



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ADILIO DA SILVA DADDA

**DETECÇÃO DO COMPOSTO IQG-607: UMA ETAPA ESSENCIAL
PARA FUTUROS ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA**

Porto Alegre

2015

ADILIO DA SILVA DADDA

**DETECÇÃO DO COMPOSTO IQG-607: UMA ETAPA ESSENCIAL
PARA FUTUROS ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Co-Orientador: Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior

Porto Alegre

2015

ADILIO DA SILVA DADDA

**DETECÇÃO DO COMPOSTO IQG-607: UMA ETAPA ESSENCIAL
PARA FUTUROS ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Andre Arigony Souto - PUCRS

Prof. Dr. Jeverson Frazzon - UFRGS

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo – PUCRS

Porto Alegre

2015

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Ivo e Teresinha,
pelo apoio e dedicação

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Luiz Augusto Basso, por ter me acompanhado, depositado confiança, e pelos ensinamentos, que foram fundamentais em todas as etapas deste trabalho, e pela revisão desta dissertação e do manuscrito;

Ao meu co-orientador, Doutor Valnês da Silva Rodrigues Junior, pela confiança e disponibilidade, e também pela revisão desta dissertação.

Ao Professor Diógenes Santiago Santos, pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa, e assim, realizar este trabalho.

À Professora Maria Martha Campos, por ter me direcionado para realização deste trabalho no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) sob orientação do Professor Luiz Augusto Basso.

Aos demais Professores e Pós-doutorandos pelo apoio e ajuda na resolução de problemas.

Aos colegas e ex-colegas do CPBMF que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

A CAPES, e demais órgãos de fomento, pelo financiamento, fundamental para a realização deste trabalho.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

A tuberculose (TB) causada predominantemente por *Mycobacterium tuberculosis* é uma doença infecciosa responsável por um número considerável de mortes em todo o mundo. Os medicamentos utilizados no tratamento de primeira linha atual, e os demais disponíveis, apresentam diversos problemas, como a duração, complexidade, e efeitos adversos, dificultando a adesão dos pacientes ao regime terapêutico. Isto favorece o aumento do número de casos de TB resistente a medicamentos. O pentaciano(isoniazida)ferrato(II) (IQG-607) é um composto proposto para agir contra casos de TB resistentes à INH devido a infecção com cepas que possuem mutações no gene *katG*. O composto demonstrou ser um promissor agente anti-TB em estudos prévios, e a sua eficácia *in vitro* e *in vivo* foi comprovada. No entanto, as dificuldades encontradas no desenvolvimento de um método analítico para a detecção e quantificação do composto devido as suas características químicas estavam impedindo a realização de outros estudos, e dentre eles, a determinação de parâmetros farmacocinéticos. Tendo isto em vista, o presente trabalho descreve, pela primeira vez, dois métodos analíticos para detecção de IQG-607. O método voltamétrico mostrou potencialidade na quantificação do composto, podendo ser utilizado para monitorar a estabilidade e em controle de qualidade. Observamos, por meio deste método, juntamente com ensaios de inibição enzimática, que o IQG-607 é estável em solução por até 1 semana se for mantido a 4°C. A detecção do IQG-607 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também foi demonstrada, e, pela primeira vez, observamos a interação do composto em coluna cromatográfica. Ainda, por CLAE, demonstramos a detecção do IQG-607 no plasma de camundongos, e por ser um método convencional, será otimizado e validado para a realização de futuros estudos de farmacocinética.

Palavras-chave: IQG-607, pentacianoferrato(II), *Mycobacterium tuberculosis*, voltametria, CLAE.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused predominantly by *Mycobacterium tuberculosis* is an infectious disease responsible for a significantly number of deaths worldwide. The first line TB drugs that are currently used, and others available, present several problems, such as duration and complexity of treatment, and adverse effects, factors that decrease the patient adherence to treatment regimen. These problems increase the number of cases of drug resistant TB. The pentacyano(isoniazid)ferrate(II) (IQG-607) compound is an inorganic complex designed to treat INH-resistant strains of *M. tuberculosis* containing mutations in catalase-peroxidase gene, *katG*. The compound appears to be a promising anti-TB drug candidate according to previous studies that demonstrated its effectiveness both *in vitro* and *in vivo*. However, the difficulties encountered in the development of an analytical method for detection and quantification of the compound, due to its chemical properties, were impeding further studies, such as the pharmacokinetic studies. In this context, the present study describes two analytical methods for the detection of IQG-607 for the first time. The voltammetric method was shown to be a powerful analytical tool for quantification of IQG-607 and may be used to monitoring the stability and quality control. The proposed method, together with enzymatic inhibition assay, shown that the IQG-607 is stable for at least 1 week at 4 °C. The detection of IQG-607 by high performance liquid chromatography (HPLC) was also described, and we were able to observe the retention of the compound on the stationary phase of a chromatography column for the first time in this work. In addition, the analysis of IQG-607 in mouse plasma by HPLC was also demonstrated. Therefore, this conventional method will be optimized and validated to conduct pharmacokinetics studies.

Keywords: IQG-607, pentacyanoferrate(II), *Mycobacterium tuberculosis*, voltammetry, HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Histórico da descoberta de fármacos e do desenvolvimento de regimes de tratamentos para a tuberculose.....	12
Figura 2. Número de casos de tuberculose resistente a múltiplos fármacos - Brasil, 2001-2010. Fonte: Sistema de Vigilância de Tuberculose Resistente a Múltiplas Drogas.....	13
Figura 3. Estruturas químicas da isoniazida (A) e do IQG-607 (B).....	16
Figura 4. Mecanismo de ação proposto do IQG-607, mediado por ativação redox.....	16
Figura 5. Imagens representativas de pulmões de camundongos não infectados (A), infectados com <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e não tratados (B, C), tratados com isoniazida (D) e tratados com IQG-607 (E, F).....	17
Figura 6. Vias metabólicas propostas da isoniazida. Linhas contínuas: principais vias metabólicas; Linhas tracejadas: vias metabólicas que ainda estão sendo estudadas; [O]: oxidação.....	19
Figura 7. Cromatogramas referentes às análises do (A) branco e do (B) IQG-607 (100 µg mL ⁻¹) em água Milli-Q. Coluna: Polaris 3 NH ₂ 150 x 2.0 mm, 3 µm. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo 0.025 % de trietilamina (pH:8.0), em um fluxo de 0.5 mL min ⁻¹ . Volume injetado: 100 µL. Detecção: 460 nm.....	54
Figura 8. Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do IQG-607.....	55
Figura 9. Cromatogramas referentes às análises do (A) aminpentacianoferrato(II) e da (B) INH, nas concentrações de 100 µg mL ⁻¹ , em água Milli-Q. Coluna: Polaris 3 NH ₂ 150 x 2.0 mm, 3 µm. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo 0.025 % de trietilamina (pH:8.0), em um fluxo de 0.5 mL min ⁻¹ . Volume injetado: 100 µL. Detecção: 460 nm.....	56
Figura 10. Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do aminpentacianoferrato(II).....	56
Figura 11. Cromatogramas referentes às análises do (A) plasma branco, do (B) IQG-607 em plasma, e do (C) IQG-607 em água Milli-Q contendo ácido tricloroacético. Plasma e água Milli-Q com spike na concentração de 100 µg mL ⁻¹ de IQG-607. Coluna: Polaris 3 NH ₂ 150 x 2.0 mm, 3 µm. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo 0.025 % de trietilamina (pH:8.0), em um fluxo de 0.5 mL min ⁻¹ . Volume injetado: 100 µL. Detecção: 460 nm.....	58

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. VISÃO GERAL DA TUBERCULOSE HUMANA.....	11
1.2. TRATAMENTO DA DOENÇA, EPIDEMIOLOGIA, E O APARECIMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MEDICAMENTOS.....	11
1.3. A ISONIAZIDA E SEU COMPOSTO DERIVADO IQG 607.....	14
1.4. FARMACOCINÉTICA.....	17
1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	20
1.5.1. Voltametria	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23

CAPÍTULO 2

4. ARTIGO CIENTÍFICO	25
-----------------------------------	----

CAPÍTULO 3

5. OUTROS RESULTADOS	52
5.1. DETECÇÃO DE IQG-607 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	52
5.1.1. Materiais e reagentes	52
5.1.2. Condições cromatográficas, soluções padrão e preparação do plasma	52
5.1.3. Análise do composto	53

CAPÍTULO 4

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
--------------------------------------	----

REFERÊNCIAS	63
--------------------------	----

Anexo A	70
----------------------	----

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. VISÃO GERAL DA TUBERCULOSE HUMANA

A tuberculose (TB) causada predominantemente pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) é uma doença infecto contagiosa responsável por um número considerável de mortes em todo o mundo (Koul *et al.*, 2011, WHO, 2014). A transmissão ocorre entre indivíduos através de aerossóis que são expelidos contendo o bacilo e, quando inalados, ocorre a fagocitose por macrófagos alveolares ou células dendríticas (Young *et al.*, 2008). O bacilo afeta tipicamente os pulmões, podendo também afetar outros sítios do organismo, como os ossos, as articulações, o sistema linfático, dentre outros, caso a micobactéria entre na corrente sanguínea do indivíduo (WHO, 2013, Rivers *et al.*, 2008).

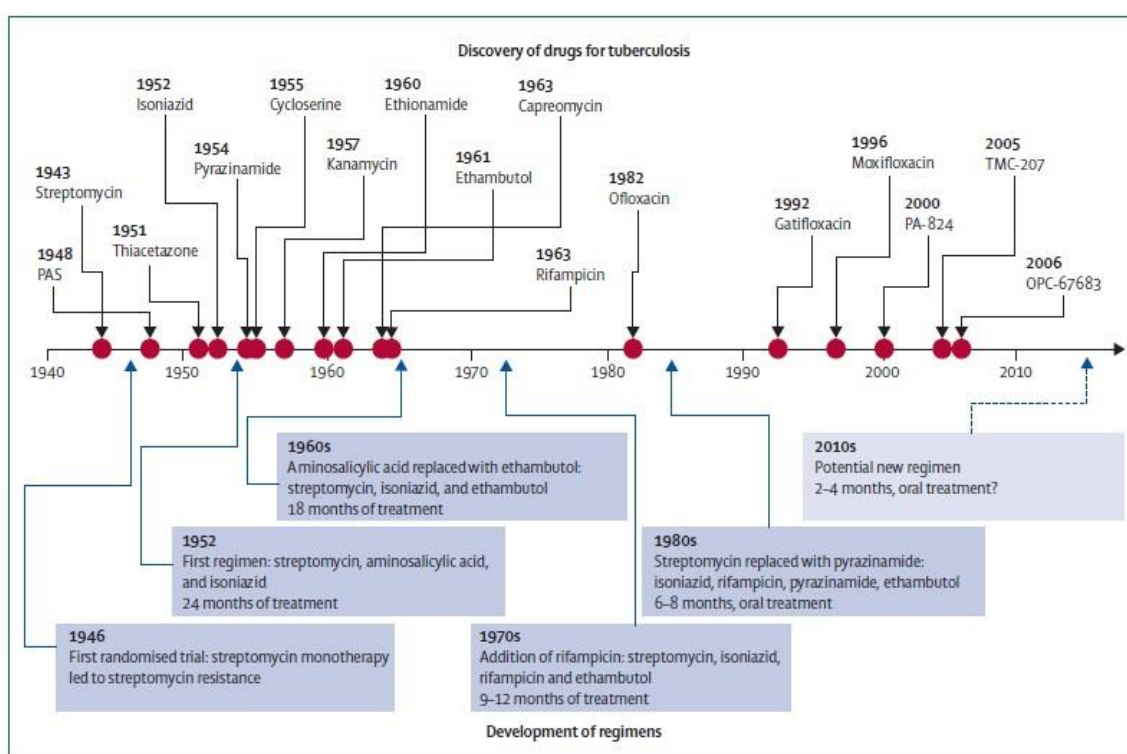
A maneira pela qual o organismo responde à bactéria e a característica da bactéria, no que diz respeito à sua virulência, determinam se a doença estará na forma ativa ou latente (Young *et al.*, 2008). Uma pequena proporção de pessoas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* irá desenvolver a TB ativa, pois em condições normais o sistema imune do indivíduo consegue combater a infecção. Assim, a probabilidade de desenvolver a doença é muito maior em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde a bactéria passa de sua forma latente, para sua forma ativa (WHO, 2011). Os sintomas característicos da TB pulmonar ativa são a tosse persistente por três semanas ou mais (geralmente acompanhada de escarro e sangue), febre vespertina, fraqueza, sudorese noturna, e emagrecimento (WHO, 2014). Os sinais clínicos do paciente, o exame bacteriológico, e a radiografia de tórax são métodos que contribuem para o correto diagnóstico da doença no paciente (Burrill *et al.*, 2010, WHO, 2014).

Dados apontam a TB como sendo a primeira causa de morte devido a infecção por um único agente bacteriano no mundo (WHO, 2014). Das mortes causadas pela TB, aproximadamente 12% estão atribuídas à coinfeção de *Mycobacterium tuberculosis* com o HIV (Oliveira *et al.*, 2006, Gomez, *et al.*, 2004). Além disso, é estimado um total de 8-9 milhões de novos casos da doença por ano no mundo (Oliveira *et al.*, 2013, WHO, 2014).

1.2. TRATAMENTO DA DOENÇA, EPIDEMIOLOGIA, E O APARECIMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MEDICAMENTOS

Diversos compostos foram descobertos na metade do século passado apresentando eficiência terapêutica, gerando perspectivas de que erradicariam a doença (Sousa *et al.*, 2012, Blanchard, 1996). A Figura 1 representa bem o histórico de descobertas de fármacos anti-TB, bem como os regimes de tratamento adotados ao longo dos anos.

Figura 1. Histórico da descoberta de fármacos e do desenvolvimento de regimes de tratamentos para a tuberculose

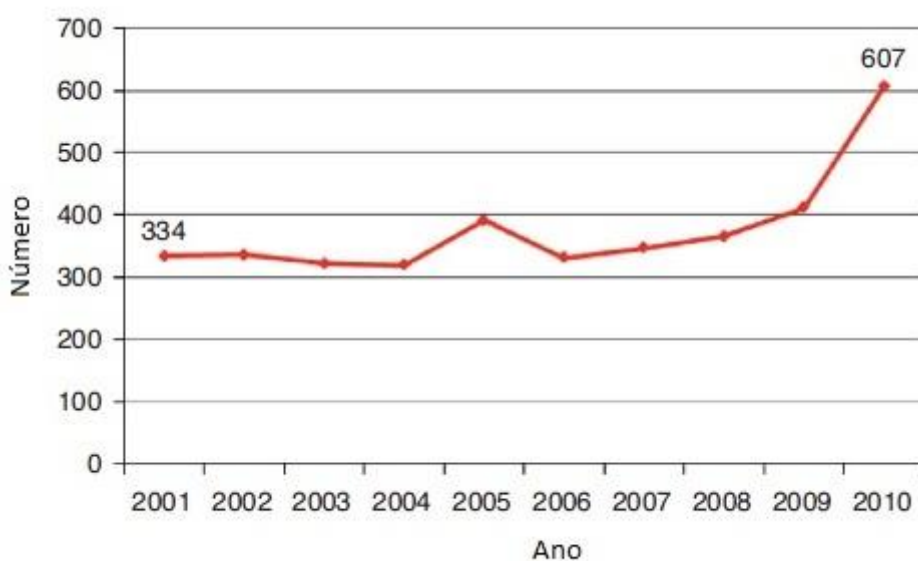


Fonte: Extraído de Ma *et al.*, (2010).

