

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE QUÍMICA DE PRÓ-
FÁRMACO COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE
TUBERCULOSE**

José Carlos Venancio Lopes dos Reis

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a): Prof.(a). Dr(a) Jeanine
Giarolla Vargas

São Paulo

2020

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	3
1.2. HISTÓRIA NATURAL DA TUBERCULOSE.....	5
1.3. TRATAMENTO.....	6
1.4. PLANEJAMENTO DE ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS: LATENCIAÇÃO 7	7
2. OBJETIVO.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	10
3.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA.....	11
3.3. COLETA E ANÁLISE DE DADOS.....	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1. METODOLOGIA ANALÍTICA - CLAE.....	12
4.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA.....	20
4.2.1. AJUSTES NA METODOLOGIA DO ENSAIO.....	20
4.2.2. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 1,2.....	20
4.2.3. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 6,0.....	22
4.2.4. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 7,4.....	24
4.2.5. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 8,5.....	25
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÕES.....	29
7. BIBLIOGRAFIA.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
TFA	Ácido trifluoracético
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SNC	Sistema Nervoso Central
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
TEA	triethylamina

RESUMO

REIS, J. C. V. L. **Avaliação do perfil de estabilidade química de pró-fármaco com potencial aplicação no tratamento de tuberculose.** 2020. no. 986-20. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: tuberculose, pró-fármaco, estabilidade química.

A tuberculose é considerada uma das principais causas de morte em todo mundo. Causada, principalmente, pelo o *Mycobacterium tuberculosis*, a enfermidade afeta, essencialmente, os pulmões do paciente levando a sintomas como tosse, dor no peito e fadiga, os quais podem se agravar ao longo da progressão da doença. Atualmente, os fármacos de primeira linha são: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, cujo emprego vem encontrando barreiras de toxicidade e resistência, dificultando, assim, o tratamento.

Diante deste cenário, a busca por alternativas terapêuticas capazes de minimizar os efeitos indesejáveis vem se destacando na comunidade científica. Uma das estratégias adotadas consiste na latenciação, onde, através da derivação de certos grupos funcionais por meio de processos biorreversíveis, compostos são planejados com o objetivo de se aprimorar, por exemplo, propriedades físico-químicas das moléculas originais. Obtém-se, então, o pró-fármaco que, após reações químicas ou enzimáticas *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele.

Face ao exposto, o objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso foi avaliar o perfil de estabilidade química de um pró-fármaco formado por ácido succínico (transportador) e isoniazida (fármaco), em soluções tampão com valores de pH de 1,2, 6,0, 7,4 e 8,0. Pretendia-se, então, mimetizar a passagem da forma latente pelo trato gastrointestinal humano, quando administrado por via oral. Os experimentos foram feitos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, os quais revelaram a estabilidade do composto nas condições estudadas, não havendo, portanto, liberação do fármaco dentro dos limites de detecção do método. Como perspectiva, a estabilidade enzimática e *in vivo* do pró-fármaco deverá ser realizada para que seja avaliada a influência das esterases na clivagem da forma latente.

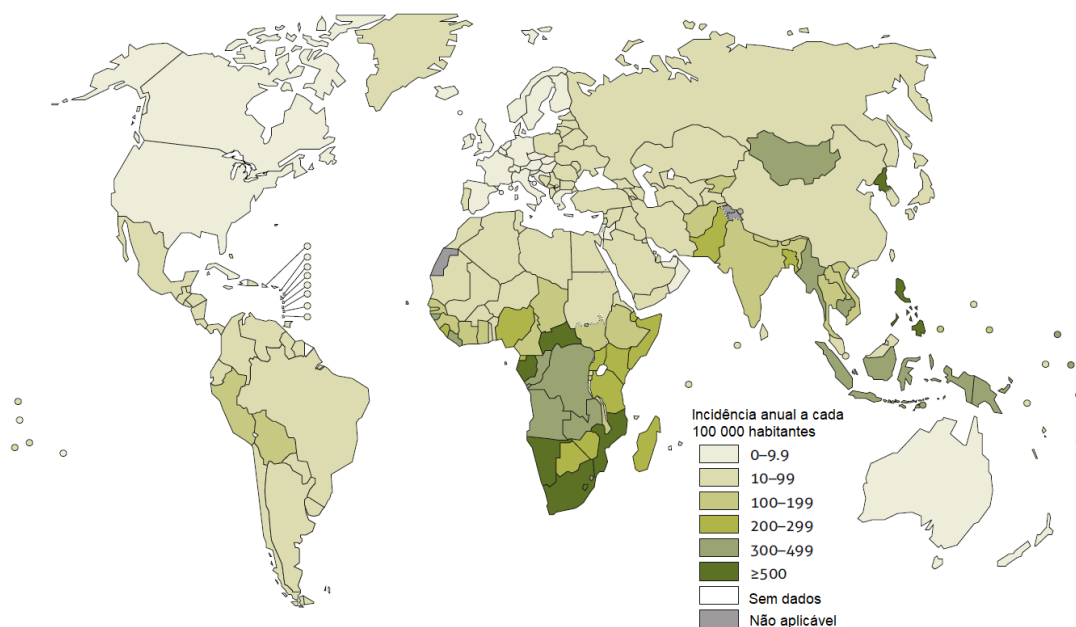
1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das 10 principais causas de morte no mundo, a tuberculose ainda é um grande desafio à saúde pública. Com cerca de 10 milhões de pessoas infectadas, a doença foi responsável por cerca de 1,2 milhões de mortes no ano de 2018 (WHO, 2019).

Dados apresentados no Relatório Global de Tuberculose de 2019 (WHO, 2019) revelam uma redução de 1,6% no número de novos casos no período de 2000 a 2018, mantendo a doença como a principal causa de morte global por um único agente infeccioso deste período. A **Figura 1** a seguir apresenta uma estimativa do total de casos de tuberculose relatados em 2018.

Figura 1 – Incidência de tuberculose pelo mundo em 2018.

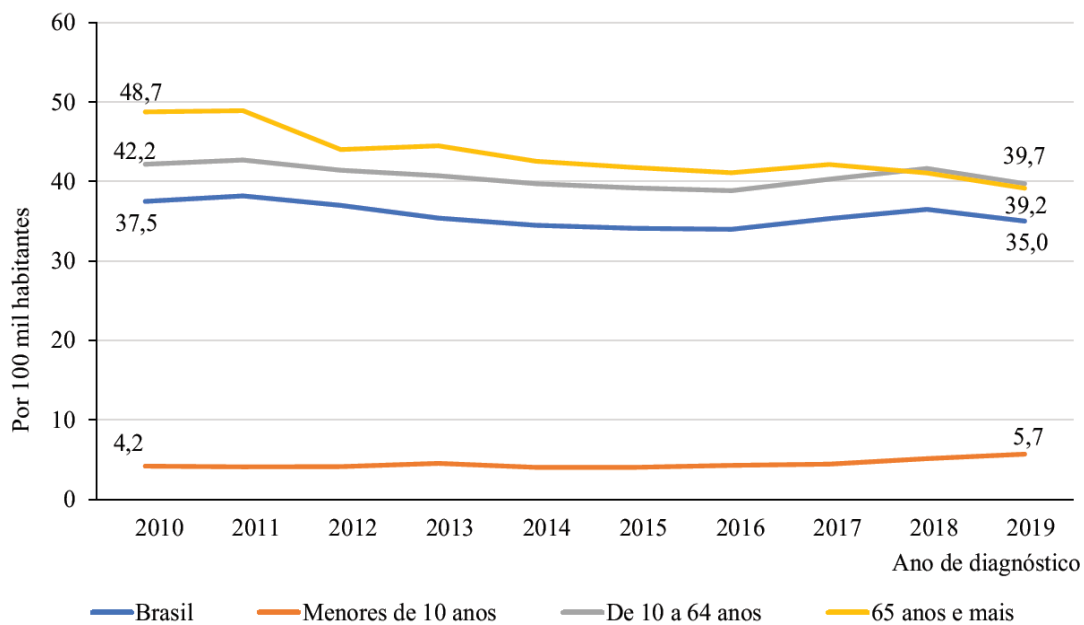


Fonte: WHO, 2019.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, foram diagnosticados 73.864 novos casos de tuberculose em 2019, revelando uma incidência de 35,00

casos/100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). O **Gráfico 1** apresenta a variação no coeficiente de incidência ao longo dos anos e por faixa etária.

