



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Roselene Kroth

**LIBERAÇÃO TRANSBUCCAL DA ISONIAZIDA E DE SEUS COMPLEXOS
METÁLICOS: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *EX VIVO* E INTERAÇÃO
COM PROMOTORES DE ABSORÇÃO**

Florianópolis

2020

Roselene Kroth

LIBERAÇÃO TRANSBUCAL DA ISONIAZIDA E DE SEUS COMPLEXOS
METÁLICOS: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *EX VIVO* E INTERAÇÃO COM
PROMOTORES DE ABSORÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof. Dr. Thiago Caon

Florianópolis

2020

Kroth, Roselene

Liberação transbucal da isoniazida e de seus complexos metálicos: avaliação da permeabilidade *ex vivo* e interação com promotores de absorção / Roselene Kroth; orientador, Thiago Caon, 2020.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Isoniazida. 3. Complexos metálicos. 4. Liberação transbucal. 5. Promotores de permeabilidade. I. Caon, Thiago. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Roselene Kroth

LIBERAÇÃO TRANSBUCCAL DA ISONIAZIDA E DE SEUS COMPLEXOS
METÁLICOS: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *EX VIVO* E INTERAÇÃO COM
PROMOTORES DE ABSORÇÃO

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Adriana Passarella Gerola
Membro Externo - UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Lilian Sibelle Campos Bernardes
Membro Interno - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Profa. Dra. Elenara Lemos-Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Prof. Dr. Thiago Caon
Orientador

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que, direta ou indiretamente, me apoiaram durante este período. Um agradecimento especial à minha irmã, Roseli, por se preocupar com meu bem-estar e pelas boas vibrações. Também, à minha mãe, já desencarnada, que sempre incentivou seus filhos a estudarem, pois via na educação uma forma de transformar e melhorar o nosso futuro.

Ao meu orientador, Thiago, pela sua determinação, persistência, vontade de investigar e crescer, que sempre nos inspirou! Obrigada por me receber no laboratório, me incentivar, compreender minhas dificuldades e por compartilhar seus conhecimentos!

À querida Débora, um espírito amável, que nos ajudou com seus conhecimentos, doçura e paciência. Além disso, pelas prazerosas conversas sobre os assuntos da vida! Este trabalho não seria o mesmo sem você!

À minha colega Beatriz Amaral, que me ajudou muito nos experimentos, na estatística, programas de computador, gráficos e tantos outros conhecimentos e habilidades que compartilhou durante todo este período.

Aos demais colegas do nosso grupo de pesquisa, Elisa e Matheus, que sempre estiveram dispostos a auxiliar nos trabalhos do laboratório e em especial à Julia Conte, pela organização e parceria nos experimentos.

Ao Doutorando Marcio Cristiano Monteiro e Prof. Bruno Szpoganicz, pela parceria na síntese e caracterização dos complexos metálicos utilizados neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica, pelos momentos prazerosos, regados de café e chimarrão. Em especial à Sandra, Mariana, Carine, Daiane, Aline, Edna e Marina, pela companhia e conversas no almoço, por me ajudarem com os equipamentos, matérias-primas, idéias, conselhos, por me ouvirem nos momentos difíceis e por deixarem o ambiente de trabalho alegre e acolhedor.

À Professora Angela Campos, por nos disponibilizar materiais, equipamentos, utensílios e por sempre estar disposta a compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço também às outras pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho e que não foram aqui mencionadas.

Agradeço ao CNPq (Chamada Universal nº01/2016 Processo 408229/2016-0) por todo o suporte financeiro para a realização deste projeto.