O tratamento de primeira linha atual para a TB consiste em um regime de tratamento contendo etambutol (BEM), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), e rifampicina (RIF), denominado de “RHZE”, e segundo experimentos, apresenta elevada taxa de cura se administrado corretamente durante 6 meses (WHO, 2014). No entanto, este tratamento, e os demais até hoje disponíveis, apresentam diversos problemas, como a duração, complexidade, e efeitos adversos, resultando na não adesão do regime terapêutico pelo paciente (Boogaard *et al.*, 2009, Chan *et al.*, 2002). Esses fatores contribuem para outro sério problema, que é o aumento do número de casos de TB resistente a múltiplos medicamentos (MDR-TB), TB extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB), e

mais recentemente, TB totalmente resistente a medicamentos (TDR-TB) (Boogaard *et al.*, 2009). No Brasil, por exemplo, um estudo mostra que o número de casos registrados de MDR-TB tem aumentado, até o ano de 2010 (**Figura 2**; Oliveira *et al.*, 2013). Este dado pode estar relacionado com o estudo realizado em 2012 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que relata baixas taxas de sucesso no tratamento da TB no país (WHO, 2013). Em escala mundial, é estimado que no ano de 2013, 480 mil pessoas desenvolveram MDR-TB, sendo que destas, 210 mil morreram. Cerca de 9 % dos casos de MDR-TB, são na verdade XDR-TB, e, preocupantemente, os casos de XDR-TB foram relatados por 100 países até o final de 2013 (WHO, 2014).

Figura 2. Número de casos de tuberculose resistente a múltiplos fármacos - Brasil, 2001-2010. Fonte: Sistema de Vigilância de Tuberculose Resistente a Múltiplas Drogas



Fonte: Extraído de Oliveira *et al.*, (2013).

O uso pelos pacientes de regimes terapêuticos parcialmente supressivos de bactérias, devido à não adesão ao tratamento, permite a replicação, e o crescimento de cepas selvagens e/ou mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* (Boogaard *et al.*, 2009, WHO, 2014). Para o tratamento dos casos de MDR-TB o tempo de tratamento é três vezes mais longo, sendo realizado com fármacos de segunda linha, cujos efeitos adversos são maiores, e as chances de cura são baixas (WHO, 2011). A implementação de tratamentos mais curtos e com medicamentos mais eficientes, que apresentem reduzidos efeitos

adversos, facilitaria a adesão ao tratamento dos pacientes, diminuindo, assim, a incidência de cepas resistentes (Ducan, 2003, Aouam *et al.*, 2007).

1.3. A ISONIAZIDA E SEU COMPOSTO DERIVADO IQG-607

A INH é o medicamento mais utilizado contra a infecção ativa e profilaxia da TB, sendo eficiente apenas contra bactérias em crescimento, e não contra bacilos latentes (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012, Basso *et al.*, 1998). Ainda assim, juntamente com a RIF, são os fármacos mais eficientes no tratamento de primeira linha contra a TB, descobertas até o momento, no mercado (Sousa *et al.*, 2012). O mecanismo molecular de ação da INH foi desconhecido por décadas, sendo melhor elucidado com o passar dos anos (Sousa *et al.*, 2012, Ducati *et al.*, 2006). Até então, foi demonstrado que o alvo principal da INH é a enzima codificada pelo gene *inhA* do *Mycobacterium tuberculosis*, denominada de 2-trans-enoil-ACP(CoA) redutase (InhA) (Oliveira *et al.*, 2006, Banerjee *et al.*, 1994). Sendo um pró-farmaco, a INH precisa ser ativada pela enzima peroxidase-catalase da micobactéria (KatG) para exercer sua atividade, sendo que a ativação ocorre na presença de íons manganês, NADH e oxigênio (Basso *et al.*, 1998). Após a ação da KatG sobre a INH, é gerado o fragmento acilpiridina, que é covalentemente ligado a posição C4 do NADH. Com isso, é formado o complexo binário isoniazida-NAD ativo, agindo finalmente contra a enzima InhA selvagem de *M. tuberculosis* (Vilchère *et al.*, 2000, Rozwarski *et al.*, 1998, Banerjee *et al.*, 1994). A enzima InhA pertence ao sistema de biossíntese de ácidos graxos micobacterianos do tipo II, responsável pelo alongamento de ácidos graxos acilados, que são precursores dos ácidos micólicos (Oliveira *et al.*, 2006, Schroeder *et al.*, 2002). Portanto, a INH leva à inibição da enzima InhA de *M. tuberculosis*, ocorrendo uma inibição na biossíntese dos ácidos micólicos que são componentes essenciais da parede da micobactéria (Banerjee *et al.*, 1994). Assim, ocorre lise celular devido a alterações morfológicas na parede celular no organismo (Vilchère *et al.*, 2000). Quanto à resistência à INH, grande parte está relacionada com mutações no gene *katG* da micobactéria, resultando em alterações na enzima KatG que reduzem a ativação da INH (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012, Vasconcelos *et al.*, 2008).

O composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II) (denominado IQG-607), é um análogo da INH, que, no estudo de novas moléculas, demonstrou ser um promissor agente anti-TB (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012, Sousa *et al.*, 2012, Basso *et al.*, 2010). O composto foi

proposto para agir contra os casos de TB resistentes à INH devido a infecção com cepas contendo mutações no gene *katG* (Sousa *et al.*, 2012, Sousa *et al.*, 2005, Basso *et al.*, 2010). A sua estrutura química é semelhante à da INH, sendo que a diferença baseia-se na presença do cianoferrato ligado na porção piridina (Oliveira *et al.*, 2004) (**Figura 3**). Outra semelhança com a INH é quanto ao seu mecanismo de ação, que está relacionado à inibição na biossíntese de ácidos micólicos (Rodrigues-Junior *et al.*, 2014). A presença do centro metálico no IQG-607 imita a ativação da INH pela ação da enzima KatG *in vitro*, por promover uma reação de transferência de elétrons intramolecular frente a agentes oxidantes (Oliveira *et al.*, 2006, Sousa *et al.*, 2014) (**Figura 4**).

Estudos de cinética enzimática demonstraram que o composto IQG-607 não necessita da ativação pela KatG, ou qualquer outra enzima para se ligar a enzima InhA (Oliveira *et al.*, 2004). Devido a esta característica, espera-se que o IQG-607 consiga eliminar cepas resistentes de *M. tuberculosis* contendo mutações nos genes *katG* e *inhA*. Esta proposta foi inicialmente observada em experimentos, pois o composto apresentou atividade satisfatória contra cepas selvagens e mutantes resistentes à INH contendo mutações no gene *inhA* (Basso *et al.*, 2010, Oliveira *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2006, Vasconcelos *et al.*, 2008).

Estudos de investigação da eficácia em animais infectados demonstraram que o composto possui atividade promissora *in vivo*, e após a administração do composto por via oral, ocorreu uma diminuição da carga micobacteriana nos pulmões e baço de animais tratados. Ainda, ocorreu uma redução no número de granulomas nos pulmões após a avaliação clínica macroscópica (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012) (**Figura 5**). Além disso, há evidências experimentais de que o IQG-607 não apresenta toxicidade após a administração de doses usuais e acima das administradas de INH em camundongos (Basso *et al.*, 2010). O composto pode, ainda, se tornar um medicamento de administração oral, pois resultados favoráveis foram obtidos quanto a sua estabilidade em meio ácido ($\text{pH} \leq 2.0$), mostrando um equilíbrio ácido-base reversível de grupos cianetos (CN) com um pK_a de 2.3 (Basso *et al.*, 2010, Oliveira *et al.*, 2004).

Figura 3. Estruturas químicas da isoniazida (A) e do IQG-607 (B)

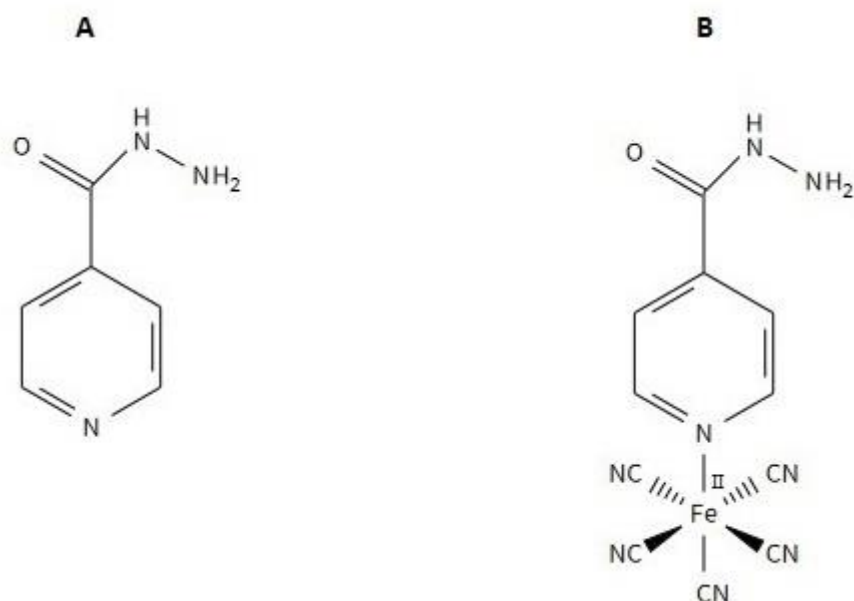
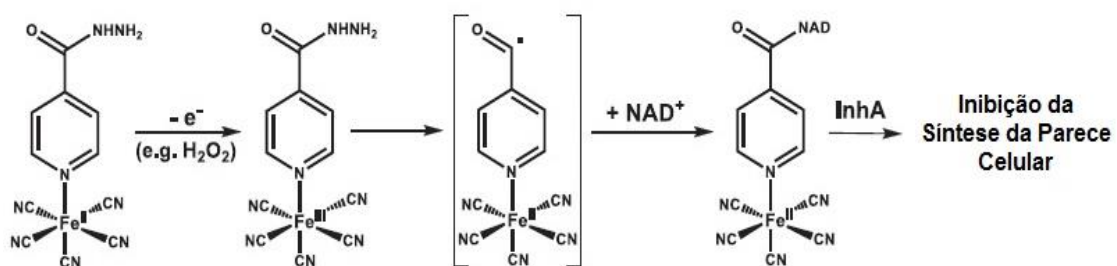
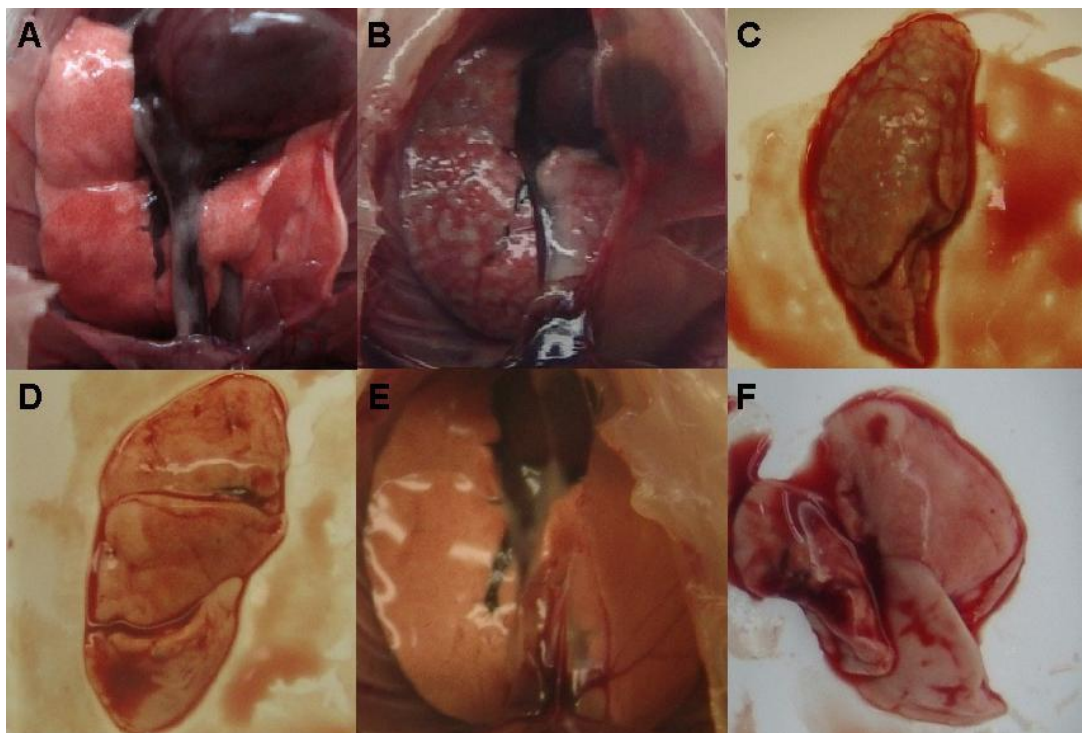


Figura 4. Mecanismo de ação proposto do IQG-607, mediado por ativação redox



Fonte: Adaptado de Sousa *et al.*, (2014).

Figura 5. Imagens representativas de pulmões de camundongos não infectados (A), infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e não tratados (B, C), tratados com isoniazida (D) e tratados com IQG-607 (E, F)



Fonte: Extraído de Rodrigues-Junior *et al.*, (2012).

Os estudos realizados até o momento com o IQG-607, além de sua possível produção em grande escala (Basso *et al.*, 2010), indicam ser um bom candidato para ser testado em estudos clínicos e tornar-se, futuramente, um novo agente antimicrobiano no mercado. No entanto, diferentes etapas de desenvolvimento devem ser realizadas para que isso seja possível, e dentre elas, a determinação de parâmetros farmacocinéticos.

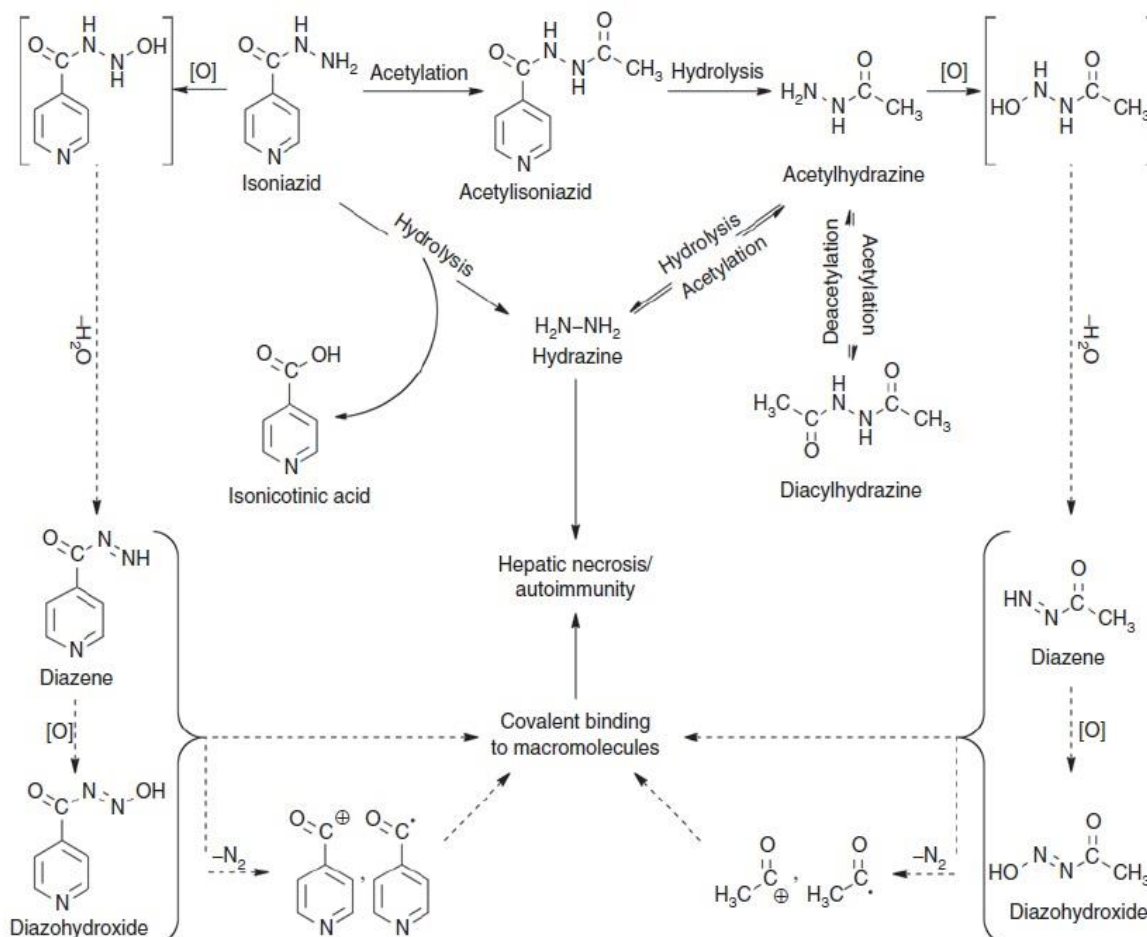
1.4. FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é uma ciência que utiliza modelos matemáticos para descrever a cinética, mostrando a evolução temporária do fármaco e/ou seus metabólitos no organismo (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007, Jang *et al.*, 2001). Os estudos farmacocinéticos são uma etapa importante durante os estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos, que são os estudos pré-clínicos de fase I e de fase II (Groulx, 2006). O organismo é um sistema complexo, sendo que após a administração, o fármaco passa por diversas etapas,

desde a absorção até a excreção. A concentração de um fármaco e a presença dos metabólitos podem ser medidos no sangue total, plasma, soro, e outros fluidos biológicos (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007).

