alemanha).

Instrumentação e condições cromatográficas

A avaliação da interação do novo derivado da INH foi realizada por HPLC-DAD, utilizando o sistema cromatográfico Agilent, série 1200, composto pelos módulos: bomba binária (G1312B), degaseificador (G1379B), injetor automático (G1367C), forno de colunas (G1316B) e DAD (G1315C). O controle instrumental e a aquisição de dados foram feitos pelo software Agilent ChemStation. A separação foi realizada em coluna Polaris NH₂ ($150 \times 3,0 \text{ mm}$; $3 \mu\text{m}$) a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, com fase móvel composta pelos solventes A (água + 0,001% v/v de ácido fórmico) e B (MeOH:ACN 50:50 %v/v) em modo isocrático (75% B). Após cada corrida, uma limpeza foi realizada com injeção de ACN:H₂O (75:25 %v/v). A vazão foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção de $5 \mu\text{L}$. A absorvância foi monitorada em 230 nm (derivado e isatina), 265 nm (INH, PZN e RIF) e 210 nm (ETB), com os comprimentos de onda máximos determinados experimentalmente em Espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu/ UV-2450).

Avaliação da interação derivado-fármacos

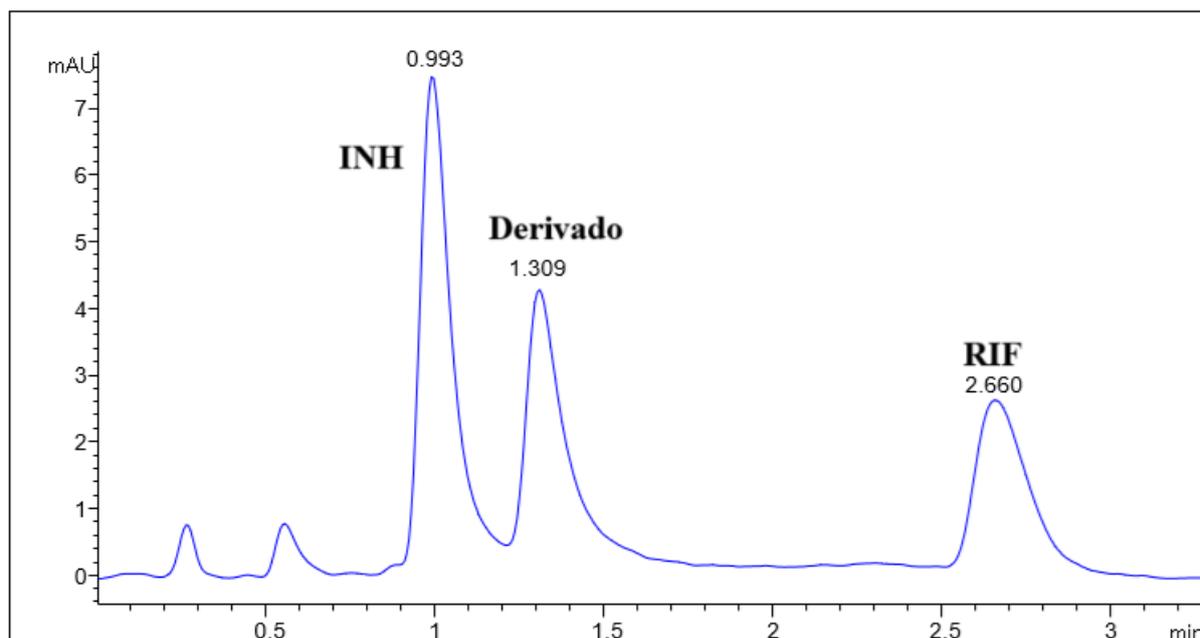
Soluções de todos os padrões foram inicialmente preparadas em DMSO (10 mg mL^{-1}) e, em seguida, diluídas em água ultrapura e soluções tamponadas (pH 3,0, 7,4 e 8,0). Nas mesmas condições, foram preparadas soluções dos derivados combinados com cada fármaco individualmente e com todos os fármacos. Após diluição e filtração, as soluções foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria e injetadas no cromatógrafo em intervalos de 20 minutos na primeira hora e depois a cada hora, totalizando 6 horas. A caracterização dos possíveis adutos formados entre o derivado e os fármacos ainda está em andamento, sendo realizada por Espectrometria de Massas. Para estudar o comportamento em solução de albumina, soluções a 10 mg mL^{-1} ($n = 2$) foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ no mesmo período avaliado para os meios tamponados.