Gráfico 1 – Coeficiente de Incidência de tuberculose.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020.

Ainda no âmbito nacional, o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde evidencia a heterogeneidade da distribuição dos casos, apresentando a região Norte como a mais afetada pela doença, seguida pelo estado do Rio de Janeiro, conforme **Figura 2**.

- Cura: Quando o sistema imune de indivíduos saudáveis é capaz de eliminar o agente infeccioso;
- Latência: Quando os macrófagos pulmonares são capazes de restringir a proliferação dos bacilos sem, no entanto, eliminar a infecção. Nesta condição, o indivíduo, embora assintomático e não transmissor, ainda pode desenvolver um quadro agudo de tuberculose anos depois;

- Tuberculose Aguda: Quando a infecção pelo *M. tuberculosis* supera a resposta imune, resultando na morte dos macrófagos (necrose) e destruição do tecido pulmonar.

Não obstante, indivíduos pertencentes a grupos de risco, a exemplo dos imunocomprometidos, podem apresentar uma evolução do quadro para tuberculose extrapulmonar. Nestas condições, os bacilos podem acometer outras regiões do corpo como o sistema linfático, o espaço pleural e a porção geniturinária (CHURCHYARD et al., 2017).

No que se refere às manifestações clínicas da tuberculose, estas dependem do local de crescimento das bactérias. Mesmo assim, uma vez que a *M. tuberculosis* apresenta tropismo pelos pulmões, os seguintes sintomas são comumente observados: tosse por mais de três semanas, dores no peito, fadiga, febre e sudorese noturna (CDC, 2019).

1.3. TRATAMENTO

Devido à composição química da parede celular da *M. tuberculosis*, muitos antibióticos encontram dificuldades em permear tal barreira e agir sobre a bactéria. Mesmo assim, o tratamento de primeira linha contra a tuberculose é realizado com quatro principais fármacos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019): isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, os quais são administrados por dois meses, seguido por um acompanhamento com isoniazida e rifampicina por mais quatro meses.

O surgimento de resistência aos fármacos mencionados anteriormente, bem como de eventos adversos, entretanto, oferece um grande obstáculo para o

tratamento da doença (FURIN et al., 2019). Nesta condição, são empregados fármacos da segunda linha terapêutica, a exemplo da amicacina, cicloserina e etionamida, os quais são, no geral, menos eficazes e mais tóxicos (BANSAL et al., 2018).

Diante de tal cenário, a busca por alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais eficazes no combate à tuberculose têm ganhado espaço. Dentre elas, especial atenção será dada à latenciação.

1.4. PLANEJAMENTO DE ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS: LATENCIAÇÃO

Estratégias de modificações moleculares, com o intuito de aperfeiçoar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, tanto de fármacos já existentes quanto de novas moléculas, têm se destacado no cenário científico.

Uma destas estratégias corresponde ao uso de pró-fármacos. Definidos como moléculas cuja atividade biológica somente é alcançada após processos enzimáticos e/ou químicos de biotransformação *in-vivo*, estas formas latentes são planejadas com o objetivo de aprimorar propriedades das moléculas originais sem, no entanto, comprometer seu uso na terapêutica (SANCHES et al., 2019; WALTHER et al., 2017).

Define-se como latenciação, então, a técnica empregada no processo de obtenção dos pró-fármacos, a qual se baseia na derivação de certos grupos funcionais, através de processos biorreversíveis com pequenas moléculas orgânicas, capazes de “mascarar” características indesejáveis durante o desenvolvimento de um composto (WALTHER et al., 2017).

Através da técnica descrita acima, os pró-fármacos podem ser classificados em cinco grandes grupos (SANCHES et al., 2019):

- Bioprecursores: Definidas como formas latentes isentas de transportador, as quais devem ser metabolizadas, geralmente, pelo sistema redox celular para serem convertidas as suas formas ativas;
- Pró-fármacos clássicos: São aqueles cuja melhora da atividade terapêutica é alcançada através da incorporação de pequenas moléculas, geralmente lipofílicas, à estrutura do fármaco. Definidas como

transportadores, tais moléculas são capazes de melhorar, por exemplo, a biodisponibilidade e seletividade do fármaco sem, neste caso, apresentarem atividade biológica *per se*. Vale ressaltar ainda que, por se tratar de um pró-fármaco, a ligação entre a molécula e o transportador é lábil, permitindo assim sua hidrólise química ou enzimática uma vez *in vivo*;

- Pró-fármacos mistos: São moléculas que apresentam, ao mesmo tempo, tanto características de bioprecursores quanto de pró-fármacos clássicos. Nesta situação, as moléculas devem passar por diversas etapas de biotransformação até chegarem à sua forma ativa. Como exemplo tem-se alguns fármacos de ação no Sistema Nervoso Central (SNC), onde a molécula é biotransformada para permanecer no tecido e, em seguida, liberada de seu transportador para exercer seu efeito farmacológico;

- Pró-fármacos recíprocos: São aqueles cujo transportador, diferentemente do que ocorre com os pró-fármacos clássicos, apresenta atividade biológica. Esta atividade por sua vez, permite o planejamento de moléculas tanto com ação mista (efeitos biológicos distintos para transportador e fármaco original) quanto para ação única (mesmo efeito biológico, porém com diferentes mecanismos de ação), o que abre um grande leque de possibilidades terapêuticas;

- Fármacos dirigidos: Nesta forma latente são utilizados transportadores capazes de levar seletivamente o fármaco de seu local de administração até o sítio de ação, com o objetivo de diminuir reações adversas provenientes de possíveis interações inespecíficas entre o fármaco e outros alvos (ex: enzimas, receptores). Tal seletividade provém da capacidade do transportador interagir com receptores específicos presentes na membrana da célula alvo, resultando na endocitose do conjunto fármaco-receptor, o qual é dissociado no meio intracelular.

Mediante esta gama de possibilidades, nota-se que o emprego de pró-fármacos pode ser um grande aliado na otimização de terapias já existentes. Liberação controlada e melhora de propriedades físico-químicas são apenas algumas das vantagens que as formas latentes oferecem pois, além de reduzir a

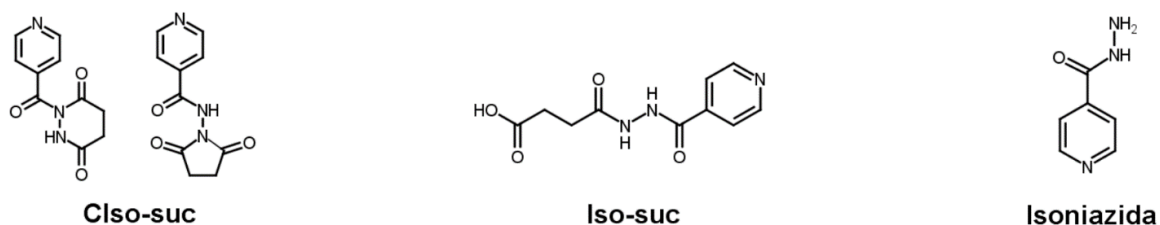
toxicidade de alguns fármacos, esta estratégia permite a administração oral de muitas moléculas antes incompatíveis com esta via (CHO et al., 2018). O resultado é a melhora na adesão e eficácia das terapias convencionais, reduzindo os custos para o setor de saúde e impactando positivamente no bem-estar da população.