RESUMO

Ainda que a isoniazida (INH) seja altamente efetiva no tratamento da tuberculose, eventos de hepatotoxicidade são frequentemente observados após sua administração oral. Assim, neste estudo, investigou-se sua administração transbucal a fim de evitar a metabolização de primeira passagem. Além de ser altamente vascularizada, a mucosa bucal pode ser acometida pelo *M. tuberculosis* e ainda não há opções terapêuticas direcionadas para um efeito local no mercado. Assim, avaliou-se a permeabilidade transbucal da INH isolada e em combinação com 35mM de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 mM de taurocolato de sódio (ST) e 0,5% de quitosana (CS). Análises de espalhamento de luz dinâmico, espectrofotometria na região do UV-Vis e análises de potencial zeta foram utilizadas para investigar interações químicas entre fármaco e promotores de permeabilidade. Embora a quitosana e ST não tenham sido efetivos como promotores de absorção, o SDS aumentou o fluxo de permeabilidade da INH em cerca de 11 vezes. A presença da INH não afetou o potencial zeta micelar para ambos os tensoativos testados. Análises espectrofotométricas, por sua vez, demonstraram não haver interação entre ST e INH, diferentemente do comportamento com SDS. Interações com a INH e SDS foram relevadas para ambos os valores de pH (2 e 6,8), um efeito que pareceu ser dependente da concentração de SDS. Apesar da interação química entre a INH e o SDS, isso não impediu que o SDS exercesse seu efeito como promotor de absorção. Outro problema atrelado a esquemas terapêuticos com INH refere-se a questão da resistência microbiana. A enzima catalase-peroxidase (*KatG*) desempenha um papel fundamental na ativação da INH e mutações no gene que a codifica resultam na perda da atividade deste fármaco. Assim, complexos metálicos (derivados do pentacianoferrato-PCF-INH e azul da Prússia-PB-INH) foram preparados para contornar este problema, já que são ativados independentemente da função enzimática. A baixa biodisponibilidade oral do PCF-INH justifica o uso de rotas alternativas. Em testes avaliando a permeabilidade bucal destes complexos, o complexo PB-INH apresetou maior taxa de transporte, o que pode estar relacionado com uma maior taxa de dissociação que o PCF-INH e a presença de defeitos estruturais (evidenciado pelo método de Job). De forma geral, a rota bucal se mostrou promissora tanto para a administração de INH quanto seus complexos metálicos e estudos de formulação poderiam ser iniciados, com ensaios subsequentes de biodisponibilidade *in vivo*.

Palavras-chave: liberação transbucal; isoniazida; complexos metálicos; pentacianoferrato; promotores de permeabilidade; tensoativos.

ABSTRACT

Although the isoniazid (INH) is highly effective in the treatment of tuberculosis, hepatotoxicity events are frequently observed as a result of its oral administration. Therefore, its transbuccal administration was investigated to avoid first-pass metabolism. In addition to the buccal mucosa being highly vascularized, it may also be affected by *M. tuberculosis* and no therapeutic options aimed at a local effect may be found on the market until now. In this context, the transbuccal permeability of free INH and combined with 35 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM sodium taurocholate (ST) and 0.5% chitosan (CS) was evaluated. Dynamic light scattering, UV-Vis spectrophotometry and zeta potential analyses were used to investigate chemical interactions between the drug and absorption chemical enhancers (ACE). Chitosan and ST did not show to be effective as ACE; however, SDS increased the permeability flux of INH in approximately 11 times. The presence of INH did not affect the micellar zeta potential for both tested surfactants. On the other hand, a chemical interaction between SDS and INH was observed in spectrophotometric analyses (unlike the behavior with ST). INH-SDS interactions were found in both tested pH values (2 and 6.8) in a concentration-dependent manner. Although INH and SDS interact chemically, this fact does not prevent SDS from acting as an ACE. Another problem associated with INH-based therapeutic regimens refers to the microbial resistance. The catalase-peroxidase enzyme (KatG) plays a key role in the activation of INH and mutations in genes that encodes this protein result in loss of drug activity. Thus, metallic complexes (derivatives of pentacyanodoferrate-PCF-INH and Prussian blue-PB-INH) were prepared to overcome this problem, since they are activated independently of the enzymatic activity. The low oral bioavailability of PCF-INH justifies the use of alternative administration routes. In buccal permeability studies, the complex PB-INH presented higher transport rates, which may be associated with a higher dissociation rate than PCF-INH and the presence of structure defects (evidenced by the Job's method). In general, the buccal route showed to be promising for the delivery of INH and metallic complexes and formulation studies should be developed with subsequent bioavailability assays.

Keywords: transbuccal delivery; isoniazid; metal complexes; pentacyanodoferrate; absorption chemical enhancers; surfactants.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estimativa da taxa de incidência de TB no mundo, 2018.....	18
Figura 2. Estrutura química da isoniazida e de suas formas ionizadas conforme o pKa	21
Figura 3. Mecanismo de ativação enzimática da INH.....	22
Figura 4. Anatomia da mucosa oral.....	26
Figura 5. Rotas de transporte de moléculas através da mucosa bucal.....	28
Figura 6. Câmara de difusão de Franz.....	29
Figura 7. Estrutura química do dodecil sulfato de sódio.....	31
Figura 8. Esquema do intumescimento e dissolução devido à formação de agregados semelhantes a micelas em proteínas.	33
Figura 9. Estrutura química do taurocolato de sódio.....	34
Figura 10. Comparação da estrutura de micelas primárias e secundárias de sais biliares e micelas de tensoativos clássicos.	35
Figura 11. Estrutura química da quitosana	36
Figura 12. Estrutura química do pentacianoferrato de isoniazida (IQG-607).....	37
Figura 13. Estrutura do azul da Prússia (a) insolúvel e (b) solúvel.....	40
Figura 14. Estruturas do azul da Prússia (esquerda) e do derivado do azul da Prússia complexado com isoniazida (direita).....	42