Os metabólitos da INH, e dos demais fármacos utilizados no tratamento de primeira linha contra a TB, são bem conhecidos e descritos na literatura. A Figura 6 mostra a via metabólica proposta para a INH, onde estão envolvidas basicamente reações de acetilação e hidrólise. Em humanos, há a presença de fenótipo que define se o indivíduo é acetilador rápido ou lento, fator que está relacionado com quais metabólitos serão formados em maior quantidade (Davies *et al.*, 1998, Meyer *et al.*, 1997). Desde sua descoberta em 1952, diversos metabolitos foram identificados, como a acetil-isoniazida (AcINH), o ácido isonicotínico (INA), a isonicotinamida (ISN), a hidrazina (HZ), a hidrazona do ácido pirúvico (INH-PA) e do ácido cetoglutárico (INH-KA), a metil-hidrazina (AchZ), a diacetil-hidrazina (DiAchZ), dentre outros (Ellard *et al.*, 1972, Metushi *et al.*, 2011, Mahapatra *et al.*, 2011, Preziosi, 2007). Alguns destes metabólitos também poderão ser identificados em estudos *in vivo* após a administração do IQG-607.

Figura 6. Vias metabólicas propostas da isoniazida. Linhas contínuas: principais vias metabólicas; Linhas tracejadas: vias metabólicas que ainda estão sendo estudadas; [O]: oxidação



Fonte: Extraído de Metushi *et al.*, (2011).

Até o momento, não há estudos de farmacocinética do composto IQG-607, e pretende-se que seja o próximo passo a ser dado pelo grupo de pesquisa envolvido no seu estudo. Após os estudos de farmacocinética, e a avaliação dos metabólitos que estão sendo gerados *in vivo* (inicialmente baseados em metabólitos conhecidos da INH), serão realizados estudos de farmacodinâmica, os testes clínicos, e os demais necessários para quem sabe se tornar um novo medicamento (Hughes *et al.*, 2011). No entanto, para isto, é necessário desenvolver um método analítico para a detecção e quantificação do IQG-607, pois ainda não existem estudos descrevendo tal método. A correta determinação, levando também em consideração o modo correto de armazenamento do analito durante a preparação para a análise, é necessário, e gera perspectivas de validar uma metodologia

que quantifique o analito de interesse, e que futuramente possa ser aplicável em estudos de farmacocinética, e em outros estudos futuros.

1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico é imprescindível para detectar e obter resultados confiáveis na quantificação de um composto de interesse, e assim, realizar a correta interpretação dos resultados (Tiwari *et al.*, 2010). Diversos estudos mostram a análise da INH por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM), em plasma de animais e de humanos (Bhandari *et al.*, 2012, Fang *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2010). Em relação ao IQG-607, ainda não existe um método analítico na literatura que demonstre a sua correta detecção e quantificação. Diversas tentativas de analisar o composto por CLAE foram realizadas pelo grupo de pesquisa envolvido no seu estudo, utilizando diferentes colunas cromatográficas C-18 e de troca iônica. No entanto, até o momento, após realizar variadas tentativas, não foi obtido êxito, provavelmente devido à alta polaridade apresentada pelo composto, o que poderia dificultar a sua retenção nas colunas utilizadas (Sousa *et al.*, 2014). Também foi investigada a possibilidade de detecção do composto por CL-EM, e não foi possível verificar a razão massa/carga (m/z) dos íons formados, e conseqüentemente, impediu a sua detecção. Problemas associados à análise de complexos de cianoferrato por CL-EM são reportados na literatura, onde pode ocorrer perda de cianeto, mudanças no estado de oxidação do ferro, dentre outros. (Henderson *et al.*, 2005). Apesar dos problemas enfrentados até o momento na análise do IQG-607 por métodos convencionais, essas técnicas merecem maiores investigações. No entanto, tendo em vista as dificuldades encontradas na detecção do IQG-607 por essas duas técnicas, alternativas analíticas devem ser investigadas.

1.5.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se obtêm informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química eletroativa, através do registro de corrente (ampère) e potencial (volt) em uma cela eletroquímica contendo eletrodos específicos (Thomas *et*

al., 2001). Na cela eletroquímica encontram-se três (algumas vezes dois) eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência, e eletrodo auxiliar. Estes eletrodos são mergulhados em um solvente iônico denominado eletrólito, que é adicionado na cela eletroquímica para aumentar a condutividade elétrica do solvente, facilitando, assim, a análise (Kounaves, 1997, Heyrovsky, 1966). As medidas de corrente potencial são realizadas nos eletrodos de trabalho estacionários e fixos (Henze, 2001). Entre estes eletrodos, incluem o eletrodo gotejante de mercúrio, o eletrodo de filme fino de mercúrio, o eletrodo de carbono vítreo, o eletrodo de pasta de carbono, além dos eletrodos de metais nobres, como ouro e platina (Henze, 2001). As espécies químicas em análise são detectadas por oxi-redução na superfície do eletrodo de trabalho. Esta oxi-redução ocorre em grupamentos químicos específicos das espécies em um valor de potencial de pico específico (E_p) através de uma varredura de potencial em regiões catódicas e/ou anódicas (Thomas *et al.*, 2001). No presente trabalho optamos por utilizar o eletrodo gotejante de mercúrio que apresenta vantagens em relação a outros eletrodos, pois renova a superfície de mercúrio antes de cada análise, e é livre de irregularidades que podem ser prejudiciais (Brett *et al.*, 1996). Os eletrodos de referência e auxiliar que utilizamos foram os de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e de platina, respectivamente, que são comumente utilizados em voltametria. O eletrodo de referência possui um potencial conhecido com exatidão, e o auxiliar evita processos eletrolíticos, equilibrando as reações que ocorrem na cela eletroquímica, tornando a análise possível (Thomas *et al.*, 2001).

A voltametria pode ser dividida em três técnicas, sendo elas: a voltametria cíclica, a voltametria de pulso (pulso normal, pulso diferencial, e onda quadrada), e a voltametria de varredura (varredura catódica, anódica e adsortiva) (Kounaves, 1997). Cada uma destas técnicas deve ser escolhida de acordo com a finalidade requeridas das análises. Em geral, as vantagens analíticas da voltametria incluem excelente sensibilidade na análise de espécies orgânicas e inorgânicas, a possibilidade de utilização de uma série de solventes e eletrólitos, a utilização de diferentes temperaturas nas medições, dentre outras (Kounaves, 1997). Em resumo, por ser uma técnica bastante sensível, a voltametria é muito utilizada para medir traços de espécies orgânicas e inorgânicas (Wang *et al.*, 2006).

Entre as técnicas voltamétricas, a voltametria de pulso diferencial é a mais usada como ferramenta analítica, devido a sua ótima resolução, especificidade, e possuir uma maior sensibilidade quando comparada as outras técnicas (exceto as de varredura). Esta técnica é comparável à voltametria de pulso normal, onde o potencial é também obtido em uma

série de pulsos. A diferença é que na voltametria de pulso diferencial o pulso aplicado é de pequena amplitude (10 a 100 mV), e é sobreposto em uma rampa de potencial com variação lenta. Ainda, as correntes são medidas antes de o pulso ser aplicado, e no final do pulso. Este processo é realizado para minimizar a corrente não-faradaica, que é uma corrente residual não relacionada com a concentração do analito em estudo (Kounaves, 1997).

Estudos demonstram a possibilidade da realização de análise por voltametria de moléculas com algumas características semelhantes às do IQG-607, como por exemplo, a INH, e de moléculas que possuem nas suas estruturas o pentacianoferrato, além do próprio ferro iônico (Asadpour-Zeynali *et al.*, 2010, Leandro *et al.*, 2009, Ghoneim *et al.*, 2003, Toma *et al.*, 1977, Pirzad *et al.*, 1994, Basu *et al.*, 1994). Ainda, um estudo demonstra a possibilidade da realização da farmacocinética da INH, com um limite de detecção e quantificação mais satisfatório do que outros métodos analíticos propostos (Ghoneim *et al.*, 2003). Portanto, a voltametria é um método alternativo que deve ser investigado na tentativa de detectar o IQG-607, já que moléculas com características semelhantes ao composto já foram analisadas empregando tal método.

2. JUSTIFICATIVA

Com o aumento do número de casos de resistência, se torna imprescindível o desenvolvimento de novos medicamentos anti-TB. As características apresentadas, até então, pelo composto-líder IQG-607 indicam ser um possível candidato para estudos clínicos, e avançar no processo de desenvolvimento de um novo medicamento (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012, Rodrigues-Junior *et al.*, 2014, Basso *et al.*, 2010). No entanto, primeiramente é necessário determinar características importantes do novo composto, como: absorção, eliminação, metabolização e excreção. Algumas destas características determinam falhas importantes apresentadas durante o desenvolvimento de novos medicamentos (Basso *et al.*, 2010, Greaves *et al.*, 2004).

A detecção e quantificação direta do IQG-607 são fundamentais para futuros estudos de farmacocinética, estudos mais detalhados de estabilidade, dentre outros. Neste contexto, a estratégia do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método voltamétrico para a detecção do IQG-607, e avaliar a possibilidade de detecção por CLAE. Em suma, este estudo é essencial pelo fato de não haver qualquer método

analítico na literatura que demonstre a detecção e quantificação desse composto candidato a novo fármaco.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para a detecção do composto IQG-607, que poderão servir como suporte para futuros estudos de farmacocinética.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método voltamétrico para detecção e quantificação do composto IQG-607.
- Avaliar o perfil eletroquímico e a formação de produtos de degradação pelo método proposto após submeter soluções padrão de IQG-607 a diferentes condições de temperatura.
- Realizar ensaios de inibição enzimática do IQG-607 após submetê-lo às mesmas condições de temperatura das análises voltamétricas.
- Avaliar a possibilidade de detecção do IQG-607 em plasma de camundongos por CLAE.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

4. ARTIGO CIENTÍFICO

“Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis.”

Artigo submetido para o periódico *Electrochimica Acta* (Fator de Impacto 4.504).

Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis

Adilio da S. Dadda^{a,b}, Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,b}, Mariane Rotta^{a,c}, Leonardo K. B. Martinelli^{a,b}, Maria M. Campos^{a,c,d}, Eduardo H.S. Sousa^e, Antônio F.M. Pinto^a, Pablo Machado^{a,b}, Luiz A. Basso^{a,b,c,*}, Diógenes S. Santos^{a,b,*}

^aCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 6681/12A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, PUCRS, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, , 6690/60 Av. Ipiranga, 90610-000, Porto Alegre, RS, PUCRS, Brazil

^dInstituto de Toxicologia e Farmacologia, , 6681/12C Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, PUCRS, Brazil

^eDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Cx. Postal 6021, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

*To whom correspondence may be addressed: luiz.basso@pucrs.br or diogenes@pucrs.br

ABSTRACT

A voltammetric method was employed to detect and quantify pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compound (IQG-607), which is an inorganic complex with anti-tuberculosis (TB) activity. The technique used was differential pulse voltammetry (DPV) and McIlvaine buffer used as electrolyte. The compound presented three peaks in -0.70 V, -0.95 V and -1.1 V. Optimization of the method to improve the peak current was carried out by varying different factors such as: pulse amplitude, pulse time, deposition time, deposition potential, and pH of the electrolyte. The calibration curve was linear for IQG-607 concentrations ranging from 1 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The stability of IQG-607 stock solution at two temperatures was investigated by the DPV method, and concomitant *M. tuberculosis* 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) reductase (*MtInhA*) enzyme activity measurements were carried out. These results suggest formation of isonicotinic acid (INA) in -1.2 V as degradation product, and revealed that the compound is stable for at least 1 week at 4 °C in solution. In addition, the correlation between reduction in the value of the first-order rate constant of *MtInhA* enzyme inhibition and IQG-607 chemical stability provides evidence that the latter, and not its metabolite(s), is the active chemical compound. The optimization of experimental conditions to detect and quantify the IQG-607 compound by the DPV method represents a solid basis for further pharmacokinetic studies. The IQG-607 compound may be an example of a promising metal-based antimicrobial that inhibits the activity of a validated and druggable target (*MtInhA*) aiming at the development of an anti-TB agent.

Keywords: Pentacyanoferrate(II); inorganic complex; anti-tuberculosis activity; differential pulse voltammetry; *InhA*

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, whose main pathogen is *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazid (INH) is a first-line antibiotic used in TB therapy [1]. INH is a pro-drug that is activated by a catalase-peroxidase enzyme (KatG) forming a covalent adduct with the NAD(H) cofactor. The INH-NAD adduct has been shown to inhibit the *M. tuberculosis* 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase (*MtInhA*) enzyme, which belongs to the mycobacterial type II fatty acid synthase (FAS-II) system [2-4]. However, the emergence of *M. tuberculosis* strains resistant to both INH and to other drugs currently used for the treatment of TB has reinforced the need for the development of new chemotherapeutic agents to treat this disease [5-7].

The pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compound (IQG-607) is an inorganic complex designed to act against INH-resistant strains of *M. tuberculosis* harboring mutations in catalase-peroxidase gene, *katG* [8,9]. This compound (Fig. 1) is a slow-binding inhibitor of *MtInhA* enzyme, with a true overall dissociation constant value of $70 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ [10]. The presence of pentacyanoferrate(II) moiety is thought to mimic the *in vitro* activation of INH by KatG enzyme, indicating that IQG-607 would not require the mycobacterial catalase-peroxidase enzyme to exert its action, and thus might overcome this mechanism of INH resistance [10,11].