Resultados e Discussão

Desenvolvimento e otimização do método

Durante o desenvolvimento do método para a determinação dos padrões, constatou-se que o MeOH aumentava o tempo de retenção da RIF e do derivado, além de causar alargamento dos picos. Dessa forma, uma proporção entre ACN e MeOH na fase móvel foi necessária para obter uma boa separação e formato de pico. Neste tipo de coluna amino, o solvente empregado como diluente tem uma grande influência no formato dos picos e, por isso, foram testados diluentes em diferentes proporções de água, ACN e MeOH, sendo a melhor proporção em ACN:H₂O 75:25 % v/v. O ácido fórmico foi necessário para estreitar os picos do derivado e da RIF. Entretanto, este aditivo diminuiu expressivamente o tempo de retenção destes analitos. Assim, a melhor separação obtida utilizando a coluna amino foi a partir de uma fase móvel composta por água + 0,001% v/v de ácido fórmico e MeOH:ACN 50:50 % v/v. A separação foi realizada em modo isocrático em 75% de fase orgânica e 25% de fase aquosa. A Figura 2 apresenta o cromatograma dos padrões INH, derivado e RIF. Nesta coluna, não foi possível separar a INH e a PZN, sendo assim, a avaliação foi realizada em duas etapas.

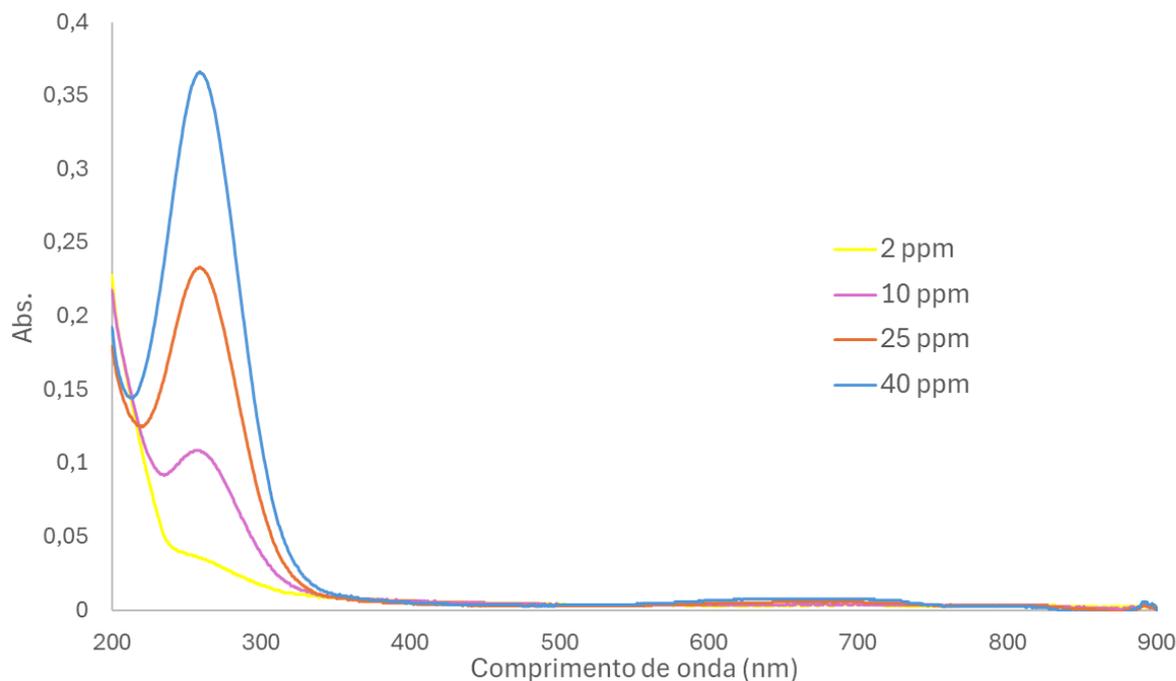
Figura 2: Cromatograma representativo da separação da INH, derivado **2b** e RIF, todos a 5 µg mL⁻¹.