CAPÍTULO I

Figure 1. Chemical structures of the isoniazid and surfactants used in this study.	58
Figure 2. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL ⁻¹) isolated (o) and treated with 35 mM SDS (●) through porcine buccal mucosa. Data are presented as mean ± standard deviation (n = 6).	61
Figure 3. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL ⁻¹) isolated (●) and treated with 10 mM ST (o) through the porcine buccal mucosa. Data are presented as mean ± standard deviation (n = 6).	62
Figure 4. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL ⁻¹) isolated (o) and treated with 0.5% (▼) CS through the porcine mucosa. Data are presented as mean ± standard deviation.....	63
Figure 5. INH retained in porcine buccal mucosa after 10h. Values are represented as mean ± standard deviation (n = 6). *statistically significant difference, values of p <0.05 were considered statistically significant.	64
Figure 6. Viscosity and shear rate of 1% chitosan solution.....	65

Figure 7. UV spectrum of the INH and 35 mM SDS alone and combined in saliva buffer	68
Figure 8. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of SDS in saliva buffer pH 6.8.	68
Figure 9. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of SDS in Britton-Robinson buffer pH 2.0.....	69
Figure 10. UV spectrum of the INH and 10 mM ST alone and combined in saliva buffer pH 6.8.	70
Figure 11. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of ST in saliva buffer pH 6.8.	70

CAPÍTULO II

Figure 1. Electronic spectra of PCF-ammine and PCF-INH in water.	87
Figure 2. Electronic spectra of PB, PB-INH and PCF-INH. The absorbance values between 400 and 800 nm were normalized for the comparison purpose.....	88
Figure 3. IR spectra of PCF-INH, PB-INH and PB.....	89
Figure 4. Voltammograms of the aqueous solutions of (A) INH and PCF-INH; (B) PCF-ammine and PCF-INH. A scan rate of 100 mVs^{-1} was considered (supporting electrolyte: KCl 0.1 mol L^{-1}).	90
Figure 5. Electronic spectrum of PCF-INH in DMSO solution and linear relationship between $\ln [\text{INH}]$ and time.	92
Figure 6. Electronic spectrum of PCF-INH in (A) water and PBS solution (B).	92
Figure 7. Job's plot obtained from intervalence transition of ferric cyanidoferrate(II) (710 nm to PB and 770 nm to PB-INH). $X_{\text{complex}} = \text{HCF to PB and PCF-INH to PB-INH}$	93
Figure 8. Proposed ferric cyanidoferrate(II) models. A) PB with 1:1 ratio. B) PB-INH with 9:5 PCF-INH ratio. C) A plane of PB-INH model.	94
Figure 9. Permeation profile of INH (●), isonicotinic acid (Δ), (○) PCF-INH and (▼) PB-INH AI. Data are presented as mean \pm SD ($n=5$).....	95
Figure 10. Amount of drug retained in the buccal mucosa after treatment with INH, AI and metallic complexes. Data are represented as mean \pm SD ($n=5$). t -test ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) was considered to compare each tested sample with the control (INH solution).	96
Figure 11. Dissociation profile of the PCF-INH in PBS buffer. (●) Isonicotinic acid.....	97
Figure 12. Dissociation profile of the PB-INH in PBS buffer. (●) Isonicotinic acid.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Permeability parameters of isoniazid (INH) alone and combined with absorption enhancers.	64
Table 2. Micellar sizes of SDS and ST in water and saliva buffer pH 6.8. Data are presented as mean values \pm standard deviation (SD).	66
Table 3. Zeta potential values of SDS and ST in saliva buffer pH 6.8 and Britton-Robinson buffer pH 2.0. Data are presented as mean values \pm standard deviation (SD).	67