The *in vitro* effectiveness of IQG-607 was observed in macrophage model of *M. tuberculosis* infection, showing a similar effect to that displayed by INH and rifampicin (RIF) [12]. The *in vivo* efficacy of IQG-607 was also observed in murine model following oral administration of *M. tuberculosis* with an effect comparable to INH [13]. Interestingly, high doses of IQG-607 (10-fold larger than INH) were administered in mice, and no signs of toxicity were observed [13]. Accordingly, the IQG-607 compound

appears to be a promising candidate for anti-TB drug development efforts. However, a number of development steps should be taken before embarking on costly clinical assays [14,15]. A critical step is the development of an analytical method to detect the primary compound and, hopefully, its likely metabolites.

To the best of our knowledge, there has been no analytical method described in the literature to detect and quantify the IQG-607 compound. We have tried a number of experimental protocols to detect the IQG-607 compound by HPLC using a variety of mobile phases and column types, including normal and reverse phases. However, no attempt was successful, probably due to the high polarity of IQG-607, which could hinder its retention in chromatographic columns [8,16]. Issues associated with the analysis of pentacyanoferrate complexes by mass spectrometry, such as loss of cyanide and changes in oxidation state, have also been reported [17]. However, it needs to be shown whether or not there is any cyanide release or change in oxidation state for IQG-607 in solution. Voltammetry is an alternative technique that should be investigated, as several reports have shown the usefulness of electrochemical methods in the analysis of INH [18-24] and pentacyanoferrate complexes [25-28].

The aim of the present study was to apply and optimize a voltammetric method for determination of IQG-607. Detection and determination of the limit of detection and limit of quantification of IQG-607 were carried out by using the differential pulse voltammetry (DPV) method. Chemical stability of IQG-607 was also evaluated by the DPV method under various experimental conditions, and the results were compared with changes in the *MtInhA* enzyme inhibition by IQG-607. It is hoped that the analytical method here described will provide a solid foundation on which to base pharmacokinetic studies (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) of IQG-607, a metal-based compound with potential anti-TB activity.

2. Materials and Methods

2.1. Measuring apparatus

An equipment 757 VA Computrace (Metrohm, Switzerland) was used for differential pulse voltammetry (DPV) measurements. The electrochemical cell was composed by three electrodes: multimode electrode (MME) as working electrode operating in the hanging mercury drop electrode (HMDE), platinum auxiliary electrode (Pt), and silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference electrode containing 3 mol L⁻¹ of potassium chloride (KCl). All experiments were carried out at room temperature (25 °C). For *MtInhA* enzyme inhibition assays, an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan) was employed.

2.2 Reagents and solutions

The IQG-607 was synthesized with purity higher than 99%, and its chemical structure characterized according to Oliveira *et al.* [10]. INH 99% (Acros Organics, Belgium) and Isonicotinic acid (INA) 99% (Sigma-Aldrich, USA) were used as controls. The supporting electrolyte McIlvaine buffer was prepared by dissolving appropriate amounts of sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄) ≥ 99.0% (Sigma-Aldrich, USA) 0.2 mol L⁻¹ and citric acid anhydrous ≥ 99.5% (Sigma-Aldrich, USA) 0.1 mol L⁻¹. Milli-Q water (Millipore) was used in the preparation of all solutions. The 2-*trans*-dodecenoyl-CoA (DD-CoA) substrate was synthesized according to the protocol described in section 2.3.2. The Na₂HPO₄ buffer pH 7.5 (Synth, Brazil), NADH (Acros Organics, Belgium), and Pipes (Sigma-Aldrich, USA) were the chemicals used in *MtInhA* enzyme inhibition assays.

2.3. General Procedures

2.3.1. Voltammetric measurements

For voltammetric measurements, 5 mL of McIlvaine buffer electrolyte (pH 7.5) were added to a voltammetric vessel of 5 mL, and 100 μL of Milli-Q water was added. The “measure blank” analysis option (757 VA Computrace Software 2.0) was activated to subtract the signal of the electrolyte, obtaining a straight baseline. IQG-607 detection method was optimized by varying the following parameters: pulse amplitude in the range 0.01 – 0.1 V, pulse time (0.02 – 0.1 s), deposition time (0 – 120 s), and deposition potential (-0.3 – -1.4 V), to obtain the best sensitivity. The effect of pH of the electrolyte on the peak potential (V) and peak current (nA) of the IQG-607 was also evaluated in the range 2.5 – 9. Hence, the analysis was performed under the following optimized parameters: 1 kgf cm^{-2} of nitrogen purge gas during 150 s, -0.3 V deposition potential, 90 s deposition time, 10 s equilibration time, 0.012 V voltage step, 75 mV pulse amplitude, 20 ms pulse time, 0.4 V voltage step time, -0.3 V starting potential, and -1.4 V end potential (cathodic direction). After the reading of the signal electrolyte, the electrolyte was dropped from the voltammetric vessel. Thus, 5 mL of the electrolyte were again added to the vessel, and 100 μL of the standard solution of IQG-607 with a concentration of 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was added. The analysis was performed and the electrochemical behavior of the compound obtained. The voltammetric analysis of INH and INA, both at a concentration of 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, were performed under the same conditions as described for IQG-607. The limit of detection and the limit of quantification (LOD and LOQ, respectively) for IQG-607 were evaluated under the optimized method. The quantification was performed by the manual standard addition method. The analytical curve was carried out in the range of 1–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The stability of two stock solutions

of IQG-607 ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) was evaluated. The first stock solution was stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, and the second was incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, both in amber bottles. Changes in the electrochemical behavior were evaluated at time zero, seven (7) days, and thirty (30) days after the date of preparation.

2.3.2. *MtInhA* enzyme inhibition assay

An IQG-607 time-dependent inhibition assay of *MtInhA* was carried out to determine if changes in the electrochemical behavior have any effect on its inhibitory activity, corroborating the voltammetric analysis of compound. Recombinant *MtInhA* was expressed and purified as described elsewhere [29,30]. The substrate DD-CoA was synthesized from Coenzyme A and 2-trans-dodecenoic acid as previously reported [29], and purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) (GE Health Care Life Sciences, UK) using a $19 \times 300 \text{ mm C}_{18}$ $\mu\text{Bondapak}$ column (Waters Associates, USA) as described elsewhere [31]. The concentration of *MtInhA* was determined spectrophotometrically by diluting $10 \mu\text{L}$ of purified enzyme into $500 \mu\text{L}$ using $100 \text{ mM Pipes } 100 \text{ mM}$ (pH 7.0), and using an extinction coefficient of $29,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 282 nm . The enzyme activity assay of *MtInhA* was carried out in the presence of substrates DD-CoA and NADH by monitoring the oxidation of NADH to NAD^+ at 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) during 60 s at 25°C using an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer. *MtInhA* time-dependent inactivation by compound IQG-607 was performed as described by Oliveira et al. [10]. Briefly, $3 \mu\text{M}$ of *MtInhA* was incubated with $500 \mu\text{M}$ of IQG-607 (final concentration in the cuvette of $17 \mu\text{g mL}^{-1}$) and $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ buffer. Aliquots of this mixture were taken at different times and added to the cuvette containing $100 \mu\text{M}$ of DD-CoA and $200 \mu\text{M}$ of NADH with final volume of $500 \mu\text{L}$ to measure the remaining enzymatic activity after IQG-607 incubation. The following

equations were employed to determine the k_{obs} and the $t_{1/2}$ of inhibitor IQG-607 in each condition, respectively:

$$v = v_0 e^{-k_{obs} t} \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \quad (2)$$

where v is the remaining *MtInhA* enzyme activity at time t , v_0 is the enzyme activity at time zero, k_{obs} is the observed first-order rate constant for *MtInhA* inhibition, t is time in seconds, and $t_{1/2}$ is the half-life of the first-order rate constant for enzyme inhibition.

3. Results and discussion

3.1. Voltammetric characteristics of IQG-607

The analysis of IQG-607 by DPV in McIlvaine buffer electrolyte is characterized by the formation of three peaks after the cathodic sweeping; according to instrumental parameters already optimized (the optimization of the method is presented in the next section). The presence of three peaks indicates that the molecule has three electroactive sites, in -0.70V, -0.95 V, and -1.10V (Fig. 2). Previous studies demonstrated that INH has two electroactive sites when analyzed by differential pulse [19,21,23]. Furthermore, analyzing INH using the McIlvaine buffer electrolyte, Leandro *et al.* also found one of the peaks in the potential of approximately -1.10 V [23]. Sulaiman *et al.* [19] and Asadpour-Zeynali *et al.* [21] reported a peak at approximately -1.08V by differential pulse. Analysis of INH (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in the experimental conditions here described

showed a peak in -1.10 V (Fig. 3). These results suggest that INH and IQG-607 have the same electroactive site in approximately -1.10 V. As IQG-607 can be regarded as an INH analog, this finding is not surprising. Accordingly, it is tempting to suggest that this peak reports on the same reduction process, namely, hydrazide group reduction and ammonia release, as reported by Angulo *et al.* [32].

The peak in -0.95 V can be attributed the reduction of the carbonyl group of the hydrazide moiety bound to the pyridine ring of IQG-607, which is likely the same reduction process that occurs with INH [32]. However, comparing figures 2 and 3, the peak for INH appears in a more negative potential than for IQG-607. As IQG-607 has a different electronic configuration due to the presence of the metal center, the reduction occurs at a different potential. The peak in -0.70 V may be reporting on a reduction process similar to what occurs with sodium nitroprusside [28,33,34]. However, further investigation is required as a different reduction process may be involved in the metal center considering the electronic configuration of IQG-607. INH is more electroactive than IQG-607, presenting a current approximately 2-fold higher (Fig. 3). Furthermore, the peaks that differentiate IQG-607 from INH are those that appear in -0.70 V and -0.95 V (Fig. 2); and between these two peaks, the peak in -0.95 V is more electroactive. Accordingly, the peak in -0.95 V was deemed more appropriate to build an analytical method for IQG-607 detection.

3.2. Optimization of the voltammetric method

The influence of different voltammetric parameters on IQG-607 peak in -0.95 V were evaluated, such as pulse amplitude, pulse time, deposition time, and deposition potential. The peak current of IQG-607 augmented with increasing pulse amplitude in the range evaluated (Fig. 4A). Although the highest peak was obtained in 100 mV, the peak in 75

mV was chosen due to high sensitivity without loss of peak resolution, which is preferable for analytical purposes. In the pulse time parameter, it is possible to observe a decrease of the peak current with increasing time (Fig. 4B). A pulse time of 20 ms was thus subsequently employed. The dependence of the peak current was also evaluated by varying the deposition time (Fig. 4C). There was a gradual increase of the current up to 90 s, followed by a decrease at longer deposition time (Fig. 4C). Accordingly, a deposition time of 90 s was chosen for improved sensitivity. The influence of deposition potential on the peak current was studied by varying potentials between -0.3 V and -1.4 V (Fig. 4D). As lower peak current values were observed for larger deposition potential values (Fig. 4D), a value of -0.3 V for deposition potential was deemed more appropriate. Thus, according to the results here presented, the parameters employed in IQG-607 analysis were 75 mV pulse amplitude, 20 ms pulse time, 90 s deposition time, and -0.3 V deposition potential. The other voltammetric parameters were used as recommended by the equipment manufacturer. The dependence of peak current and peak potential on pH of the electrolyte was also evaluated (Fig. 5). No peak current could be observed at pH values lower than 2.5, whereas there was an increase in peak current from pH values from 4.5 to 7.5 (Fig. 5A). A decrease in peak current at pH value of 9 was observed (Fig. 5A). Therefore, pH 7.5 was chosen as optimal for analysis in terms of sensitivity. In addition, the effect of pH on the peak potential displayed an increasing value as a function of increasing pH values (Fig. 5B). Accordingly, these results show that a pH value of 7.5 is appropriate to detect IQG-607 compound by differential pulse voltammetry measurements using the -0.95 V peak.

3.3. Linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The peak current showed a linear dependence on IQG-607 concentrations ranging from 1 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 6), under optimal experimental conditions (pulse amplitude: 75 mV, pulse time: 20 ms, deposition time: 90 s, and deposition potential: -0.3 V). The correlation coefficient (r) value of 0.9991 indicates good linearity. The LOD was 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the LOQ was 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a standard deviation (SD) of 0.04.

3.4. Evaluation of Stability

The stability of a stock solution of IQG-607 (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) stored at 4 °C was analyzed by DPV (Fig. 7A). After 7 days, the peaks in -0.7 V and -0.95 V had a slight increase, the peak in -1.1 V decreased, and a new peak appeared in -1.2 V. Measurements of *MtInhA* activity were carried out to try to correlate these changes with a reduction of enzyme inhibition by IQG-607. The kinetic results showed no reduction in the enzyme inhibition rate constant after 7 days (Table 1). After 30 days, the DPV peaks in -0.7 V, -0.95 V, and -1.2 V showed a further increase, and the peak in -1.1 V showed a further decrease. An approximately 8-fold reduction in *MtInhA* inhibition rate constant was observed after 30 days of incubation at 4 °C (Table 1). The new peak in -1.2 V observed in the DPV analysis probably indicates INA as a degradation product of IQG-607, which is consistent with the decrease in enzyme inhibition rate constant after 1 month at 4 °C (Table 1). The peak in -1.2 V showing the formation of INA was confirmed when the INA standard was analyzed by DPV, under the same experimental conditions (Fig. 8), in agreement with previous reports [35,36]. Interestingly, it has been shown that INA is the main product generated upon oxidation of IQG-607 by H_2O_2 [8, 16]. It is thus tempting to suggest that formation of INA could account for the decrease of the peak in -1.1 V, resulting in less hydrazide from INH moiety of IQG-607 to be reduced during the analysis (Fig. 7A). In

addition, with the loss of hydrazide, the peaks in -0.7 V and -0.95 V exhibit an increase in the current.

The stock solution of the IQG-607 analyzed by DPV upon storage at 37 °C showed similar overall changes in the peaks as occurred with the stock solution stored at 4 °C (Fig. 7B). However, the increase in the peaks that appear in -0.7 V and -0.95 V, and the decrease in -1.1 V are more pronounced. Besides, the intensity of the peak in -1.2 V was greater, indicating that a greater amount of INA is already formed in the first 7 days of storage. Moreover, the compound has shown a faster loss of enzyme inhibitory activity, since there was an approximately 18-fold decrease in the first-order inhibition rate constant after 7 days of incubation (Table 1). On the thirtieth day of storage, the DPV peaks showed the same trend, but with smaller intensity (Fig. 7B). No enzyme activity measurements were carried out at the thirtieth day as the inhibitory activity of IQG-607 was already rather low at day seven (Table 1). Taken together, these results also show that intact IQG-607 is the inhibitor of *MtInhA* enzyme activity and not its degradation products.

The results here reported show that the observed electrochemical changes of IQG-607 upon storage are associated with loss of enzyme inhibitory activity. Accordingly, it can be proposed that the IQG-607 compound is stable for at least 1 week at 4 °C. The only degradation product observed by voltammetry was INA. However, it should be pointed out that other degradation products may have been formed but not detected for not presenting electroactivity.

4. Conclusions

As far as we are aware, the results here presented are the first report on the use of the DPV method to detect and quantify IQG-607 chemical compound. This method has the

advantages of being simple, fast, cost-effective, and good sensitivity (LOD = 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LOQ = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Moreover, IQG-607 chemical stability was monitored by voltammetric measurements and associated with loss of its inhibitory activity of *MtInhA* enzyme. These data provide evidence that IQG-607 (not its metabolites) is the inhibitor of *MtInhA* activity. Information on appropriate temperature of storage should aid further studies to be pursued, including stability in drug formulations. It is hoped that the voltammetric method here described may be employed for detection, stability and quality control studies on IQG-607 chemical compound. Importantly, the analytical method here described represents a fundamental step to pursue pharmacokinetic studies, before embarking on costly clinical phases of anti-TB drug development. Lastly, IQG-607 may be an example of a metal-based drug with antimicrobial activity [37] that inhibits the activity of a validated and druggable target (*MtInhA*) for the development of a chemotherapeutic agent to treat TB.