Derivatização do Etambutol

O ETB não absorve radiação na faixa do Ultravioleta-Visível, tornando necessária a sua derivatização. Na literatura, foram encontradas reações de derivatização do ETB utilizando cobre (De Lima, 2014). Assim, foi realizado um estudo do ETB com 0,0001 mol L⁻¹ de acetato de cobre no espectrofotômetro, sendo possível verificar a formação de um complexo que absorveu em torno de 259 nm (Figura 3).

Figura 3: Espectros do complexo de Cu^{2+} com ETB em água e em diferentes concentrações de ETB.



Entretanto, ao utilizar o acetato de cobre na fase móvel, houve um entupimento e optou-se por não prosseguir com a derivatização do ETB. Sendo assim, como não há relato na literatura de interação do ETB com os outros fármacos do tratamento da tuberculose (Arbex *et al.*, 2010), a avaliação da interação do derivado será realizada na presença do ETB, mas sem quantificá-lo.

Validação parcial

Para a construção das curvas analíticas, utilizaram-se 5 concentrações diferentes e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC – nº 166) (BRASIL, 2017) e do documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020). Diferentes faixas lineares foram obtidas, todas com $R^2 > 0,99$ (Figura 4). A precisão, em termos de repetibilidade, variou entre 0,54 % e 11,50%. O critério usado para o cálculo do LD foi considerando $LQ/3,3$, sendo o LQ o primeiro ponto da curva analítica (Tabela 1).

Figura 4: Curvas analíticas representativas da INH (0,33 a 5,0 mg L⁻¹), da PZN (0,25 a 5,0 mg L⁻¹), do derivado **2b** (0,50 a 5,0 mg L⁻¹) e da RIF (0,30 a 5,0 mg L⁻¹).