CAPÍTULO II

Table 1. Permeability parameters of isoniazid (INH), isonicotinic acid (IA) and metallic complexes.	95
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLAE (HPLC)	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	- Concentração micelar crítica
CN	- Cianeto
CS	- Quitosana
DMSO	- Dimetilsulfóxido
IA	- Ácido isonicotínico
ILTB	- Infecção latente por tuberculose
INH	- Isoniazida
IQG-607	- Pentacianoferrato de isoniazida
IR	- Infravermelho
KatG	- Enzima catalase-peroxidase
KBR	- <i>Krebs bicarbonate Ringer</i>
MDR-TB	- Resistência a rifampicina e isoniazida
mM	- Milimolar
Mt	- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PB	- Azul da Prússia
PB-INH	- Complexo de isoniazida com azul da Prússia
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCF-ammine	- Amino pentacianoferrato
PCF-INH	- Pentacianoferrato de isoniazida
RR-TB	- Resistência a rifampicina
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
ST	- Taurocolato de sódio
TB	- Tuberculose
OMS (WHO)	- Organização Mundial da Saúde
XDR-TB	- Extensivamente resistente a medicamentos
NAD	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	TUBERCULOSE.....	18
2.2	ISONIAZIDA	20
2.2.1	Mecanismo de ação	22
2.2.2	Mecanismo de resistência à INH	22
2.2.3	Efeitos adversos da INH.....	23
2.2.4	Farmacocinética.....	24
2.3	MUCOSA BUCAL.....	25
2.3.1	Anatomia e fisiologia da mucosa bucal.....	25
2.3.2	Saliva e muco.....	27
2.3.3	Rotas de permeabilidade.....	27
2.3.4	Modelo de avaliação de permeabilidade de fármacos na mucosa bucal.....	28
2.4	PROMOTORES DE PERMEABILIDADE	30
2.4.1	Tensoativos	30
2.4.2	Dodecil sulfato de sódio (SDS).....	31
2.4.3	Sais Biliares	33
2.4.4	Quitosana.....	36
2.5	COMPLEXOS METÁLICOS	37
3	CAPÍTULO I: ARTIGO SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO.....	53
4	CAPÍTULO II: ARTIGO À SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO.....	79
5	DISCUSSÃO GERAL	103
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107

1 INTRODUÇÃO

Em 2018, a tuberculose (TB) alcançou a marca de 1,4 milhões de mortes, representando um problema de saúde pública; requerendo não só um diagnóstico precoce bem como alternativas terapêuticas diferenciadas (WHO, 2019). A isoniazida (INH), introduzida na terapêutica da TB em 1952, faz parte da monoterapia preventiva da TB latente e do esquema básico para tratamentos de longa duração (RABAHI *et al.*, 2017; BRASIL, 2011). Neste último caso, é associada a outros fármacos a fim de evitar ou reduzir problemas de resistência microbiana. Ainda que a administração oral deste fármaco seja eficaz, efeitos adversos indesejáveis, tal como a hepatotoxicidade, podem levar ao abandono do tratamento (CAON *et al.*, 2015a). Isto se torna ainda mais evidente em pacientes com hepatopatias, indivíduos acima de 50 anos, mulheres no pós-parto recente e quando é associada ao uso de álcool e rifampicina (ARBEX *et al.*, 2010; PERWITASARI; WILFFERT, 2015). Como consequência, observa-se um aumento substancial dos custos do tratamento em função da adição de visitas do paciente aos serviços/unidades de saúde, aumento do número de exames complementares necessários para o diagnóstico desses efeitos ou ainda, em casos mais graves, necessidade de hospitalização do paciente.

Frente a isto, a utilização de rotas alternativas que evitam o metabolismo hepático de primeira passagem pode ser considerada a fim de minimizar estes problemas. Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, investigou-se a permeação da isoniazida através de pele suína, com resultados promissores em termos de absorção. Embora estudos *in vivo* não foram realizados, simulações em um modelo matemático sugeriram o alcance de concentrações terapêuticas sistêmicas (CAON *et al.*, 2015a). Dando continuidade a este estudo, Rosa (2018) desenvolveram uma forma farmacêutica intermediária para a INH (cocristais) como uma estratégia para controlar o seu perfil de liberação e para a obtenção de um efeito local. A taxa de permeação mostrou ser dependente do grau de dissociação do fármaco a partir do cocrystal. Resveratrol foi utilizado como conformador, pois caso a INH fosse absorvida, danos hepáticos poderiam ser evitados com o uso deste agente (possui efeito fotoprotetor já bem conhecido). Além disto, em uma leitura mais aprofundada, foi notificada a existência de casos de tuberculose cutânea e opções terapêuticas de uso tópico ainda não se encontravam disponíveis no mercado até o momento (DIAS *et al.*, 2014; CHEN, CHEN, HAO, 2019).