2. OBJETIVO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) teve como objetivo dar continuidade ao projeto de Iniciação Científica, de mesma proposta, ao avaliar o perfil de estabilidade química de um pró-fármaco com potencial aplicação para o tratamento da tuberculose.

O composto foi planejado com ácido succínico (transportador) e isoniazida (fármaco). Pretendeu-se avaliar o comportamento de hidrólise desta molécula, aqui nomeada como Clso-suc (**Figura 3**), em soluções tampões com valores de pH de 1,2; 6,0; 7,4 e 8,5, mimetizando a passagem pelo trato gastrointestinal, quando administrado por via oral. Caso a hidrólise ocorresse como esperado, almejou-se avaliar a extensão da liberação de isoniazida (Iso), bem como de seu intermediário (Iso-suc), sendo este último, também, um pró-fármaco:

Figura 3 - Pró-fármaco e seus derivados estudados neste projeto.



Fonte: Autoria própria.

Para tanto, empregou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a qual é definida como técnica de separação baseada nos fenômenos de adsorção e partição do analito entre uma mistura de solventes (fase móvel) e uma superfície sólida (fase estacionária). Esta estratégia permite, não só

a análise qualitativa, mas, também, quantitativa de amostras complexas (BIRD, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

Como ponto de partida para o desenvolvimento do método de identificação e quantificação dos compostos com a técnica de CLAE, foi utilizada, como referência, a metodologia descrita para a isoniazida na Farmacopeia Brasileira – 5ª Edição – Volume 2 (ANVISA, 2010), conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Metodologia farmacopeica para doseamento de isoniazida via CLAE

Parâmetro	Condição
Detector	UV-Vis
Comprimento de Onda	254 nm
Coluna	Octadecilsilano (5 µm) – 250 mm x 4,6 mm
Temperatura forno	Ambiente
Fluxo de Fase Móvel	1,5 mL/minuto
Fase Móvel	Tampão fosfato (pH 6,9) e metanol – 95:5 (v,v)
Volume de Injeção	20 µL
Pratos Teóricos	>1800
Fator de Cauda	<2,0
Fator de Retenção	>2,35

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

A partir dos resultados obtidos nestas análises, ajustou-se o método afim de otimizá-lo, adequando-o aos compostos descritos na **Figura 3**, conforme apresentados na seção “Resultados”.

3.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA

O estudo da estabilidade química do pró-fármaco fora realizado tomando como base a metodologia empregada por Mohammad Najlah (2006) em seu trabalho "*Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs*" (NAJLAH et al., 2006) onde a hidrólise do pró-fármaco, bem como do intermediário succinilado foram feitas em soluções tampões pH 7,4 (tampão fosfato 0,02 M), pH 1,2 (tampão de ácido clorídrico 0,06 M), pH 6 (tampão acetato 0,26 M) e pH 8,5 (tampão borato 0,05 M). A reação iniciou com a adição de quantidade adequada do composto a 5 mL de solução tampão pré-aquecida para gerar concentração final de 2×10^{-6} M. As soluções foram mantidas a 37 °C. Em intervalos de tempos apropriados, amostras (50 µL) foram retiradas e foram adicionados 200 mL de solução metanólica de salicilato de sódio (1,25 mM). As amostras foram armazenadas a -20 °C até que fossem feitas as análises em CLAE.

Com o objetivo de se obter respostas instrumentais acima dos limites de detecção e quantificação do equipamento disponível, alguns parâmetros da metodologia acima descrita tiveram que ser adaptados para o presente trabalho, conforme detalhado na seção "Resultados".

3.3. COLETA E ANÁLISE DE DADOS

O estudo de estabilidade química para o pró-fármaco de interesse fora realizado avaliando-se amostras em triplicata para cada valor de solução tampão estudado, buscando-se verificar a repetibilidade dos dados obtidos.

As amostras foram colhidas em um intervalo de 24 horas, totalizando 12 alíquotas por amostra da triplicata, em cada condição estudada. Este intervalo possibilitou um acompanhamento da variação de área de cada um dos picos de interesse ao longo do tempo.

Com a variação da área em função do tempo de exposição a cada valor de pH fora possível construir um gráfico que reflete a estabilidade do pró-fármaco frente aos diferentes pH avaliados.

4. RESULTADOS

4.1. METODOLOGIA ANALÍTICA - CLAE

O desenvolvimento do método teve início com a escolha de uma coluna cromatográfica mais próxima daquela descrita pela Farmacopeia Brasileira. Para tanto, foram selecionadas colunas de Octadecilsilano (5 μ m), tanto de 250mm x 4,6 mm, quanto de 150 mm x 4,6 mm, de marcas distintas.

Os testes foram realizados com amostras de isoniazida de concentração igual a 1,82 x 10⁻³ M, preparadas em fase móvel conforme descrito na Farmacopeia, tomando como parâmetros de aceitação o fator de cauda, número de pratos teóricos, pureza dos picos e tempo de retenção. A média das cinco análises, para cada coluna, estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Testes das colunas cromatográficas

Coluna	Fator de Cauda	Nº pratos teóricos	Pureza do pico	Tempo de retenção (min)
C18 - MERK 250mm	2,38	2289,23	puro	3,88
C18 - LICHROSPHERE 250mm	1,95	2283,33	puro	7,81
C18 - ACE 150mm	2,48	691,47	puro	3,59
C18 - XBridge 150mm	1,31	4679,87	puro	3,37

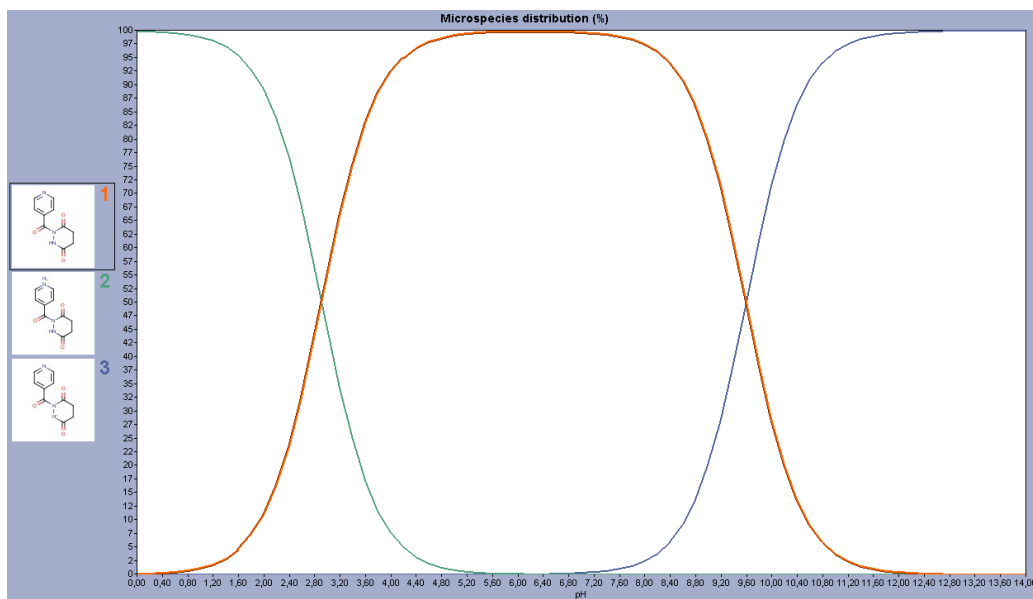
Fonte: Autoria própria.