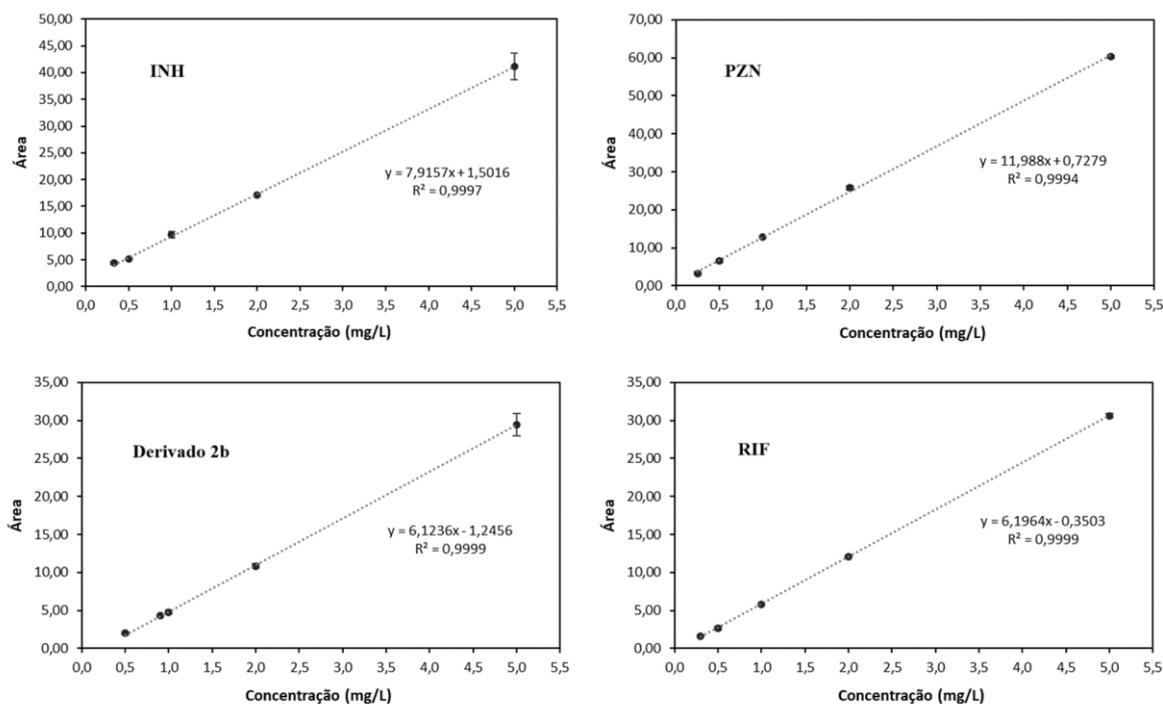


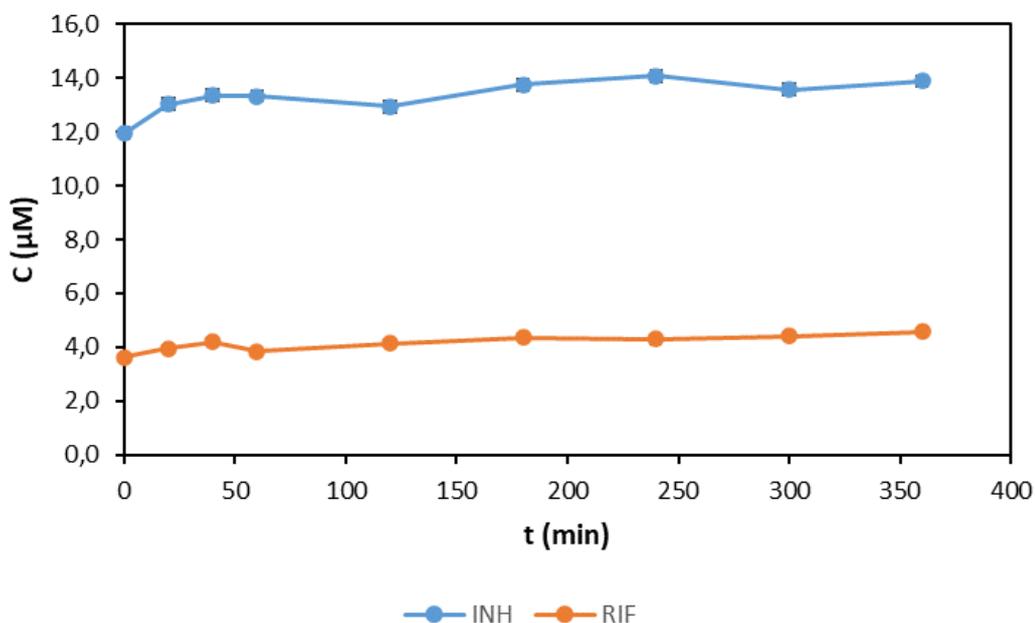
Tabela 1: Valores de limite de detecção e quantificação para INH, PZN, derivado **2b** e RIF.

Padrão	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
INH	0,10	0,33
PZN	0,08	0,26
Derivado 2b	0,13	0,38
RIF	0,09	0,30

Para o estudo cinético, considerou-se a concentração de cada fármaco no organismo. Com base no fato de que um comprimido de dose fixa e combinada (150/75/400/275 mg de RIF/INH/PZN/ETB) deve ser ingerido com um copo de 200 mL de água em jejum (FIOCRUZ, 2022b), e que o suco gástrico presente no estômago é de 50 mL (Ruiz, 2020), foram calculadas as concentrações finais no organismo para cada fármaco (600/300/1600/1100 mg L⁻¹ de RIF/INH/PZN/ETB). Para a análise cromatográfica, foi realizada uma diluição de 200 vezes para adequar-se à faixa linear de trabalho.

O estudo preliminar de cinética realizado entre INH e RIF em água pura e temperatura ambiente não demonstrou variação na concentração ao longo do tempo (Figura 5), corroborando com dados da literatura (Shishoo *et al.*, 2001).

Figura 5: Curva cinética da INH ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e RIF ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em água e à temperatura ambiente.



Os estudos entre todos os padrões e em diferentes condições, conforme já mencionado, estão em andamento.