Ainda que a administração da INH pela pele tenha se mostrado promissora, tanto para efeito local quanto sistêmico, estudos recentes têm mencionado alterações cutâneas causadas

pelo fármaco, o que também poderia resultar em efeitos adversos e/ou redução da adesão ao tratamento (JUNG *et al.*, 2019). O fato de a INH ser transportada pelos folículos e a proporção dos mesmos variar entre os indivíduos, particularmente quando se considera diferentes sexos, dificulta a padronização de uma forma farmacêutica final. Alternativamente, a rota bucal poderia ser utilizada para a administração da INH. Esta rota caracteriza-se por alta vascularização (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012), o que permitiria uma rápida absorção do fármaco (uma das vantagens em relação à via cutânea). Espera-se também uma absorção mais uniforme para diferentes indivíduos.

Outro fator de grande relevância no controle da TB são os casos de resistência aos esquemas básicos de tratamento, que tem sido associado frequentemente a mutações no gene da catalase-peroxidase (KatG), enzima crucial para a ativação do pró-fármaco INH. Neste sentido, não só novos fármacos como derivados dos já existentes têm sido demandados a fim de driblar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Os complexos metálicos têm se mostrado uma alternativa muito promissora já que incluem um mecanismo de auto-ativação que dispensa a catalase-peroxidase (LABORDE *et al.*, 2018; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2012). Neste trabalho, considerou-se a utilização do pentacianoferrato de isoniazida (PCF-INH), que é obtido pela reação direta da INH com aminopentacianoferrato (uma reação de substituição de ligantes). Este composto vem sendo investigado por outros grupos de pesquisa como um composto promissor para o tratamento de casos resistentes à INH (BASSO *et al.*, 2010; LABORDE *et al.*, 2018; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2012, 2017). Apesar da alta atividade, este composto apresenta uma baixa biodisponibilidade oral, o que torna necessária à sua administração por rotas alternativas. Um segundo complexo metálico, inédito, obtido a partir do azul da Prússia foi incluído no estudo.

Neste contexto, além de propor uma nova rota para a administração da INH, este estudo teve como propósito avaliar a permeabilidade bucal de complexos metálicos da mesma. Estudos mecanísticos foram realizados na tentativa de desvendar como sistemas micelares interagem com a mucosa bucal e/ou fármaco. Além disso, estudos de dissociação dos complexos metálicos foram considerados para melhor compreensão da liberação do fármaco e dos produtos formados a partir da descomplexação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a permeabilidade bucal da isoniazida e de complexos metálicos da mesma através do modelo das câmaras de difusão de Franz e mucosa suína.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação da isoniazida e ácido isonicotínico;
- Selecionar promotores químicos de absorção compatíveis com a mucosa bucal e aplicados a fármacos hidrofílicos;
- Avaliar a permeabilidade bucal da isoniazida isolada e em combinação com diferentes promotores químicos de permeabilidade;
- Calcular os parâmetros de fluxo, coeficiente de permeabilidade e tempo de latência;
- Avaliar a retenção do fármaco na mucosa bucal na presença e ausência de promotores de absorção;
- Avaliar o mecanismo de promoção da absorção dos tensoativos e quitosana selecionados através de análises de mobilidade eletroforética e espalhamento de luz dinâmico, viscosidade e técnicas espectroscópicas;
- Preparar complexos metálicos de pentacianoferrato e azul da Prússia por reações de substituição de ligantes;
- Avaliar defeitos estruturais de complexos a base de azul da Prússia pelo método de Jobs;
- Avaliar processos oxidativos para a INH e complexos metálicos através do método de voltametria cíclica;
- Avaliar a taxa de dissociação dos complexos metálicos e os produtos de formação;
- Avaliar a permeabilidade dos complexos metálicos de isoniazida através de mucosa bucal.