Acknowledgements

This work was supported by Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S and L.A.B. L.A.B. and D.S.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). V.S.R.J and L.K.B.M. acknowledge scholarships awarded by FAPERGS-CAPES (DOCFIX). A.F.M.P. acknowledges a post-doc scholarship of CNPq. M.R. is the recipient of a doctoral-degree scholarship awarded by CAPES.

References

- [1] World Health Organization, Global tuberculosis report, 2014. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en. Last access on June 10, 2015.
- [2] A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quémar, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R.Jr. Jacobs, *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, 263 (1994) 227, 10.1126/science8284673.
- [3] D.A. Rozwarski, G.A. Grant, D.H. Barton, W.R.Jr. Jacobs, J. Sacchettini, Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, 279(1998) 98, 10.1126/science.279.5347.98.
- [4] C. Vilchèze, F. Wang, M. Arai, M.H. Hazbón, R. Colangeli, L. Kremer, T.R. Weisbrod, D. Alland, J.C. Sacchettini, W.R.Jr. Jacobs, Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolved the target of isoniazid, *Nat. Med.* 12 (2006) 1027, 10.1038/nm1466.
- [5] N.R. Gandhi, P. Nunn, K. Dheda, H.S. Schaaf, M. Zignol, D. van Soolingen, P. Jensen, J. Bayona, Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis, *Lancet*, 375 (2010) 1830, 10.1016/S0140-6736(10)60410-2.
- [6] A. Koul, E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, K. Andries, The challenge of new drug discovery for tuberculosis, *Nature*, 469 (2011) 483. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09657>.
- [7] Z.F. Udawadia, R.A. Amale, K.K. Ajbani, C. Rodrigues, Totally drug-resistant tuberculosis in India, *Clin. Infect. Dis.* 54 (2012) 579, 10.1093/cid/cir889.
- [8] E.H.S. Sousa, L.A. Basso, D.S. Santos, I.C.N, Diógenes, E. Longhinotti, L.G.F.

Lopes, I.S. Moreira, Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 275, 10.1007/s00775-011-0848-x.

[9] L.A. Basso, C.Z. Schneider, A.J.A.B. dos Santos, A.A. dos Santos Jr, M.M. Campos, A.A. Souto, D.S. Santos, An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1384, 10.1590/S0103-50532010000700026

[10] J.S. Oliveira, E.H.S. Sousa, O.N. Souza, I.S. Moreira, D.S. Santos, L.A. Basso, Slow-onset inhibition of 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 2409, 10.2174/138161206777698927.

[11] J.S. Oliveira, E.H.S. Sousa, L.A. Basso, M. Palaci, R. Dietze, D.S. Santos, I.S. Moreira, An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Chem. Commun.* 7 (2004) 312, 10.1039/B313592F.

[12] V.S. Rodrigues-Junior, A.A.S. Junior, A.D. Villela, J.M. Belardinelli, H.R. Morbidoni, L.A. Basso, M.M. Campos, D.S. Santos, IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 43 (2014) 82, 10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021.

[13] V.S. Rodrigues-Junior, A.S. Junior, A.J. dos Santos, C.Z. Schneider, J.B. Calixto, E.H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, A.A. Souto, L.A. Basso, D.S. Santos, M.M. Campos, Activity of IQG-607, a new orally active compound, in murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 40 (2012) 182, 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.019.

- [14] J.P. Hughes, S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott, Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.* 162 (2011) 1239, 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [15] J.R. Turner, *New Drug Development: Design, Methodology, and Analysis*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2007.
- [16] E.H.S. Sousa, F.G.M. Vieira, J.S. Butler, L.A. Basso, D.S. Santos, I.C.N. Diógenes, L.G.F. Lopes, P.J. Sadler, $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]^{3-}$: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy, *J. Inorg. Biochem.* 140 (2014) 236, 10.1016/j.jinorgbio.2014.08.002.
- [17] W. Henderson, J.S. McIndoe, *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*, Wiley-Interscience, Chichester, 2005.
- [18] H. Lund, Polarography and reduction of isonicotinic hydrazide and related compounds, *Acta Chem. Scand.* 17 (1963) 1077, 10.3891/acta.chem.scand.17-1077.
- [19] S.T. Sulaiman, Y.O. Hameed, Differential-pulse polarographic determination of isonicotinic acid hydrazide, and analogous hydrazides in admixture, *Anal. Chim. Acta*, 206 (1988) 379, 10.1016/S0003-2670(00)80862-4.
- [20] J.M.R. Mellado, R.M. Galvín, A note on the mechanism of electroreduction of isoniazid in acidic media, *Electrochim. Acta*, 37 (1992) 1147, 10.1016/0013-4686(92)85236-E.
- [21] K. Asadpour-Zeynali, P. Soheili-Azad, Simultaneous polarographic determination of isoniazid and rifampicin by differential pulse polarography method and support vector regression, *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 6570, 10.1016/j.electacta.2010.06.018.
- [22] M.M. Ghoneim, K.Y. El-Baradie, A. Tawfik, Electrochemical behavior of the antituberculosis drug isoniazid and its square-wave adsorptive stripping voltammetric estimation in bulk form, tablets and biological fluids at a mercury electrode, *J. Pharmaceut. Biomed.* 33 (2003) 673, 10.1016/S0731-7085(03)00311-X.

- [23] K.C. Leandro, J.M. de Carvalho, L.F. Giovanelli, J.C. Moreira, Development and validation of an electroanalytical methodology for determination of isoniazid and rifampicin content in pharmaceutical formulations, *Braz. J. Pharm. Sci.* 45 (2009) 331, 10.1590/S1984-82502009000200019.
- [24] M. Szlósarczyk, R. Piech, B.P. Bator, A. Maślanka, W. Opoka, J. Krzek, Voltammetric determination of isoniazid using cyclic renewable mercury film silver based electrode, *Pharm. Anal. Acta*, 3 (2012) 1, 10.4172/2153-2435.1000189.
- [25] H.E. Toma, C. Creutz, Pentacyanoferrate(II) complexes: Evaluation of their formal potentials and mechanism of their quenching of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) luminescence, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 545, 10.1021/ic50169a008.
- [26] O.R. Leeuwenkamp, E.J. Van Der Mark, H. Jousma, W.P. Van Bennekom, A. Bult, Polarography of disodium pentacyanonitrosylferrate(II): Part 2. Determination at therapeutic levels in serum, plasma, and whole blood, *Anal. Chim. Acta*, 166 (1984) 129, 10.1016/S0003-2670(00)84860-6.
- [27] R. Pirzad, J.C. Moreira, A.O.S.S. Rangel, R.M. Alonso, T.E. Edmons, A.G. Fogg, Differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of sodium nitroprusside at a hanging mercury drop electrode aided by copper(ii) and poly-L-lysine modification, *Analyst*, 119 (1994) 963, 10.1039/AN9941900963.
- [28] K. Ishibashi, S. Tsujimura, K. Kano, Pentacyanoferrate and bilirubin oxidase-bound polymer for oxygen reduction bio-cathode, *Electrochemistry*, 76 (2008) 594, 10.5796/electrochemistry.76.594.
- [29] A. Quemard, J.C. Sacchettini, A. Dessen, C. Vilcheze, R. Bittman, W.R. Jacobs Jr., J.S. Blanchard, Enzymatic characterization of target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry*, 34 (1995) 8235, 10.1021/bi00026a004.
- [30] L.A. Basso, R. Zheng, J.M. Musser, W.R.Jr. Jacobs, J.S. Blanchard, Mechanisms of

isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates, *J. Infect. Dis.* 178 (1998) 769, 10.1086/515362.

[31] S. Parikh, D.P. Moynihan, G. Xiao, P.J. Tonge, Roles of tyrosine 158 and lysine 165 in the catalytic mechanism of *inhA*, the enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry*, 38 (1999) 13623, 10.1021/bi990529c.

[32] M. Angulo, R.M. Galvfn, M.R. Montoya, J.M.R. Mellado. Reduction of the pyridine ring of niazid and isoniazid on mercury electrodes. Comparison with other NAD⁺ model compounds, *J. Electroanal. Chem.* 348 (1993) 303, 10.1016/0022-0728(93)80139-9.

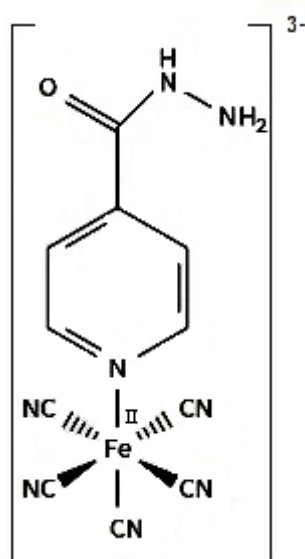
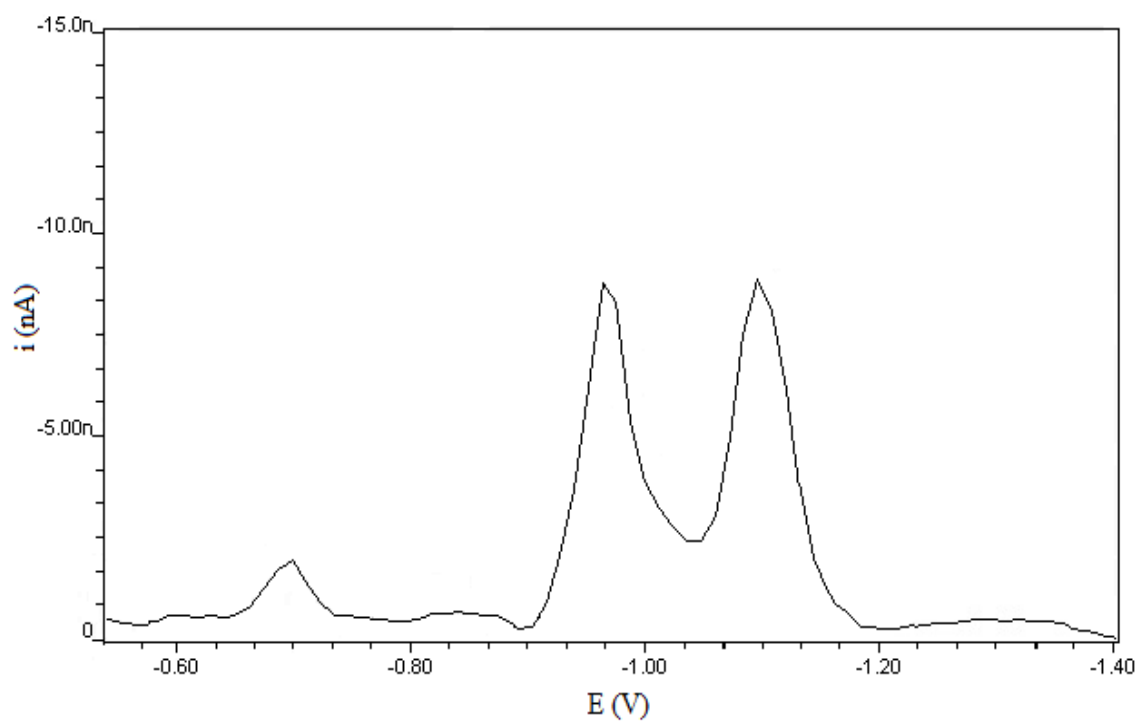
[33] H.M. Carapuça, J.E.J. Simao, A.G. Fogg, Comproportionation and disproportionation reactions in the electrochemical reduction of nitroprusside at a hanging mercury drop electrode in acidic solution, *J. Electroanal. Chem.* 455 (1998) 93, 10.1016/S0022-0728(98)00156-9.

[34] C. Glidewell, I.L. Johnson, Definitive identification of the primary reduction product of the nitroprusside ion, pentacyanonitrosylferrate(2-), in aqueous solution, *Inorg. Chim. Acta*, 132 (1987) 145, 10.1016/S0020-1693(00)81731-4.

[35] E. Mathieu, R. Meunier-Prest, E. Laviron, The reduction mechanism of the >C=O group -111. The electrochemical reduction of isonicotinic acid in an aqueous medium, *Electrochim. Acta*, 42 (1997) 331, 10.1016/0013-4686(96)00189-2.

[36] R. Rodriguez-Amaro, R. Perez, L. Camacho, J.J. Ruiz, Study of the electrochemical reduction of isonicotinic acid at a mercury electrode, *J. Electroanal. Chem.* 324 (1992) 269, 10.1016/0022-0728(92)80051-5.

[37] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 371, 10.1038/nrmicro3028.

Figures legends**Fig. 1.** Chemical structure of IQG-607.**Fig. 2.** Differential pulse voltammogram for 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of IQG-607 in McIlvaine buffer electrolyte (pH 7.5). The analysis was performed under optimized conditions.

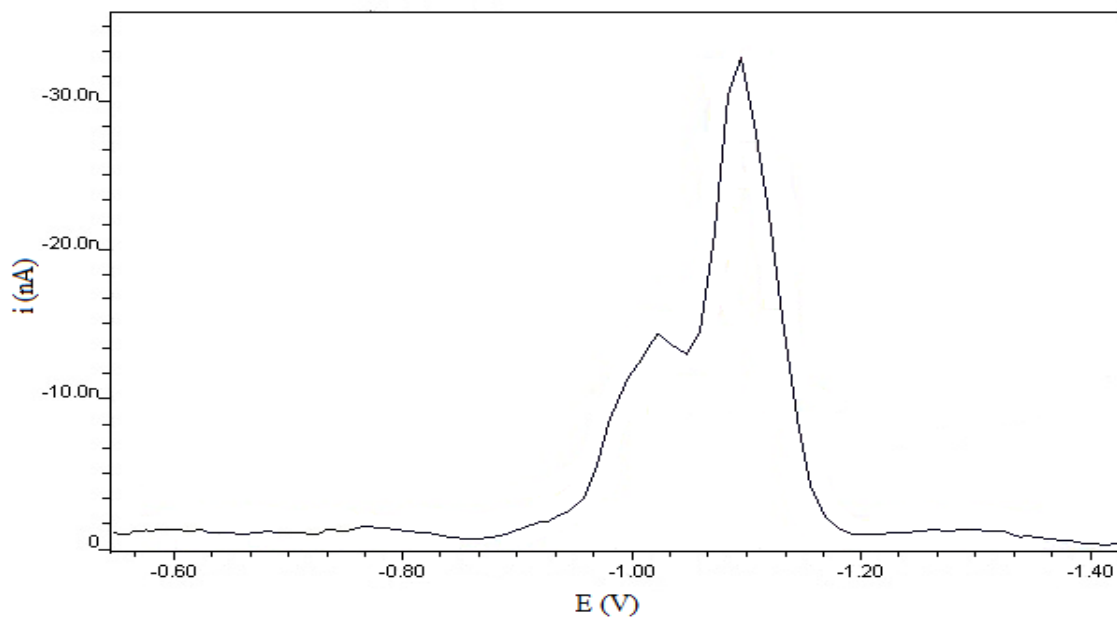


Fig. 3. Differential pulse voltammogram for $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of INH in McIlvaine buffer electrolyte (pH 7.5). The analysis was performed under optimized conditions.