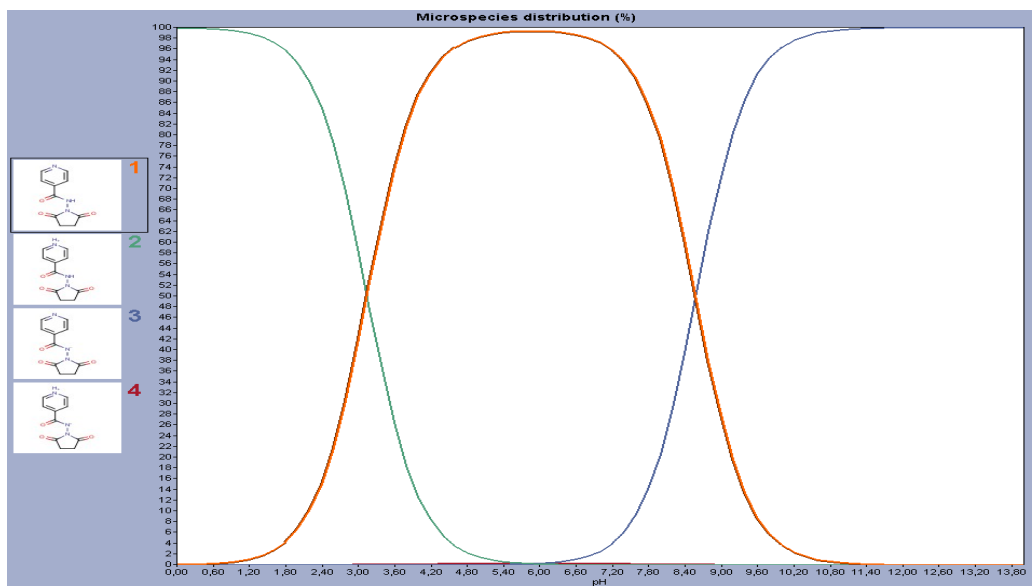
Com base nos resultados apresentados na **Tabela 2**, a coluna C18 – Xbridge (5 μ m) –150 mm x 4,6 mm foi escolhida como a mais adequada dentre as verificadas, uma vez que apresentou o menor fator de cauda e maior número de pratos teóricos.

Esses dados indicaram maior eficiência na separação dos componentes de uma mistura.

A otimização do método prosseguiu com a determinação do pH da fase móvel a ser empregada. Tal determinação teve como objetivo encontrar um valor onde a maioria das espécies analisadas encontrava-se eletricamente neutra, visando uma melhor interação com a coluna cromatográfica. Para tanto, fora realizada a determinação do pKa das espécies Clso-suc, Iso-suc e isoniazida a partir de simulações com o software *MarvinSketch*. As curvas obtidas para cada analito são apresentadas nas **Figuras 4, 5 e 6**.

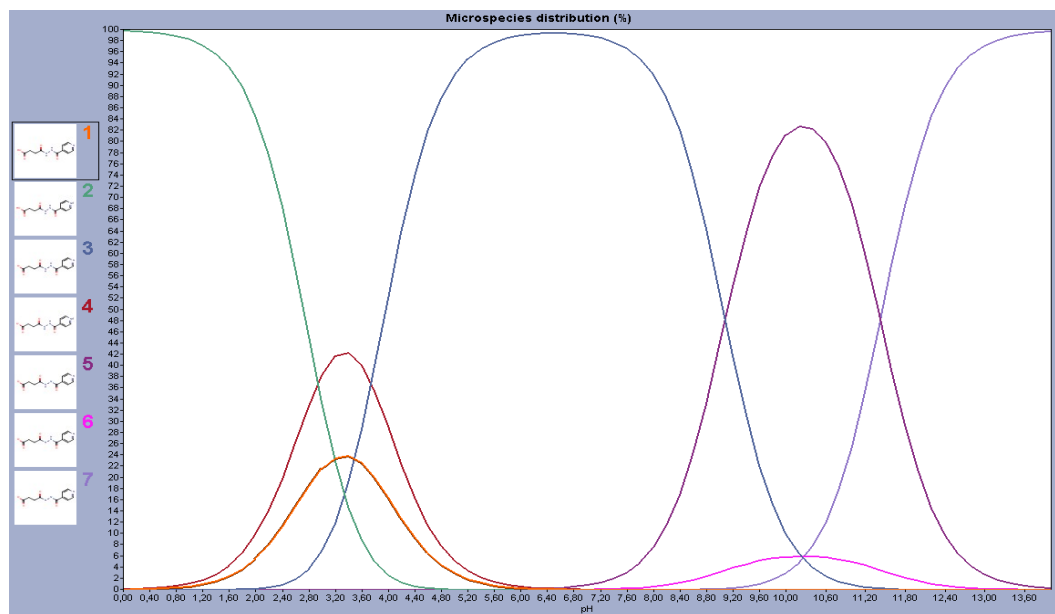
Figura 4 – Curvas de distribuição das espécies da Clso-suc.





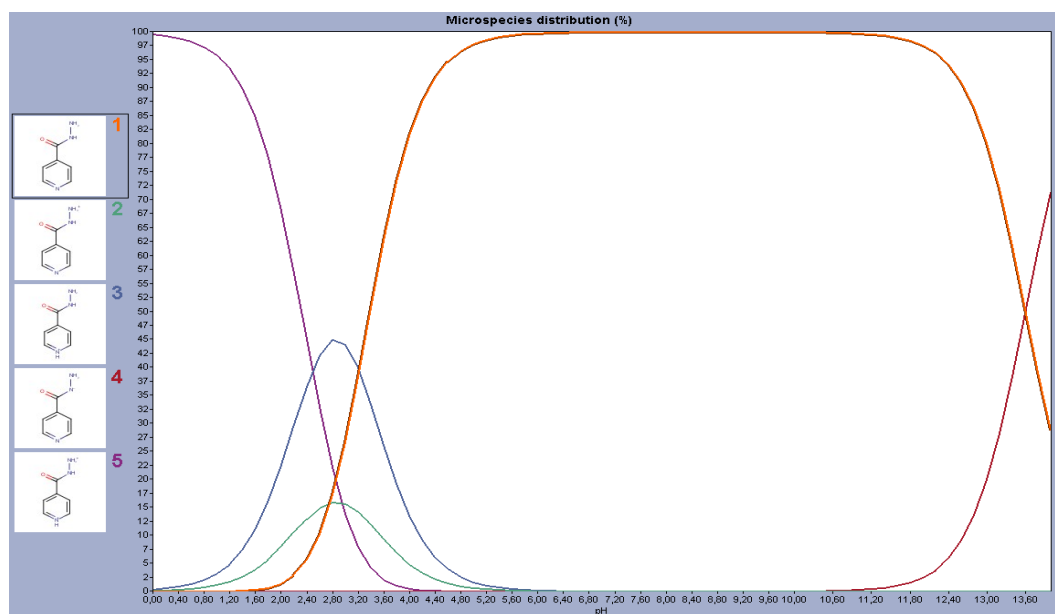
Fonte: Calculado com o software *MarvinSketch*.