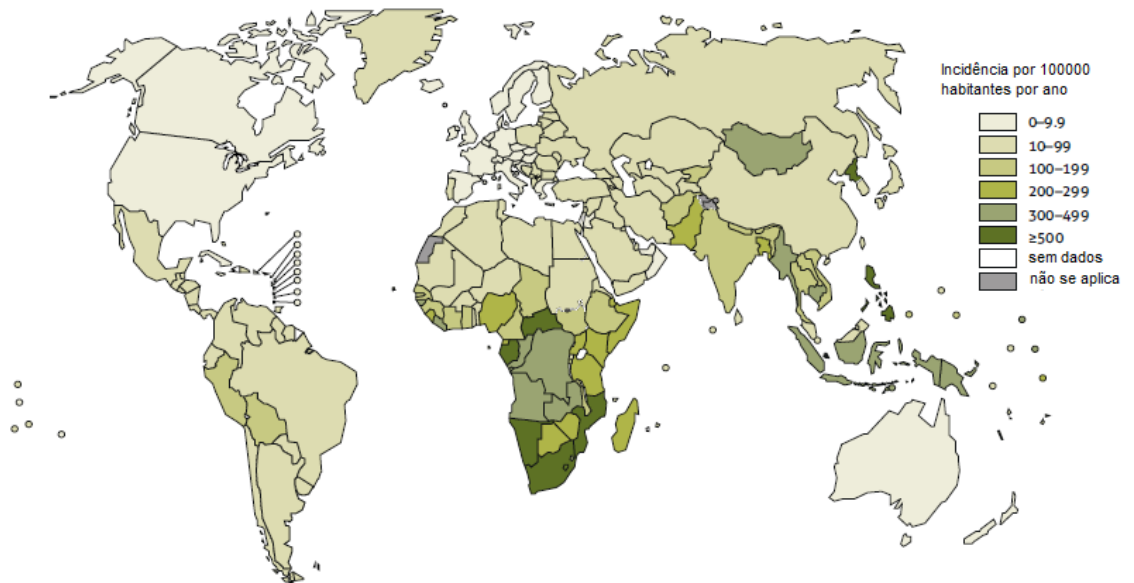
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB), uma patologia infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, pode ser considerada como um problema de saúde pública graças as altas taxas de prevalência. De acordo com a OMS, é uma das dez causas de morte no mundo e é a principal doença causada por um agente infeccioso. Estima-se que, no ano de 2018, a TB resultou em 10,0 milhões de novos casos e vitimou aproximadamente 1,5 milhões de indivíduos. As regiões mais acometidas são o Sudeste Asiático (44%), África (24%) e a região do Pacífico Ocidental (18%) (WHO, 2019).

No Brasil, no ano de 2018, foram diagnosticados aproximadamente 72.788 novos casos, apresentando um coeficiente de incidência de 34,8 casos/100 mil habitantes. Já em 2017, foram registrados 4.534 óbitos, o que corresponde a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil habitantes (Figura 1) (BRASIL, 2019a).

Figura 1. Estimativa da taxa de incidência de TB no mundo, 2018



Fonte: WHO (2019).

Há estimativas de que um quarto da população mundial estaria infectada pelo *M. tuberculosis*. Como estratégia para erradicação da TB até 2035, a OMS sugere o aumento do rastreio, diagnóstico e tratamento da infecção latente (ILT) (BRASIL, 2018). A ILT corresponde aos casos em que há presença de uma resposta imune específica frente o *M.*

tuberculosis e ausência de sinais clínicos da doença. Nestas situações, a terapia preventiva é a principal intervenção (BRASIL, 2019a; AKOLO *et al.*, 2015).

A infecção por TB está dividida em primária (primo-infecção) e secundária. A forma primária é adquirida pela inalação de gotículas impregnadas de microrganismos por indivíduos que ainda não tiveram contato com o bacilo; o que a torna mais comum em crianças. Já a forma secundária, ocorre pela reativação de bacilos latentes ou por uma nova infecção (reinfecção exógena) (BOMBARDA *et al.*, 2001). Apesar do local de infecção primária ser, na maioria dos casos, os pulmões, outros locais como a pele, ossos, trato gastrointestinal e sistema genito-urinário, também podem ser afetados (DOGRA; CHANDER; KRISHNA, 2013).

A TB também é classificada como pulmonar e extrapulmonar. A forma pulmonar, além de ser a mais frequente (80% dos casos), tem maior impacto como problema de saúde pública já que sua transmissão ocorre através do ar (espirros, tosse ou fala), o que leva a uma rápida disseminação da doença. Os principais sintomas da TB são tosse persistente (mais de 15 dias) seca ou produtiva, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento devido à falta de apetite (BRASIL, 2019b).

Nos casos de TB extrapulmonar, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado e sua ocorrência é mais comum em pacientes imunodeprimidos. A TB oral ocorre entre 0,1 a 1% dos casos de TB extrapulmonar (NEMES *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, manifesta-se na forma de ulcerações (55%), que podem apresentar margens endurecidas, mal definidas e uma base necrótica ou recobertas por uma camada acinzentada ou amarelada (KAKISI *et al.*, 2010; ROUT *et al.*, 2019). Em geral, as lesões são assintomáticas, podendo resultar em dor ao se alimentar (15% dos casos) e disfonia (2% dos casos) (KAKISI *et al.*, 2010).