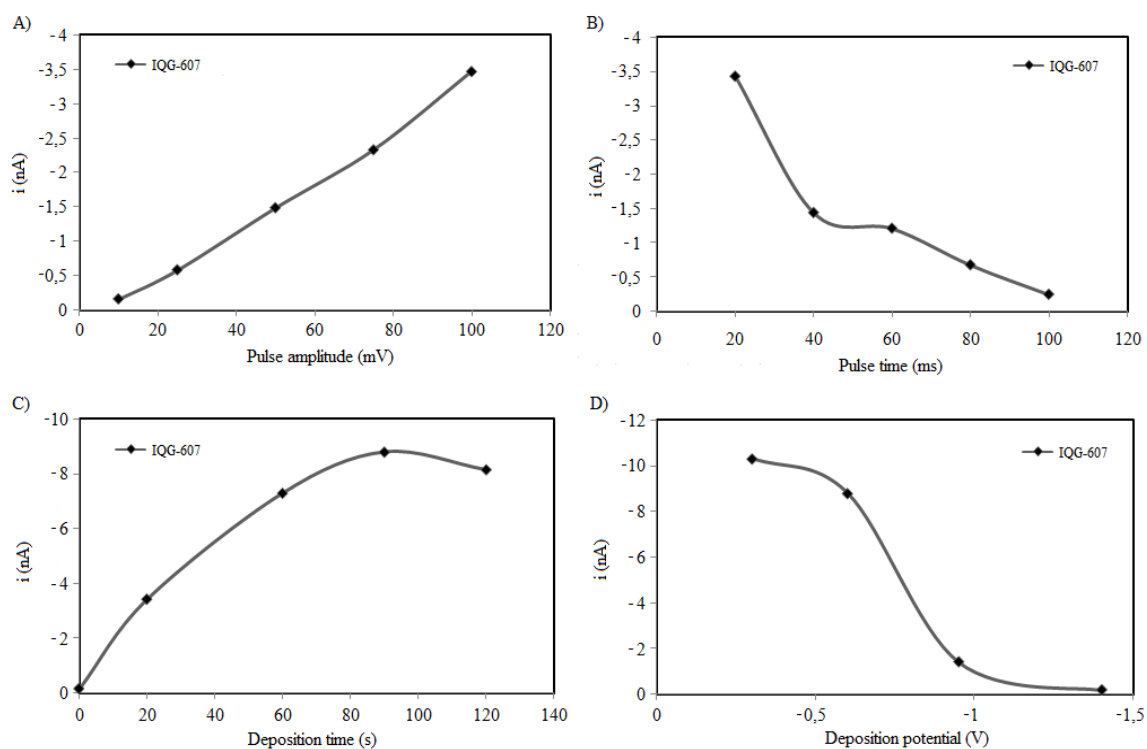


Fig. 4. Effect of different voltammetric parameters on the peak current for $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IQG-607 in McIlvaine buffer electrolyte. (A) Pulse amplitude: 10, 25, 50, 75, and 100 mV. (B) Pulse time: 20, 40, 60, 80, and 100 ms. (C) Deposition time: 0, 20, 60, 90, and 120 s. (D) Deposition potential: -0.3, -0.6, 0.95, and -1.4 V.

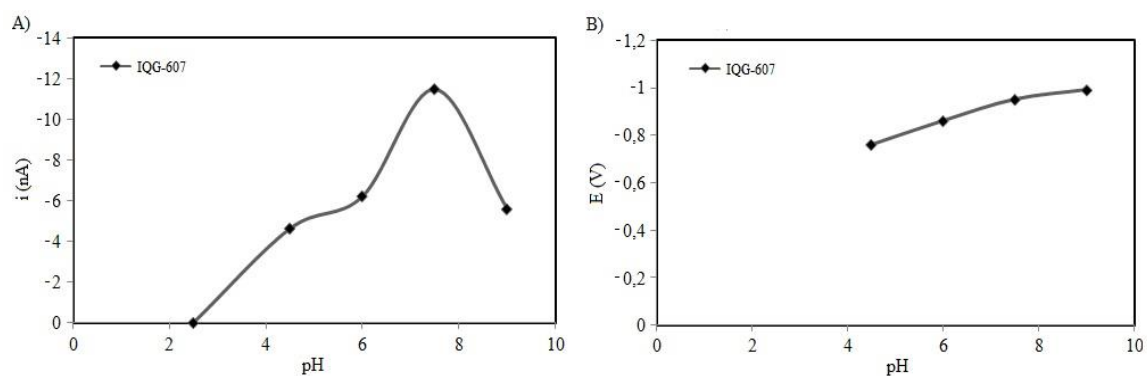


Fig. 5. Effect of different pH values (2.5, 4.5, 6, 7.5, and 9) of the McIlvaine buffer electrolyte on the peak current (A) and peak potential (B) for $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IQG-607. The analysis was performed under optimized voltammetric parameters.

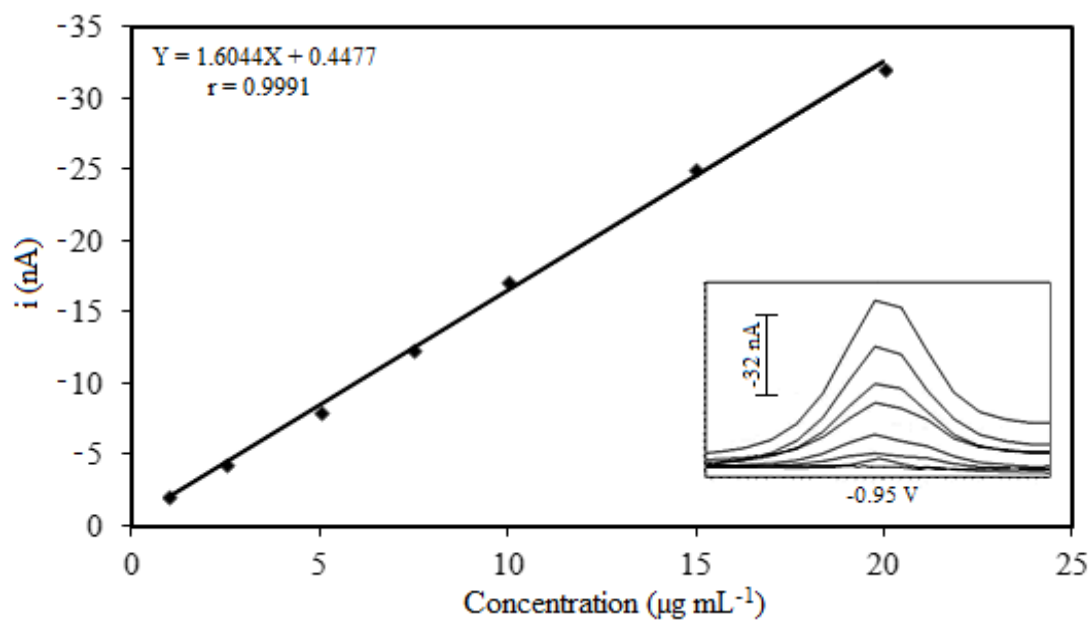


Fig. 6. Linearity of the analytical curve of differential pulse voltammetric determination of IQG-607 in McIlvaine buffer electrolyte. The curve was obtained using the following IQG-607 concentrations: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, and 20 µg mL⁻¹. The analysis was performed under optimized conditions.

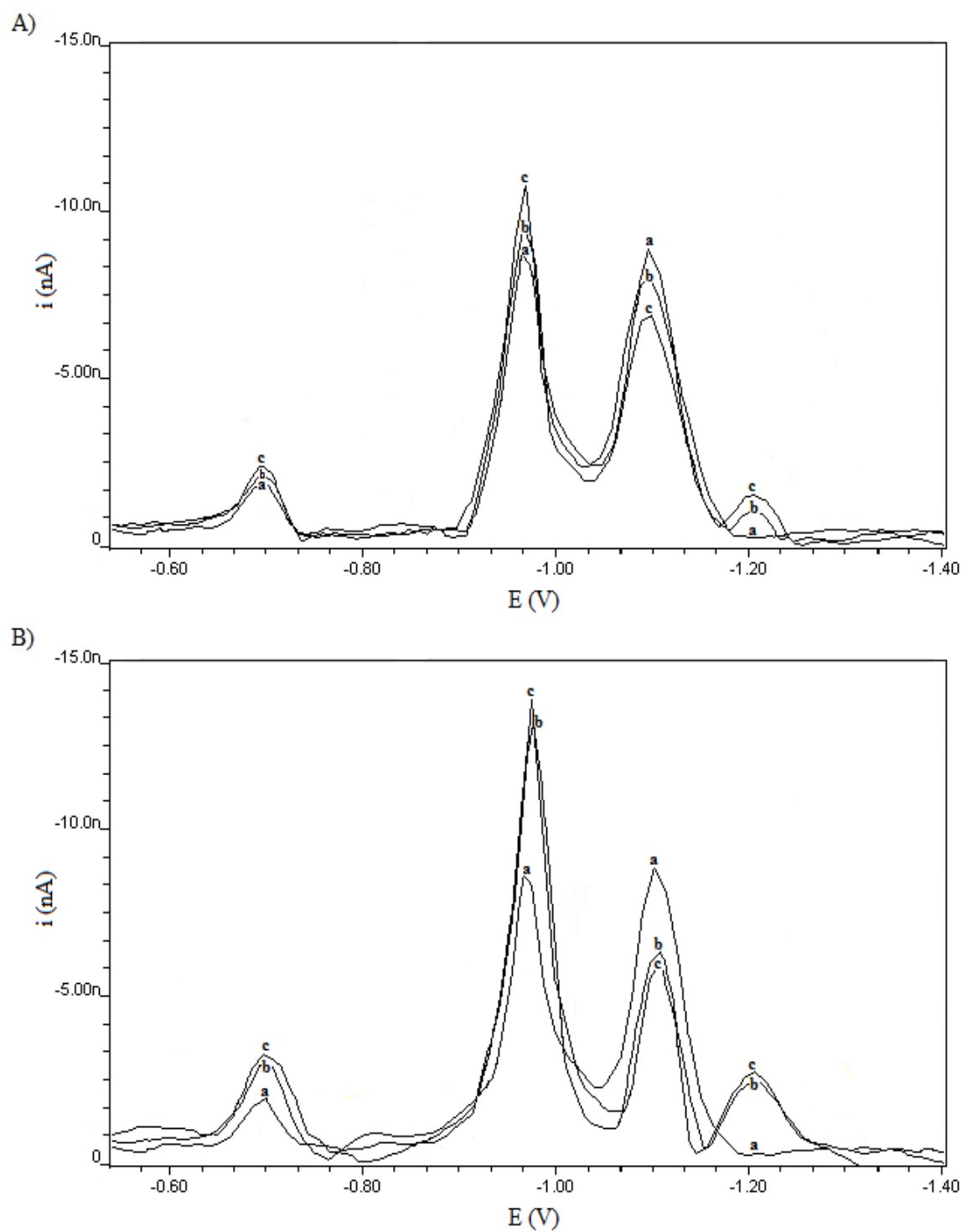


Fig. 7. Differential pulse voltammogram for $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IQG-607 before and after incubation at (A) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and (B) $37 \text{ }^\circ\text{C}$. (a) Freshly prepared solution; (b) after 1 week; (c) after 1 month. The electrolyte was McIlvaine buffer (pH 7.5). The analysis was performed under optimized conditions.

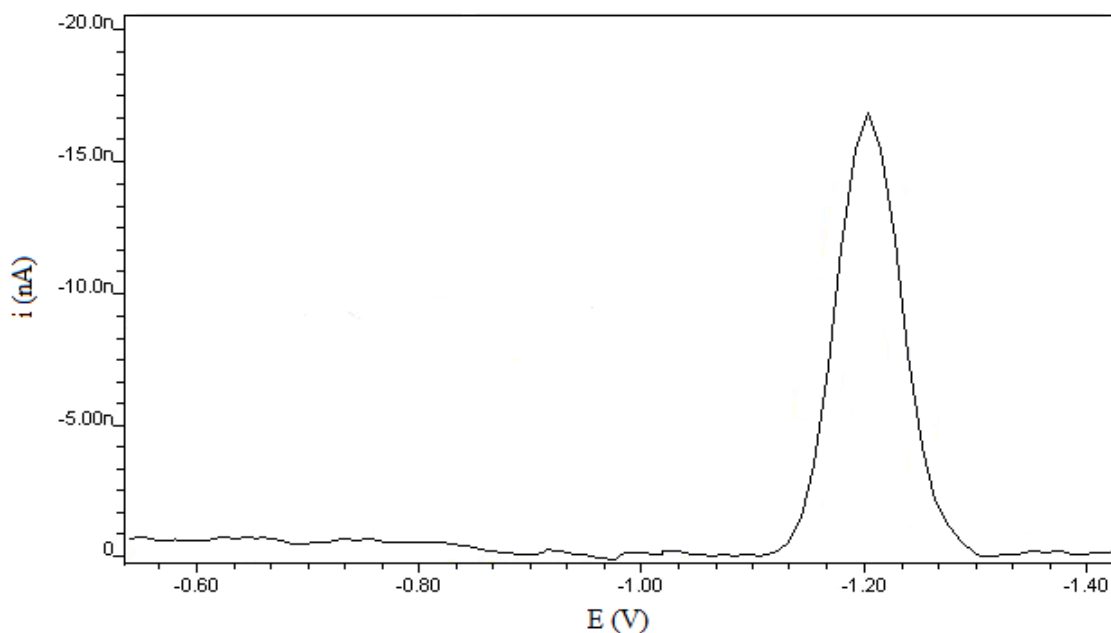


Fig. 8. Differential pulse voltammogram for $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of INA in McIlvaine buffer electrolyte (pH 7.5). The analysis was performed under optimized conditions.

Tables

Table 1. Inhibition parameters of IQG-607 after storage at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ over different periods of days.

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (days)	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
-	Zero	$0.87 (\pm 0.01)$	$0.79 (\pm 0.01)$
4	7	$0.80 (\pm 0.07)$	$0.86 (\pm 0.08)$
4	30	$0.11 (\pm 0.01)$	$6.07 (\pm 0.56)$
37	7	$0.048 (\pm 0.004)$	$14.4 (\pm 1.2)$

CAPÍTULO 3

OUTROS RESULTADOS

5. OUTROS RESULTADOS

5.1. DETECÇÃO DE IQG-607 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Diversas colunas e condições cromatográficas foram utilizadas na tentativa de detecção do composto IQG-607 por CLAE. Dentre as tentativas, descrevemos a seguir o método de análise qualitativo com o qual obtivemos êxito.

5.1.1. Materiais e reagentes

O composto IQG-607 e o seu precursor aminopentacianoferrato(II), foram sintetizados de acordo com Oliveira *et al.*, (2006), no Laboratório de Química, anexo ao CPBMF/INCT-TB da PUCRS. As demais substâncias utilizadas foram: INH $\geq 99\%$ (Acros Organics), acetato de amônio P. A. 97% (Quimex), trietilamina $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), ácido tricloroacético $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), e plasma de camundongos liofilizado (Sigma-Aldrich).

Um equipamento Dionex Ultimate 3000 HPLC, com injetor automático e detector UV, foi utilizado para a análise do IQG-607 por CLAE. A coluna utilizada foi uma Polaris 3 NH₂ 150 x 2.0 mm, 3 μm (Agilent).

5.1.2. Condições cromatográficas, soluções padrão e preparação do plasma

A fase móvel foi constituída de 100 mM de acetato de amônio P. A. 97% (Quimex) em 0,025 % de trietilamina $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), com um fluxo isocrático de 0,5 mL min⁻¹. A escolha do acetato de amônio como fase móvel foi baseada em estudos prévios que analisaram a INH (Almog *et al.*, 2012, Jayaram *et al.*, 2004), sendo que modificamos a sua concentração no presente estudo. Vale ressaltar ainda que a presença da trietilamina, um conhecido modificador de fase móvel, é para diminuir/impedir o efeito dos grupos silanois residuais que prejudicam a análise, que podem estar presentes na coluna cromatográfica (Snyder *et al.*, 1997).