Conclusões

Foi desenvolvido um método analítico por HPLC-DAD a partir de uma coluna amino para a determinação dos fármacos INH, PZN, RIF e o derivado **2b**, com tempo de corrida de apenas 3 minutos e com boa resolução. O estudo cinético dos fármacos INH e RIF forneceu os resultados esperados e as avaliações em diferentes valores de pH e em soluções plasmáticas estão em fase final de conclusão. Enfim, espera-se que com este estudo sejamos capazes de contribuir para o tratamento da tuberculose com segurança e redução significativa do tempo total de tratamento, melhorando a adesão dos pacientes.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento, FAPERJ, CNPq e Capes. À Fiocruz pela parceria e fornecimento de recursos.

Referências

Arbex, M. A.; Varella, M. De C. L.; De Siqueira, H. R.; De Mello, F. A. F. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 36(5), 626-640, 2010.

Barreiro, E. J. A Química Medicinal e o Paradigma do Composto-Protótipo. **Revista Virtual de Química**, 1(1), 26-34, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**: cadernos de atenção básica, 2002. Disponível em:

https://www.gov.br/servidor/pt-br/siass/assuntos/noticias/24-de-marco-dia-mundial-de-enfrentamento-a-tuberculose/caderno_atencao_basica.pdf/view.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA). **Resolução RDC nº 166**, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**, 2019. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf.

Castelo-Branco, F. S.; Lima, E. C.; Domingos, J. L. O.; Pinto, A. C.; Lourenço, M. C. S.; Gomes, K. M.; Costa-Lima, M. M.; Araújo-Lima, C. F.; Aiub, C. A. F.; Felzenszwalb, I.; Costa, T. E. M. M.; Penido, C.; Henriques, M. G.; Boechat, N. New hydrazides derivatives of isoniazid against Mycobacterium tuberculosis: Higher potency and lower hepatocytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 146, 529–540, 2018.

De Lima, P. C. **Desenvolvimento de um método de análise para a determinação simultânea do teor de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da tuberculose**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

Eldehna, W. M.; Fares, M.; Abdel-Aziz, M. M.; Abdel-Aziz, H. A. Design, Synthesis and Antitubercular Activity of Certain Nicotinic Acid Hydrazides. **Molecules**, 20(5), 8800-8815, 2015.

Ellard, G. A. Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 19(5), 610-625, 1976.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Quais são os sintomas da tuberculose?** 2022a. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/quais-sao-os-sintomas-da-tuberculose>.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmanguinhos isoniazida + rifampicina**. 2022b. Disponível em: https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2022/10/Farmanguinhos-isoniazida-rifampicina_Bula_Paciente.pdf.

Hu, Y. Q.; Zhang, S.; Zhao, F.; Gao, C.; Feng, L. S.; Lv, Z. S.; Xu, Z.; Wu, X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 133, 255-267, 2017.

Huang, Y. S.; Chern, H. D.; Su, W. J.; Wu, J. C.; Chang, S. C.; Chiang, C. H.; Chang, F. Y.; Lee, S. D. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**, 37, 924-930, 2003.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, 2020.

Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, 469(7331), 483–490, 2011.

Oliveira, V. **Produção, pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para tuberculose**. 2022. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/producao-pesquisa-e-desenvolvimento-demedicamentos-para-tuberculose>.

Ruiz, R. F. **Avaliação do pH e do volume gástrico residual após preparo de cólon com manitol: estudo prospectivo randomizado comparando procedimento realizado 3 horas versus 6 horas depois**. 2020. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Santos, J. L.; Fernandes, G. F. S.; Bosquesi, P. L.; Marino, L. B.; Leite, C. Q. F.; Man Chin, C.; Pavan, F. R. Synthetic Organic Compounds as Potential Antitubercular Drugs: A Review of the Progress Made in the Last Five Years. In: Beatriz, A.; Lima, D. P. (Ed.). **Recent Advances in the Synthesis of Organic Compounds to Combat Neglected Tropical Diseases**. 1st. Ed. Sharjah: Bentham Science, 231–266, 2014.

Shishoo, C. J.; Shah, S. A.; Rathod, I. S.; Savale, S. S.; Vora, M. J. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 228, 53-67, 2001.

Simplício, A. L.; Clancy, J. M.; Gilmer, J. F. Prodrugs for Amines. **Molecules**, 13(3), 519-547, 2008.



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA

Wermuth, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3rd ed. Ed. London: Academic Press, 2008.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report**, Switzerland, 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>.

WHO, World Health Organization. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis**. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment, Switzerland, 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240048126>.