Na revisão feita por Kakisi e colaboradores (2010), com publicações de 1950 a 2009, a TB oral apareceu como infecção primária em 42% dos pacientes e secundária em 58% (54% pulmonar, 4% extrapulmonar). Em aproximadamente 50% dos pacientes, a manifestação da TB oral levou ao diagnóstico prévio da TB sistêmica e, conseqüentemente, a um tratamento mais eficaz. O tratamento de TB oral é realizado da mesma forma que a TB sistêmica, neste sentido, um medicamento para aplicação na cavidade oral seria vantajoso, já que trataria as lesões locais e reduziria a transmissão do *M. tuberculosis*, já que a mesma ocorre através de gotículas expelidas oralmente.

Atualmente, o esquema terapêutico para novos casos de TB consiste em isoniazida (INH) associada à rifampicina, pirazinamida e etambutol nos dois primeiros meses, seguidos de INH e rifampicina nos 4 meses seguintes (RABAHI *et al.*, 2017). Nos casos de infecção

latente por TB, a INH é usada como monoterapia por períodos de seis a doze meses (AKOLO *et al.*, 2015; BRASIL, 2019b; RABAHI *et al.*, 2017). A terapia preventiva é recomendada para crianças e adultos infectados pelo HIV sem TB ativa, incluindo mulheres grávidas, aqueles que recebem terapia antirretroviral e aqueles que completaram com sucesso o tratamento da TB (AKOLO *et al.*, 2015). É também recomendada para crianças com menos de 5 anos e indivíduos saudáveis que convivem com aqueles positivos para TB (WHO, 2019a).

As reações adversas aos esquemas terapêuticos da TB são divididas em dois grupos: as reações adversas menores, onde normalmente não há necessidade de suspensão do tratamento; e as reações adversas maiores (variam de 3 a 8%), em que há necessidade de alteração e/ou suspensão do tratamento. As reações adversas mais frequentes com o esquema básico da TB são a alteração da cor da urina (100%), a intolerância gástrica (40%), as alterações na pele (20%), icterícia (15%) e dores nas articulações (4%) (BRASIL, 2019a). Já a lesão hepática induzida por fármacos pertencentes ao esquema terapêutico da TB é menos frequente, porém, é a reação adversa de maior gravidade (COCA, 2009; RABAHI *et al.*, 2017).

No Brasil, a média de efetividade do tratamento da TB é em torno de 70% (50-90%). A falta de adesão ao tratamento é a principal causa da baixa efetividade e pode ocorrer por abandono do tratamento, uso errado e/ou uso irregular dos medicamentos para TB. Além da falha terapêutica, a falta de adesão ao tratamento leva ao desenvolvimento de microrganismos resistentes e recidiva da doença (RABAHI *et al.*, 2017)

Em 2018, estimou-se que, cerca de 3,5% de novos casos e 18% dos casos tratados previamente apresentavam multirresistência a medicamentos TB (MDR-TB - resistentes a rifampicina e isoniazida) ou resistência a rifampicina (RR-TB). Em ambos os casos, há necessidade de tratamento com fármacos de segunda escolha, por pelo menos 9 meses e até 20 meses, os quais são caracterizados por efeitos colaterais ainda mais graves que os mencionados anteriormente. Há ainda os casos de TB extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB). Nestes casos, ocorre a MDR-TB e ainda a resistência a pelo menos uma fluoroquinolona e um agente injetável de segunda linha (amicacina, capreomicina ou canamicina) (WHO, 2019).