Figura 5 - Curva de distribuição das espécies da Iso-suc.



Fonte: Calculado com o software *MarvinSketch*.

Figura 6 – Curva de distribuição das espécies da isoniazida.



Fonte: Calculado com o software *MarvinSketch*

Com base nos resultados apresentados acima, tanto a Iso-suc quanto a isoniazida encontram-se, predominantemente, na forma molecular no valor de pH de 6,9, conforme proposto pela metodologia inicial da Farmacopeia. Entretanto, a Iso-suc mostra-se carregada negativamente e, visando melhorar sua interação com a coluna cromatográfica, foram realizados testes adicionando 0,1% de trietilamina (TEA) ou 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) à fase móvel.

Embora não tenham sido observadas variações significativas no tempo de retenção médio dos analitos, uma melhor simetria dos picos fora constatada com o emprego de 0,1% de TFA, sendo este, portanto, o componente acrescido a fase móvel.

A etapa seguinte de desenvolvimento do método envolveu a determinação da proporção de tampão fosfato e metanol que melhor permitia a separação dos analitos em questão. Como ponto de partida, foram feitas análises na proporção 95:5 (v/v), conforme descrito na Farmacopeia Brasileira. Com o objetivo de melhor separação dos picos de Iso-suc e isoniazida, fora necessário diminuir a proporção

de solvente orgânico para 97,5:2,5 (v/v), para que fosse aumentada a interação destes analitos com a coluna. A média das cinco análises dos tempos de retenção obtidos, para cada proporção, estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Determinação da proporção entre os solventes tampão fosfato e metanol

Analito	Tempo de Retenção (min)	
	95:5 (v/v)	97,5:2,5 (v/v)
Clso-suc	4,952	6,610
Iso-suc	2,413	2,685
isoniazida	3,332	3,930

Fonte: Autoria própria.

O planejamento do método teve continuidade com o aumento da temperatura do forno de ambiente (~25 °C) para o valor constante de 35 °C, com os propósitos de se padronizar a temperatura de análise e melhorar em 0,76 a simetria dos picos. Sabe-se que o aumento de temperatura, dentro dos limites da coluna, favorece a interação dos analitos com a fase estacionária (LANÇAS, 2012).

A penúltima etapa do desenvolvimento do método foi o ajuste do fluxo de fase móvel durante a análise. A escolha de se modificar o fluxo surgiu da necessidade em se aumentar os parâmetros de fator de cauda e número de pratos teóricos. Pretendeu-se, então, assegurar a manutenção destes valores acima dos mínimos ao longo de todo o estudo de estabilidade, uma vez que as numerosas análises poderiam desgastar a coluna e inviabilizar sua utilização durante o ensaio.

Para esta finalidade, foi escolhido trabalhar com um gradiente de fluxo de fase móvel, entretanto, por não se tratar de uma prática frequente, poucas referências foram encontradas acerca deste assunto, de modo que os testes foram realizados empiricamente e os ajustes foram sendo feitos a partir dos resultados gerados. Após serem realizados ensaios em gradientes diferentes, a condição 6 foi escolhida como a mais adequada, uma vez que a variação de fluxo neste intervalo de tempo apresentou a melhor resolução dentre os gradientes testados (aumento

médio de 0,53 em relação aos demais). O gradiente obtido, bem como sua comparação com condições de fluxo constante, é apresentado nas **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 4 – Gradiente de fluxo da condição 6

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)
0,01	0,6
2,0	0,8
5,0	1,0
6,0	1,3

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 – Comparação entre o fluxo constante e o gradiente de fluxo

Analito	Parâmetro	Fluxo		
		0,8 mL/min	1,0 mL/min	Condição 6
Clso-suc	Tempo de retenção	7,639	6,234	5,828
	Fator de cauda	1,701	1,203	1,197
	Número de pratos teóricos	4681,051	6690,351	13489,695
Iso-suc	Tempo de retenção	3,175	2,612	3,190
	Fator de cauda	1,380	1,278	1,315
	Número de pratos teóricos	3206,873	3683,531	4330,149
isoniazida	Tempo de retenção	4,711	3,760	4,237
	Fator de cauda	1,589	1,362	1,364
	Número de pratos teóricos	4762,223	5609,857	6612,388

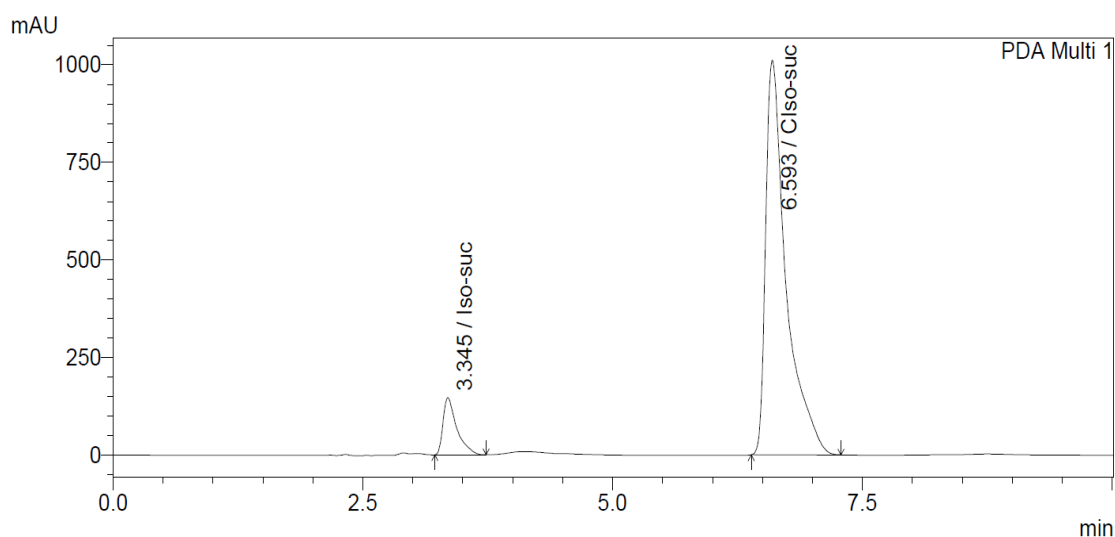
Fonte: Autoria própria.

Por fim, a última etapa de desenvolvimento do método envolveu o ajuste dos volumes de amostra e de injeção, com o propósito de se adequar a quantidade de

analito que chega ao detector dentro limites de detecção. Para tanto, fora necessário, primeiramente, determinar qual a concentração de Clso-suc a ser empregada no ensaio de estabilidade.

Por uma questão de praticidade e de redução da incerteza atrelada a pesagem, a massa inicial de Clso-suc fora estabelecida como 6 mg, os quais foram dissolvidos em 15 mL de fase móvel, resultando em uma concentração molar de $1,82 \times 10^{-3}$ mol/L. Uma vez determinada a concentração inicial e, conhecendo-se o comportamento do detector disponível, foi estabelecido 1 mL como volume de amostra no interior do vial (~2 mL) e 60 μ L como volume de injeção. Desta forma fora alcançada uma intensidade de sinal inicial adequada para o ensaio, conforme representado na **Figura 7**.

Figura 7 – Cromatograma da Clso-suc nas condições otimizadas.



Fonte: Autoria própria.