As soluções padrão de IQG-607, e os demais padrões, foram preparadas inicialmente em água Milli-Q na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um branco contendo apenas água

Milli-Q também foi preparado. Logo, 100 μL das soluções foram injetadas na coluna para a análise. A detecção foi realizada em um comprimento de onda (λ) UV de 460 nm. O tempo total de cada análise foi de 8 minutos.

Avaliamos também a possibilidade de análise do IQG-607 em plasma de camundongos. O plasma liofilizado foi reconstituído com 1 mL de água Milli-Q (conforme recomendações do fabricante). Logo, adicionamos 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de IQG-607 em 100 μL do plasma (*spike*), e realizamos a precipitação das proteínas com 25 μL de ácido tricloroacético $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich). A escolha do ácido tricloroacético foi baseada em estudos relatados na literatura (Bhatt *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2010), no entanto, modificamos a concentração utilizada. Assim, a solução foi agitada vigorosamente por 1 minuto, e levada para a centrífuga, onde ficou durante 15 minutos a 13000 rpm a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e um volume proporcional de água Milli-Q adicionado. Um branco do plasma tratado nas mesmas condições também foi analisado. Ainda, realizamos um *spike* em água Milli-Q (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e realizamos o mesmo tratamento do plasma, observando se haveria mudança do tempo de retenção (T_R) do IQG-607. Por fim, as soluções foram injetadas para a análise seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente.

5.1.3. Análise do composto

A Figura 7 A e B mostra a análise do branco e da solução contendo o IQG-607 na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água Milli-Q. No branco, nenhum pico foi encontrado (**Figura 7 A**), e um pico bem definido de IQG-607 foi observado com T_R de 3.4 minutos (**Figura 7 B**), mostrando que houve interação do composto com a coluna utilizada (coluna recomendada para análise de compostos altamente polares, segundo o fabricante). É possível observar a presença de 2 picos interferentes que serão melhor investigados, e se possível, eliminados em posteriores otimizações. A identificação referente ao pico do IQG-607 apresentou um espectro de absorção no UV característico, conforme a Figura 8. Estes dados prévios demonstram a possibilidade de detecção do composto por CLAE nas condições descritas no presente trabalho.

Figura 7. Cromatogramas referentes às análises do (A) branco e do (B) IQG-607 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água Milli-Q ($T_R = 3.4 \text{ min}$). Coluna: Polaris 3 NH_2 $150 \times 2.0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo $0,025 \%$ de trietilamina ($\text{pH}:8.0$), em um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$. Detecção: 460 nm

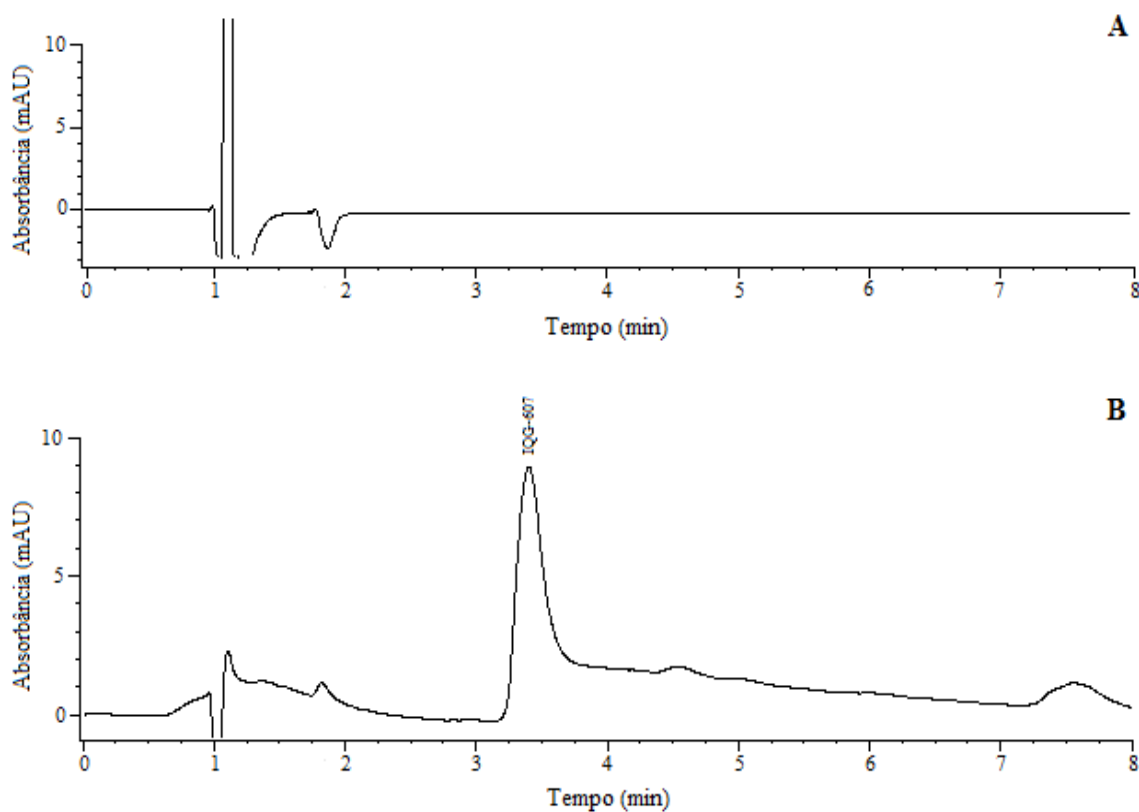
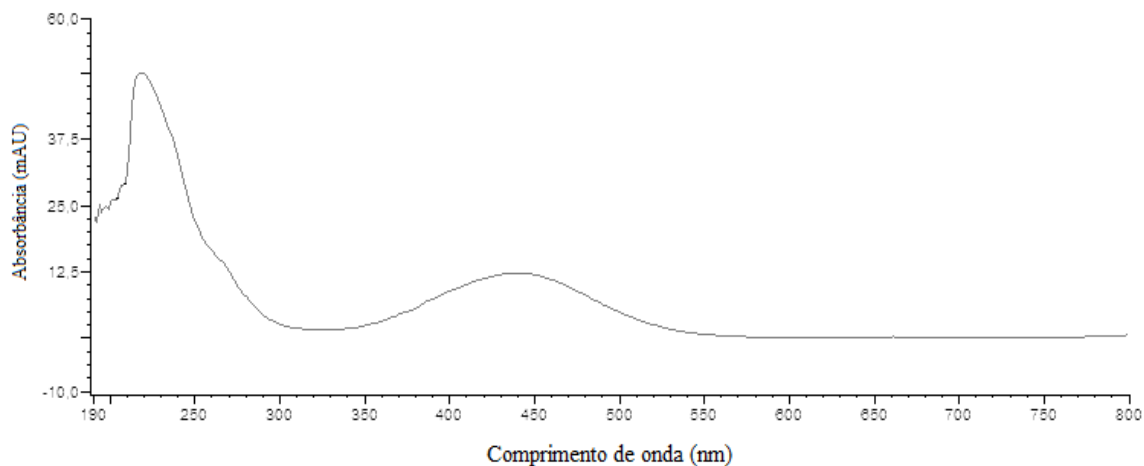


Figura 8. Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do IQG-607



Para observarmos a possibilidade de diferenciação do IQG-607 de seu precursor (aminpentacianoferrato(II)), e de seu análogo (INH), analisamos os padrões destas substâncias em água Milli-Q. As Figuras 9 A e B mostra a análise do aminpentacianoferrato(II) e da INH, respectivamente, sob as mesmas condições do IQG-607. O T_R do aminpentacianoferrato(II) foi de 2.6 minutos (**Figura 9 A**), já a INH não apresentou pico cromatográfico por este método (**Figura 9 B**). A Figura 10 mostra que o espectro de absorção no UV do aminpentacianoferrato(II) é diferente do apresentado pelo IQG-607, além de ser menos intenso na mesma concentração analisada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados confirmam que o pico encontrado na análise do IQG-607 em 3.4 minutos refere-se ao composto na sua forma intacta, além de mostrar que é possível diferenciá-lo de seu precursor, e de seu análogo.

Figura 9. Cromatogramas referentes às análises do (A) aminpentacianoferrato(II) ($T_R = 2.6$ min) e da (B) INH, nas concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em água Milli-Q. Coluna: Polaris 3 NH_2 150×2.0 mm, $3 \mu\text{m}$. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo 0.025 % de trietilamina (pH:8.0), em um fluxo de 0.5 mL min^{-1} . Volume injetado: $100 \mu\text{L}$. Detecção: 460 nm

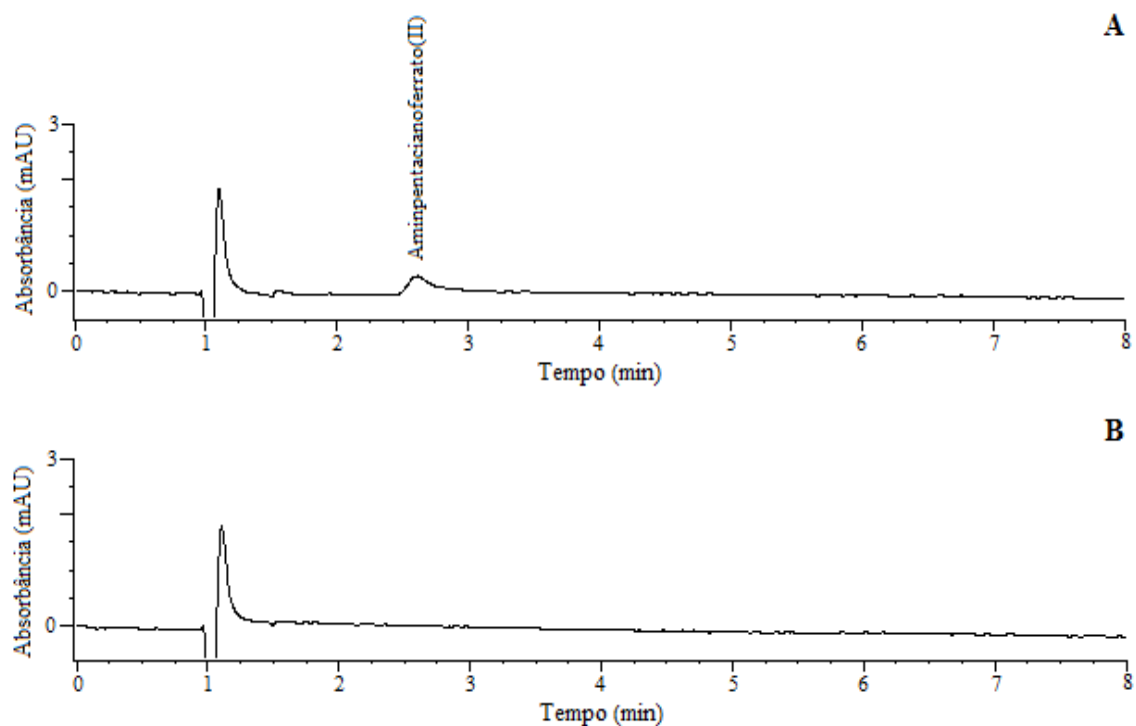
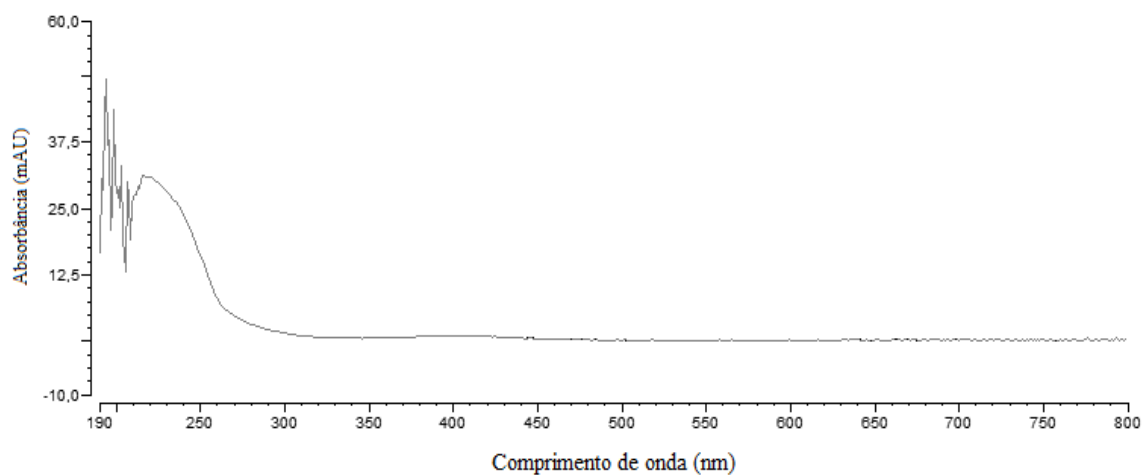
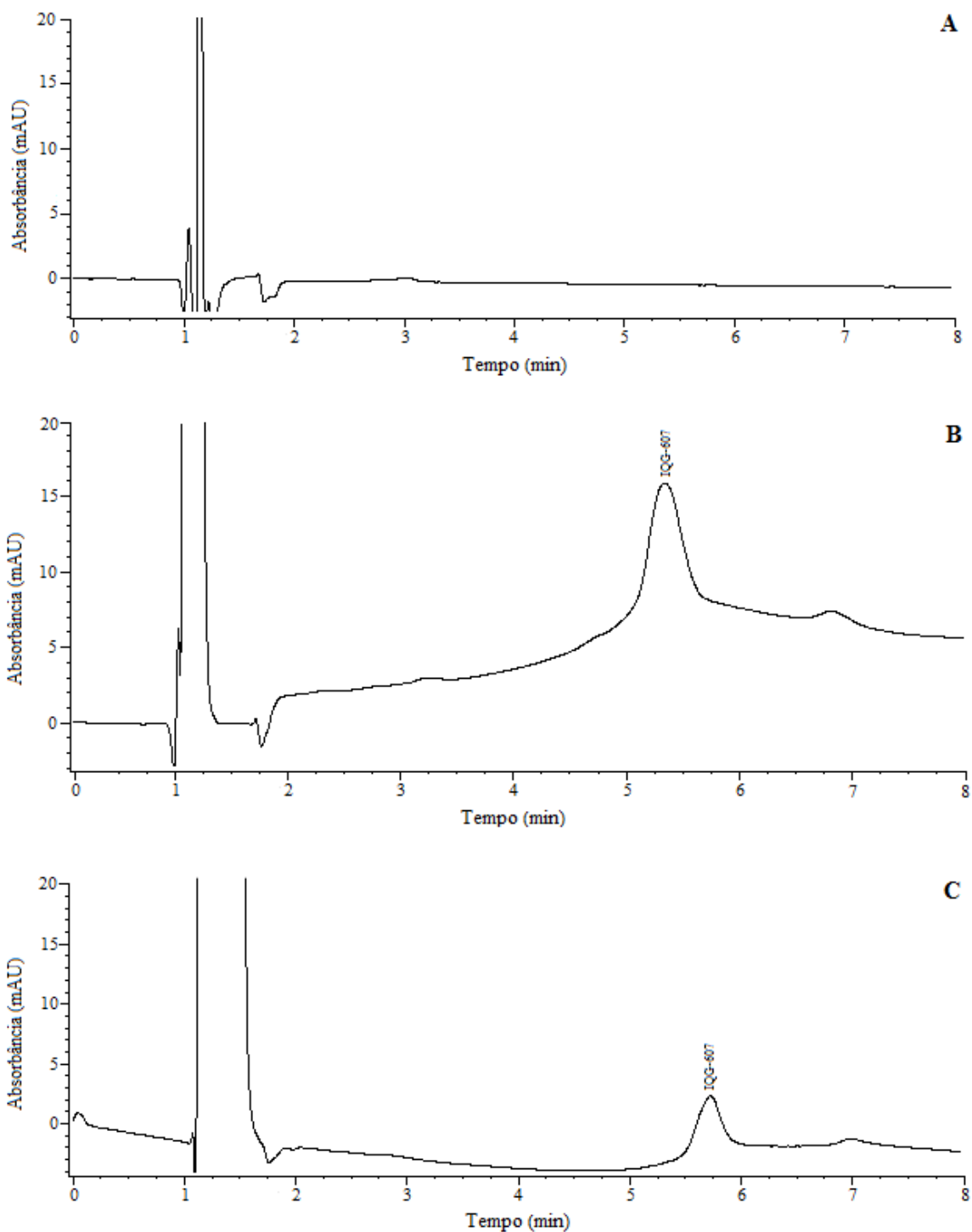