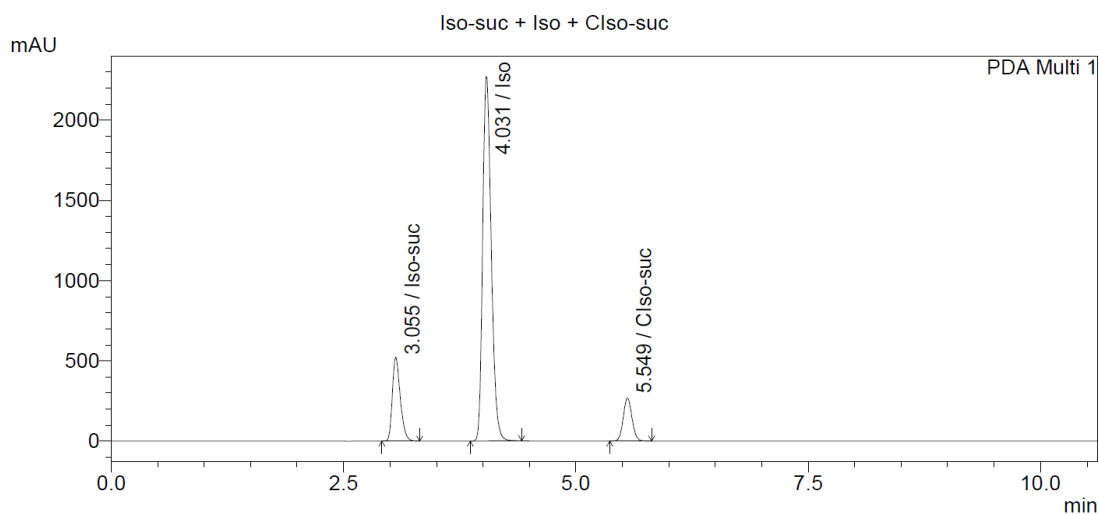
As condições cromatográficas otimizadas foram, portanto, estabelecidas para o ensaio de liberação conforme apresentado na **Tabela 6** e ilustrado na **Figura 8**.

Tabela 6: Condições analíticas otimizadas

Parâmetro	Condição
Detector	UV-Vis
Coluna	Octadecilsilano (5 μ m) – 150mm x 4,6 mm
Temperatura forno	35 °C
Fluxo de Fase Móvel	Condição 6
Fase Móvel	Tampão fosfato (pH 6,9) e metanol (97,5:2,5, v/v)
Volume de Injeção	60 μ L
Pratos Teóricos	>1800
Fator de Cauda	<2,0
Fator de Retenção	>2,35

Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Cromatograma gerado com as condições otimizadas.



Fonte: Autoria própria.

4.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA

4.2.1. AJUSTES NA METODOLOGIA DO ENSAIO

Em virtude da necessidade de adequação do ensaio à metodologia desenvolvida, algumas alterações precisaram ser feitas em relação ao método descrito por Mohammad Najlah e colaboradores (2006).

A primeira modificação refere-se ao volume inicial de solução tampão empregado, que passou de 5 mL para 15 mL. Tal modificação fora realizada com o objetivo de se ter volume de amostra suficiente para coletar alíquotas de 1 mL ao longo do período de 24 horas.

Outra modificação realizada foi o aumento na concentração inicial de pró-fármaco de 2×10^{-6} M para $1,82 \times 10^{-3}$ M, com o objetivo de adequá-la ao limite de detecção do equipamento disponível.

Por fim, a etapa de adição de solução metanólica de salicilato de sódio (1,25 mM) foi removida, haja vista que o objetivo deste composto é promover a precipitação de enzimas em ensaios de estabilidade enzimática, o que não se aplica no presente trabalho.

4.2.2. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 1,2

O ensaio de estabilidade química do Clso-suc em solução tampão de ácido clorídrico 0,06 M e pH 1,2, fora realizado seguindo a metodologia adaptada de Mohammad Najlah e colaboradores (2006), em triplicata, e ao longo de 24 horas, sendo coletadas 12 amostras em diferentes momentos dentro deste período.

Uma vez que não fora observada liberação significativa de isoniazida nesta condição, não foi elaborada uma curva de calibração para quantificação do fármaco. Por outro lado, as médias das triplicatas das áreas obtidas dos cromatogramas, para Clso-suc e Iso-suc, foram plotadas em um gráfico com a finalidade de se visualizar eventuais variações de concentração do pró-fármaco e seu intermediário, conforme apresentado nas **Tabela 7** e **Tabela 8**, bem como no **Gráfico 2**.

A discussão acerca dos resultados observados será apresentada no tópico “Discussão”.

Tabela 7 – Relação entre o número da amostra e o tempo de coleta

Número da Amostra	Tempo de coleta (horas)
T0	0
T1	0,2
T2	0,3
T3	0,5
T4	0,7
T5	0,8
T6	1
T7	1,5
T8	2
T9	2,5
T10	3
T11	21
T12	24

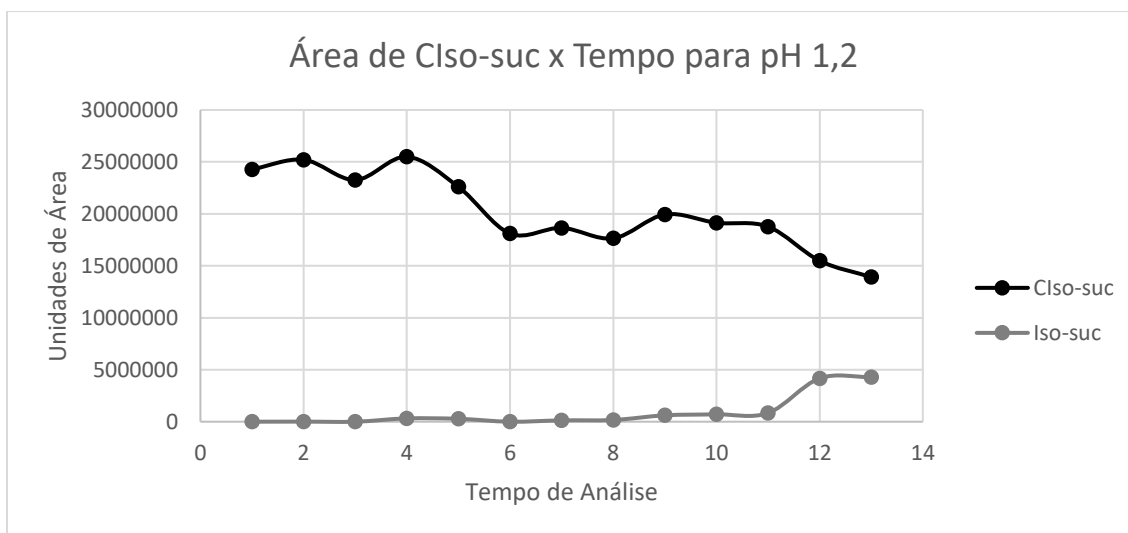
Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 – Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 1,2

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	24282334	0
T1	25210251	7258
T2	23261969	0
T3	25494918	316070
T4	22601230	280079
T5	18103048	0
T6	18649172	128193
T7	17647228	167130
T8	19940223	612957
T9	19144319	710516
T10	18768167	837559
T11	15489071	4173326
T12	13917164	4293758

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 2 – Variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 1,2.



Fonte: Autoria própria.

4.2.3. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 6,0

O ensaio de estabilidade química do Clso-suc em solução tampão acetato 0,26 M, fora realizado seguindo o mesmo procedimento empregado no ensaio anterior (ver **Tabela 7**), afim de se manter um parâmetro de comparação.