Figura 10. Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do aminpentacianoferrato(II)



Na análise do plasma branco não apareceu pico interferente na região do IQG-607 (**Figura 11 A**). Na análise do plasma com *spike* de IQG-607, o pico apareceu em 5.4 minutos (**Figura 11 B**), sendo um T_R diferente do encontrado quando o composto é analisado em água Milli-Q (**Figura 7 B**). Além disso, a linha de base aumentou significativamente, podendo ser devido a eluição da fase móvel juntamente com o plasma tratado, fato que merece mais investigações. A mudança no T_R pode estar relacionada com a presença do ácido tricloroacético utilizado durante a precipitação das proteínas no plasma, que pode modificar a interação do composto com a coluna cromatográfica. A possibilidade de modificação de perfil cromatográfico causado pela presença do ácido tricloroacético é reportada na literatura (Cheng *et al.*, 2010), sendo o que ocorreu na presente análise. Este fato foi confirmado quando adicionamos o ácido tricloroacético em uma solução de água Milli-Q contendo o IQG-607, repetimos todas as etapas que foram realizadas com o plasma, e realizamos a análise (**Figura 11 C**). Feito isto, o pico do IQG-607 apareceu em 5.8 minutos. Os espectros de absorção encontrados nas análises do IQG-607 no plasma de camundongos e em água em Milli-Q, ambos contendo ácido tricloroacético, apresentaram o mesmo espectro no UV mostrado na Figura 8. Claramente, observamos que pequenas variações nas condições cromatográficas tiveram efeito no T_R . Assim, o pico do IQG-607 na presença de ácido tricloroacético ficou definido como sendo entre 5 e 6 minutos. A otimização do método deverá ser realizada de forma a obtermos um T_R mais exato possível, e estabilidade na linha de base do cromatograma.

Figura 11. Cromatogramas referentes às análises do (A) plasma branco, do (B) IQG-607 em plasma ($T_R = 5,4$ min), e do (C) IQG-607 em água Milli-Q contendo ácido tricloroacético ($T_R = 5,8$ min). A concentração de IQG-607 utilizada no *spike* foi de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna: Polaris 3 NH_2 $150 \times 2,0$ mm, $3 \mu\text{m}$. Fase móvel: 100 mM de acetato de amônio contendo 0,025 % de trietilamina (pH:8,0), em um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$. Detecção: 460 nm



Os dados obtidos até o momento geram perspectivas de otimizar e validar o método cromatográfico proposto, a fim de utilizá-lo, futuramente, em estudos de farmacocinética, avaliando os possíveis metabólitos que poderão ser encontrados no plasma sanguíneo de camundongos após administração do composto líder IQG-607.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método voltamétrico mostrou o perfil eletroquímico do composto IQG-607, demonstrando que a molécula é eletroativa, o que tornou possível a sua detecção. A quantificação do composto foi realizada com uma linearidade adequada, e ainda, demonstrou-se a possibilidade de investigar a estabilidade do IQG-607 pelo método proposto. Avaliamos, então, a estabilidade do composto utilizando este método, frente a duas condições de temperatura, concomitante com ensaios de inibição enzimática. Demonstramos aqui, que o IQG-607 é estável em solução quando mantido durante pelo menos 1 semana em geladeira a temperatura de 4 °C. Este é um resultado importante sobre as condições de estocagem de soluções que serão preparadas nas análises futuras. O presente método é rápido e custo-efetivo, podendo ser mais explorado na determinação do IQG-607, e auxiliar em diversos estudos futuros.

Cabe ressaltar que há aproximadamente 10 anos pesquisadores brasileiros vêm dedicando-se ao estudo do composto IQG-607, em particular. Até então, nenhum método se mostrou aplicável à detecção de tal molécula. Assim, a detecção do IQG-607, utilizando CLAE, obtida neste estudo, é um achado importante, tendo em vista as dificuldades que o grupo de pesquisa envolvido no seu estudo estava enfrentando e as necessidades de detectar o IQG-607 para análises avançadas nas etapas de desenvolvimento de novos fármacos. Estes resultados geram perspectivas de realizar a validação do método para a quantificação do composto em plasma de camundongos, e posteriormente de outros animais, avançando, sobremaneira, nos estudos pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos são etapas fundamentais antes que novas moléculas candidatas avancem para a fase de estudos clínicos em humanos. Por ser um método convencional e bastante utilizado, a metodologia usando CLAE será otimizada e validada para a sua aplicação em estudos de farmacocinética e avaliação dos metabólitos que poderão ser gerados *in vivo*.

Este trabalho descreve pela primeira vez dois métodos analíticos para a detecção do composto IQG-607. Levando em consideração a necessidade de alguns estudos pré-clínicos e clínicos nos quais a detecção e quantificação deste composto (após a administração) será necessária, estes dois métodos serão fundamentais. Por fim, cabe mencionar que estamos nos dedicando, atualmente, na otimização e validação da metodologia utilizando CLAE, por ser um método convencional, e que parece uma

ferramenta com potencial para a análise do IQG-607 no plasma de camundongos. Esperamos que a metodologia otimizada possa servir para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos do composto líder IQG-607, e que este possa, futuramente, ser utilizado no tratamento farmacológico da tuberculose humana.

REFERÊNCIAS

ALMOG, T. K. *et al.* Isoniazid Metabolism Monitoring in Libyan patients using HPLC Method. **J Chem Pharm Res**, v. 4, n. 4, p. 2204-08, Apr 2012.

AOUAM, K. *et al.* Adverse effects of antitubercular drugs: epidemiology, mechanisms, and patient management. **Med Mal Infect**, v. 37, n. 5, p. 253-61, May 2007.

ASADPOUR-ZEYNALI, K.; SOHEILI-AZAD, P. Simultaneous polarographic determination of isoniazid and rifampicin by differential pulse polarography method and support vector regression. **Electrochim Acta**, v. 55, n. 22, p. 6570-76, Jun 2010.

BANERJEE, A. *et al.* inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227-30, Jan 1994.

BASSO, L. A.; BLANCHARD, J. S. Resistance to antitubercular drugs. **Adv Exp Med Biol**, v. 456, p. 115-44, 1998.

BASSO, L. A. *et al.* An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis. **J Braz Chem Soc**, v. 21, n. 7, p. 1384-89, Mar 2010.

BASU, B. J.; PADMA, D. K.; RAJAGOPALAN, S. R. Differential pulse polarographic determination of trace levels of iron(III) by using the catalytic current. **Fresen J Anal Chem**, v. 349, n. 6, p. 477-78, Jun 1994.

BHANDARI, R.; KAUR, I. P. A sensitive hplc method for determination of isoniazid in rat plasma, brain, liver and kidney. **J Chromatogr Sep Tech**, v. 3, n. 3, p. 1-5, Jun 2012.

BHATT, N. B. *et al.* Pharmacokinetics of rifampin and isoniazid in tuberculosis-HIV-coinfected patients receiving nevirapine- or efavirenz-based antiretroviral treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 6, p. 3182-90, Jun 2014.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. **Annu Rev Biochem**, v. 65, n. 11, p. 215-39, Nov 1996.

BOOGAARD, J. *et al.* New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 849-62, Mar 2009.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica. Princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471 p.

BURRILL *et al.* Tuberculosis: a radiologic review. **Radiographics**, v. 27, n. 5, p. 1255-73, Sep-Oct 2010.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Current medical treatment for tuberculosis. **BMJ**, v. 325, n. 7375, p. 1282-86, Nov 2002.

CHENG, C. *et al.* The application of trichloroacetic acid as an ion pairing reagent in lc–ms–ms method development for highly polar aminoglycoside compounds. **Chromatographia**, v. 72, n. 1/2, p. 133-39, May 2010.

DAVIES, D. M.; FERNER, R. E.; GLANVILE, H. **Textbook of adverse drug reactions**. 5. ed. London: Chapman & Hall Medical, 1998. 971 p.

DUCATI, R. G. *et al.* The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7375, p. 697-714, Nov 2006.

DUNCAN, K. Progress in TB drug development and what is still needed. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 201-7, Feb 2003.

ELLARD, G. A. *et al.* The determination of isoniazid and its metabolites acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinylglycine in serum and urine. **Biochem J**, v. 126, n. 3, p. 449-58, Feb 1972.

FANG, P. *et al.* Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 878, n. 24, p. 2286-91, Aug 2010.

GHONEIM, M. M.; EL-BARADIE, K. Y; TAWFIK, A. Electrochemical behavior of the antituberculosis drug isoniazid and its square-wave adsorptive stripping voltammetric estimation in bulk form, tablets and biological fluids at a mercury electrode. **J Pharmaceut Biomed**, v. 33, n. 4, p. 673-85, May 2003.

GOMEZ, J. E.; MCKINNEY, J. D. M. Tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 84, n. 1-2, p. 29-44, Jul 2004.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 3, p. 226-36, Mar 2004.

GROULX, A. Introduction to pharmacokinetics. **Scian News**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2006.

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. **Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds**. Chichester: Wiley-Interscience, 2005. 292 p.

HENZE, G. **Polarographie und voltammetrie: grundlagen und analytische praxis**. Berlin, Helderberg, and New York: Springer-Verlag, 2001. 263 p.

HEYROVSKY, J. **Principles of Polarography**. New York: Academic Press, 1966. 581 p.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. **Med Res Rev**, v. 21, n. 5, p. 382-96, Sep 2001.

JAYARAM, R. *et al.* Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 2951-57, Aug 2004.

KOUL, A. *et al.* The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n.

7331, p. 483-90, Jan 2011.

KOUNAVES, S. P. Voltammetric techniques. In: SETTLE, F. A. (Ed.). **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997. p. 709-725.

LEANDRO, K. C. *et al.* Development and validation of an electroanalytical methodology for determination of isoniazid and rifampicin content in pharmaceutical formulations. **Braz J Pharm Sci**, v. 45, n. 2, p. 331-37, Apr-Jun 2009.

MA, Z. *et al.* Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100-9, Jun 2010.

MAHAPATRA, S. *et al.* A novel metabolite of antituberculosis therapy demonstrates host activation of isoniazid and formation of the isoniazid-nad⁺ adduct. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 28-35, Jan 2012.

METUSHI, I. G. *et al.* A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. **Clin Pharmacol Ther**, v. 89, n. 6, p. 911-14, Jun 2011.

MEYER, A.; ZANGER, M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. **Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, n. 1, p. 269-96, Apr 1997.

OLIVEIRA, G. P. *et al.* Tuberculosis in Brazil: last ten years analysis - 2001-2010. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 218-33, 2013 Mar-Apr 2013.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 19, p. 2409-24, Feb 2006.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium*

tuberculosis. **Chem Commun (Camb)**, v. 7, n. 3, p. 312-3, Feb 2004.

PIRZAD, R. *et al.* Differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of sodium nitroprusside at a hanging mercury drop electrode aided by copper(II) and poly-L-lysine modification. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 963-69, Jan 1994.

PREZIOSI, P. Isoniazid: metabolic aspects and toxicological correlates. **Curr Drug Metab**, v. 8, n. 8, p. 839-51, Dec 2007.

RIVERS, E. C.; MANCERA, R. L. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 23-24, p. 1090-1098, Dec 2008.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. E. A. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40, n. 2, p. 182-85, Aug 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. **Int J Antimicrob Agents**, v. 43, n. 1, p. 82-5, Jan 2014.

ROZWARSKI, D. A. *et al.* Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, n. 5347, p. 98-102, Jan 1998.

RUIZ-GARCIA, A. *et al.* Pharmacokinetics in drug discovery. **J Pharma Sci**, v. 97, n. 8, p. 654-90, Mar 2007.

SCHROEDER, E. K. *et al.* Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Pharm Biotechno**, v. 3, n. 3, p. 197-225, Sep 2002.

SMITH, P. J.; DYK, J. v.; FREDERICKS, A. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 3, n. 11, p. 325-28, Nov 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: Wiley-Blackwell, 1997. 800 p.

SOUSA, E. H. *et al.* $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]^{3-}$: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **J Inorg Biochem**, v. 140, n. 10, p. 236-44, Nov 2014.

SOUSA, E. H. *et al.* Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. **J Biol Inorg Chem**, v. 17, n. 2, p. 275-83, Feb 2012.

SOUSA, E. H. S. *et al.* Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the *in vitro* activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 2, p. 368-75, Feb 2005.

THOMAS, F. G.; HENZE, G. **Introduction to voltammetric analysis: theory and practice**. 1. ed. Melbourne: CSIRO Publishing, 2001. 264 p.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharm Methods**, v. 1, n. 1, p. 25-38, Oct 2010.

TOMA, H. E.; CREUTZ, C. Pentacyanoferrate(II) Complexes: Evaluation of Their Formal Potentials and Mechanism of Their Quenching of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Luminescence. **Inorg Chem**, v. 16, n. 3, p. 545-50, Aug 1977.

VASCONCELOS, I. *et al.* The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. **Anti-Infect Agents Med Chem**, v. 7, n. 1, p. 50-62, Dec 2008.

VILCHÈZE, C. *et al.* Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 14, p. 4059-67, Jul 2000.

WANG, A. *et al.* HPLC–MS analysis of isoniazid in dog plasma. **Chromatographia**, v. 66, n. 9/10, p. 741-45, Nov 2007.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3. ed. Hoboken: Wiley-VCH, 2006. 272 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2011. Global Tuberculosis Control. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 Jun 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2013. Global Tuberculosis Report. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 Jun 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2014. Global Tuberculosis Report. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 Jun 2015.

YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 7, p. 520-8, July 2008.

ZHOU, Z. *et al.* Simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide, rifampicin and acetylisoniazid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Anal Sci**, v. 26, n. 11, p. 1133-8, Nov 2010.

Anexo A

Comprovante de submissão do artigo científico a publicação no periódico *Electrochimica Acta* (Fator de Impacto 4.504).

* Your recent submission to ELECTACTA

Electrochimica Acta
Para adliosd@yahoo.com.br

Dear Dr. Adilio Dadda,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: *Electrochimica Acta*
Corresponding Author: Luiz Basso
Co-Authors: Adilio S Dadda, MSc; Valnes S Rodrigues-Junior, PhD; Mariane Rotta, MSc; Leonardo K Martinelli, PhD; Maria M Campos, PhD; Eduardo H Sousa, PhD; Antonio F Pinto, PhD; Pablo Machado, PhD; Diogenes S Santos, PhD
Title: Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at luiz.basso@puccs.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/electacta/l.asp?i=502978&l=FCDH44AU>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Electrochimica Acta