Da mesma forma como o ocorrido em pH 1,2, não foi observada liberação de quantidade significativa de isoniazida neste ensaio. Entretanto, um gráfico com a relação das médias das áreas de Clso-suc e Iso-suc também fora plotado, conforme apresentado na **Tabela 9** e **Gráfico 3**.

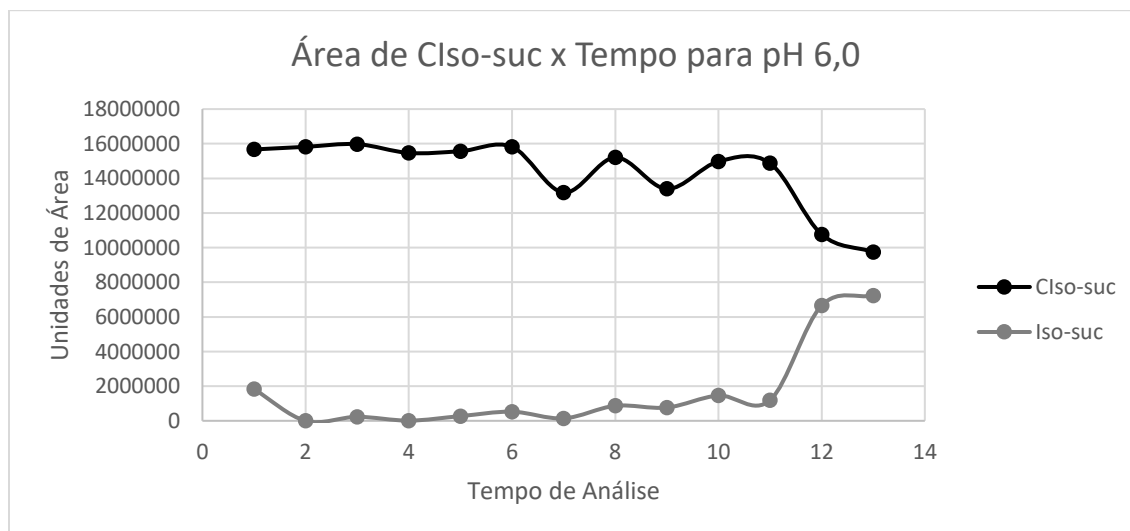
A discussão acerca dos resultados observados será apresentada no tópico “Discussão”.

Tabela 9 – Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 6,0

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	15668571	1830878
T1	15821106	0
T2	15975284	231857
T3	15467310	12028
T4	15566218	272838
T5	15819410	526685
T6	13181978	143555
T7	15204397	867150
T8	13394802	767540
T9	14973192	1458216
T10	14872890	1191123
T11	10765658	6654535
T12	9746752	7231036

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 3 - Variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 6,0.



Fonte: Autoria própria.

4.2.4. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 7,4

O ensaio de estabilidade química do Clso-suc em solução tampão fosfato 0,02 M, também fora conduzido seguindo os mesmos parâmetros empregados para os dois primeiros valores analisados.

Assim como ocorrido nos valores anteriores, não foi observada liberação de quantidade significativa de isoniazida neste ensaio. Entretanto, um gráfico com a relação das médias das áreas de Clso-suc e Iso-suc também fora plotado, conforme apresentado na **Tabela 10** e **Gráfico 4**.

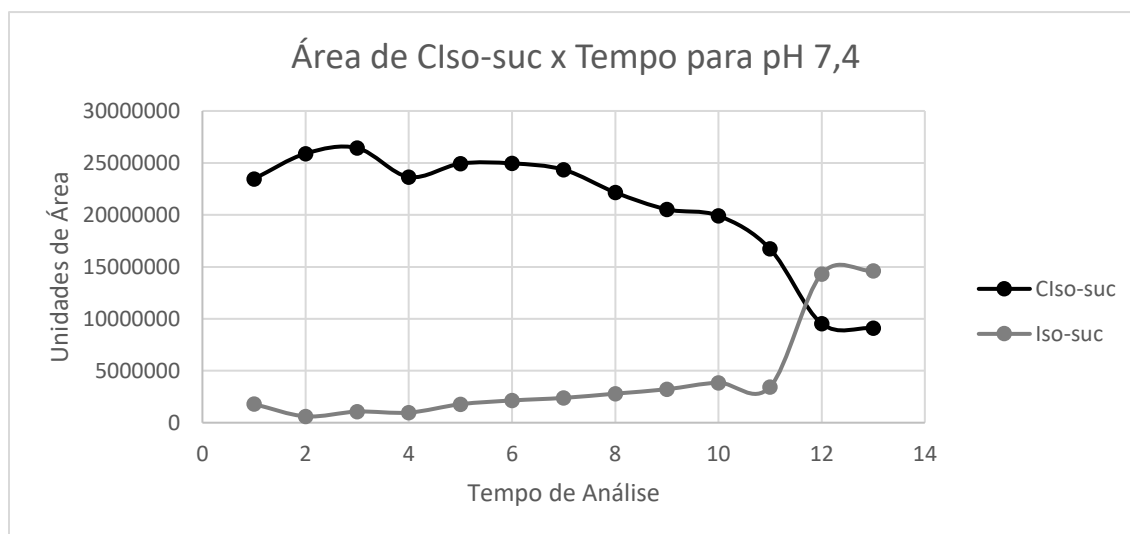
A discussão acerca dos resultados observados será apresentada no tópico “Discussão”.

Tabela 10 – Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 7,4

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	23466350	1793247
T1	25900463	615393
T2	26433645	1071884
T3	23647091,33	973887
T4	24934869,67	1780307
T5	24953982,67	2141859
T6	24345718	2386693
T7	22158901,33	2798471
T8	20529808,33	3221222
T9	19915539,33	3843329
T10	16727201,33	3448101
T11	9543599,333	14317749
T12	9099986,33	14608956

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 4 - Variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 7,4.



Fonte: Autoria própria.

4.2.5. ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO pH 8,5

O ensaio de estabilidade química do Clso-suc em solução tampão borato 0,05 M, fora, por fim, conduzido seguindo os mesmos parâmetros empregados para análise dos demais valores de pH.

Semelhante ao ocorrido nos três valores de pH anteriores, não foi observada liberação de quantidade significativa de isoniazida neste ensaio. Entretanto, um gráfico com a relação das médias das áreas de Clso-suc e Iso-suc também fora plotado, conforme apresentado na **Tabela 11** e **Gráfico 5**.

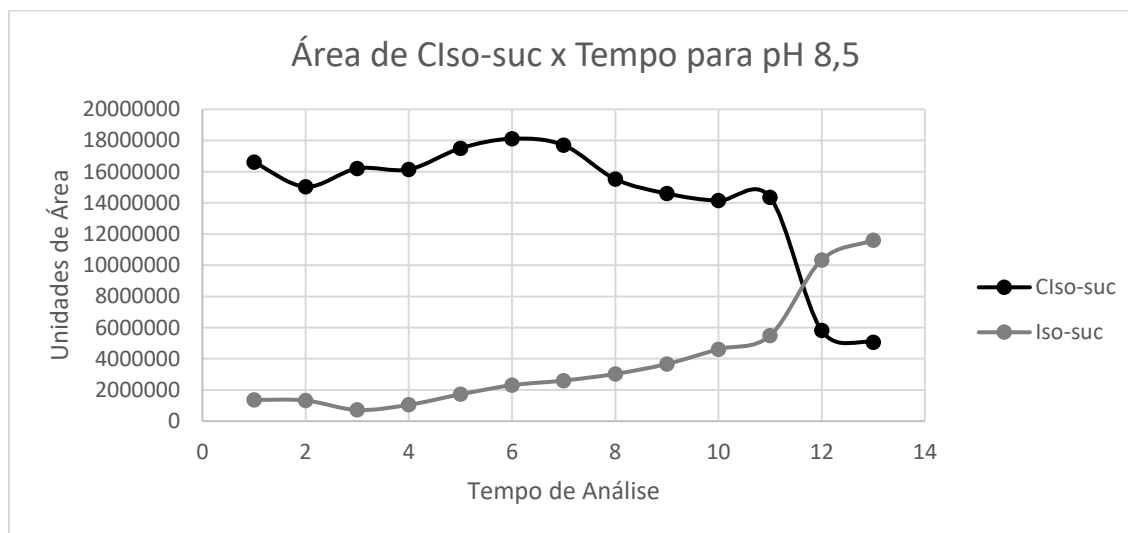
A discussão acerca dos resultados observados será apresentada no tópico “Discussão”.

Tabela 11 – Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em pH 8,5

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	16604510	1366383
T1	15038667	1324008
T2	16210976	714749
T3	16149613	1046567
T4	17501925	1720601
T5	18118573	2304926
T6	17704015	2601910
T7	15529743	3028890
T8	14601338	3664896
T9	14144228	4614864
T10	14361243	5490075
T11	5816111	10335696
T12	5047512	11611643

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 5 - Variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em pH 8,5.



Fonte: Autoria própria.

5. DISCUSSÃO

No que se refere à primeira etapa do projeto, acerca do desenvolvimento de metodologia analítica capaz de separar e identificar o pró-fármaco e seus derivados via CLAE, o objetivo foi alcançado satisfatoriamente. A partir da metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira, ajustes foram realizados nos parâmetros de coluna (Octadecilsilano (5 μ m) – 150mm x 4,6 mm), temperatura do forno (35 °C), volume de injeção (60 μ L), proporção de solventes (Tampão fosfato (pH 6,9) e metanol - 97,5 : 2,5 v/v) e fluxo da fase móvel (gradiente de fluxo – Condição 6), afim de se alcançar condições analíticas de aceitação da técnica de cromatografia líquida estabelecidos por este Código Oficial Farmacêutico.

É importante ressaltar, entretanto, que os parâmetros acima mencionados foram ajustados através de uma sequência de análises de tentativas e erros, avaliando a influência de cada parâmetro nos cromatogramas obtidos. Desta forma, é possível que parte da reprodutibilidade dos resultados seja perdida em análises futuras, caso sejam empregadas colunas cromatográficas distintas do modelo empregado neste estudo. Mesmo assim, não se espera que existam diferenças significativas em eventuais perfis cromatográficos que possam ser obtidos futuramente, não afetando, assim, as conclusões obtidas e aplicabilidade do método.

Referente ao método empregado para o estudo da estabilidade química do pró-fármaco, as modificações realizadas tiveram por objetivo adequar a metodologia aos limites de detecção do equipamento para CLAE disponível para uso. Desta forma, concentração e volume de amostra, bem como volume de injeção, foram ajustados para $1,82 \times 10^{-3}$ M, 1 mL e 60 μ L, respectivamente, afim de minimizar a influência da variabilidade intrínseca do equipamento nos cromatogramas obtidos. Sendo assim, o método para condução do estudo pode ser adaptado futuramente, desde que os parâmetros operacionais do equipamento para cromatografia líquida sejam conhecidos.

Quanto à interpretação dos dados coletados acerca do estudo de estabilidade nas soluções tampões testadas, os **Gráficos 2, 3, 4 e 5** demonstram

que a ligação entre a isoniazida e seu transportador se mantém estável nas faixas de pH de 1,2, 6,0, 7,4 e 8,5 durante 24 horas, mesmo sob agitação e aquecimento a 37 °C, uma vez que não fora observado sinal de isoniazida dentro do limite de detecção do equipamento. Tal constatação pode ser vantajosa na administração oral do pró-fármaco, uma vez que a ligação entre o transportador e o fármaco pode aumentar o tempo de meia vida da isoniazida no organismo. Por outro lado, para este comportamento, ressalta-se a importância da ação da esterase plasmática, uma vez que a liberação do componente ativo se faz necessária.

Não obstante, é possível observar que, a medida em que se aumenta o pH, ocorre aumento da hidrólise do Clso-suc, com abertura do anel e formação da Iso-suc. Na condição mais ácida, cerca de 18% de toda a Clso-suc fora convertida em Iso-suc, seguida pelos valores de 34%, 55% e 62% para os pHs de 6,0, 7,4 e 8,5 respectivamente. É importante ressaltar que, em média, cerca de 11% de toda a Clso-suc degradada não fora convertida em Iso-suc, indicando a formação de outros possíveis produtos de degradação não detectáveis pelo método analítico empregado.

Por fim, os dados obtidos acerca da estabilidade química do pró-fármaco podem servir de base e justificativa para condução de estudos futuros de estabilidade enzimática e estabilidade *in vivo* para que seja comprovado o possível emprego desta nova molécula na terapêutica.

6. CONCLUSÕES

O presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), em continuidade ao trabalho de Iniciação Científica de mesmo nome, possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de identificar e separar, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o pró-fármaco Clso-suc de seus produtos Iso-suc e isoniazida.

Não obstante, fora possível avaliar a estabilidade química do pró-fármaco em soluções tampões com valores de pH de 1,2, 6,0, 7,4 e 8,5 durante 24 horas, indicando a hidrólise de Clso-suc para seu intermediário Iso-suc sem, no entanto, liberar o princípio ativo.

O presente trabalho possibilita, também, o desenvolvimento de projetos futuros acerca da análise da estabilidade enzimática e *in vivo* do pró-fármaco estudando visando futuras aplicações na terapêutica.

7. BIBLIOGRAFIA

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira, volume 2.** 5ª Ed. Brasília, 2010.

BANSAL, R.; SHARMA, S.; SINGH, R. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.18, p.58-71, 2018.

BIRD, I. M. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. **Department of Biochemistry, University of Edinburgh**, v.299, p. 783-787, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico – Tuberculose 2020.** Brasília, DF, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** Brasília, DF, 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tuberculosis: Signs and Symptoms.** Disponível em <<https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/signsandsymptoms.htm>>. Aceso em 26 jul. 2020.

CHURCHYARD, G.; KIM, P.; SHAH, N. S.; RUSTOMJEE, R.; GANDHI, N.; MATHEMA, B.; DOWDY, D.; KASMAR, A.; CARDENAS, V. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of infectious diseases**, v.216, p.S629–S635, 2017.

CHO, S.; YOON, Y.R. Understanding the pharmacokinetics of prodrug and metabolite. **Transl Clin Pharmacol**, v.26, p.01-05, 2018.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancet Journal**, v.393, p.1642-1656, 2019.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v.4, p.13-19, 2012.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D' EMANUELE, A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, p.175-182, 2006.

SANCHES, B. M. A.; FERREIRA, E. I. Is prodrug design an approach to increase water solubility? **International Journal of Pharmaceutics**, v.568, 2019.

WALTHER, R.; RAUTIO, J.; ZELIKIN, A. N. Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.118, p.65-77, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2019**. Geneva, Switzerland, 2019.

Assinaturas

José Carlos O. L. dos Reis - 02/11/2020

Data e assinatura do aluno(a)

José Carlos O. L. dos Reis

03/11/2020

Data e assinatura do orientador(a)