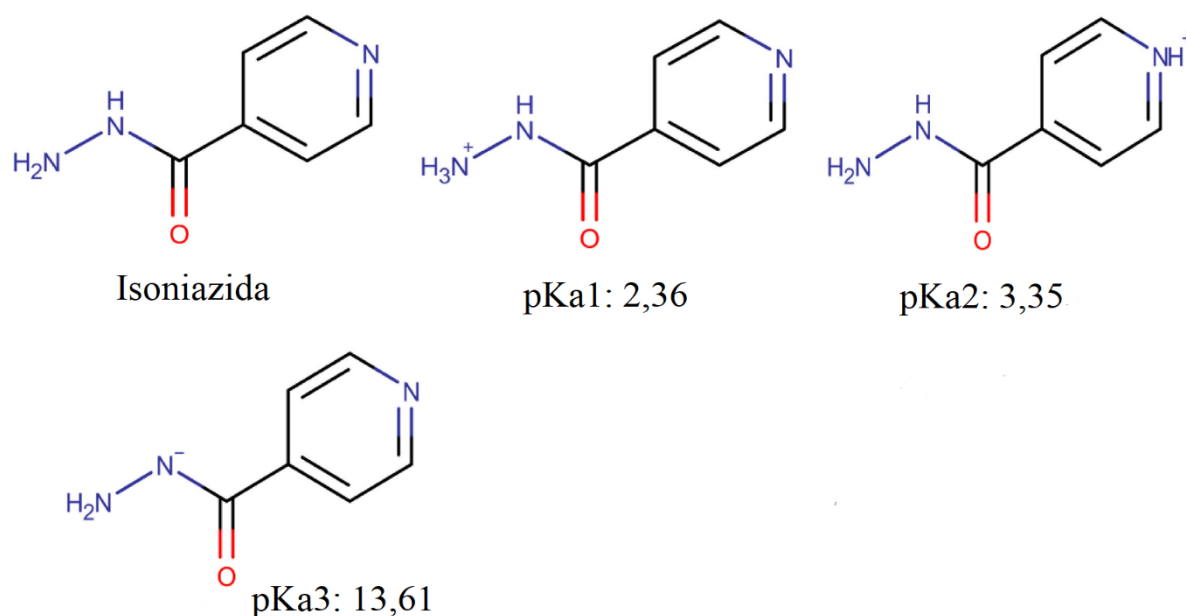
2.2 ISONIAZIDA

A isoniazida é um pró-fármaco sintético, constituída por um anel piridina e um grupo hidrazida, também conhecida como hidrazida do ácido isonicotínico (USP, 2008). Foi descrita em 1912 e usada para fins terapêuticos a partir de 1952. Além de ser utilizada em combinação

com outros fármacos no tratamento básico da TB, é também utilizada na monoterapia para tratamento de TB latente, como já mencionado na secção anterior. A concentração inibitória mínima da INH sobre o *Mycobacterium tuberculosis* varia de 0,02-0,20 µg/mL (ARBEX *et al.*, 2010). A dose utilizada terapeuticamente varia entre 4 e 6 mg/Kg/dia, com uma dose máxima de 300 mg (BECKER *et al.*, 2007).

Quimicamente apresenta forma molecular C₆H₇N₃O e massa molar de 137,14 g/mol (USP, 2008; Figura 2). Trata-se de um composto hidrofílico, com uma solubilidade aquosa de 125 mg/mL a 25°C e um log P de -0,64 (BECKER *et al.*, 2007). O fármaco encontra-se na forma não ionizada na faixa de pH 6,8 e 10,2. Apresenta três valores de pKa: 2,36 (pKa₁), 3,35 (pKa₂) e 13,61 (pKa₃). O pKa₁ e pKa₂ estão relacionados à protonação dos hidrogênios da hidrazina e do anel piridina, respectivamente. O pKa₃ está associado à desprotonação do nitrogênio do grupamento hidrazida. Uma forma duplamente protonada (nitrogênios da hidrazina e do anel piridina) pode estar presente em valores de acidez extrema (pH 0 a 1) (BECKER *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2017). Segundo as diretrizes da OMS, pertence ao Sistema de Classificação Biofarmacêutica I/III, ou seja, apresenta-se como solúvel, porém, sua permeabilidade é classificada como de *bordeline* (WHO, 2006).

Figura 2. Estrutura química da isoniazida e de suas formas ionizadas conforme o pKa

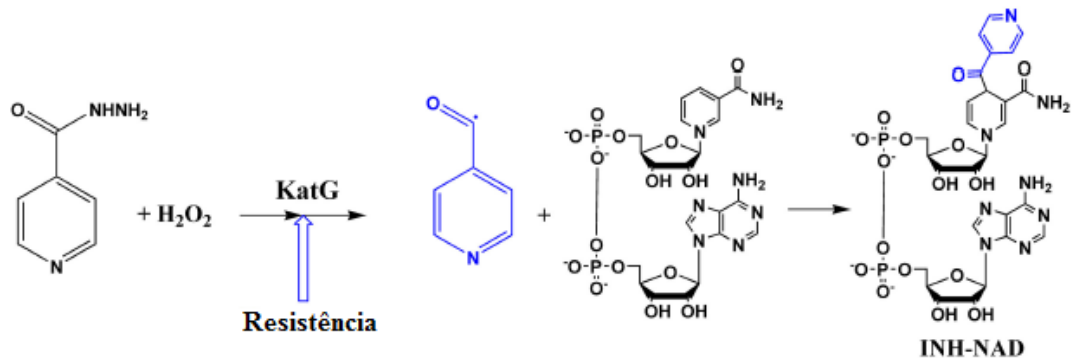


Fonte: adaptado de Khan *et al.* (2017).

2.2.1 Mecanismo de ação

A INH é um pró-fármaco que penetra no micro-organismo por difusão passiva. É convertida na forma ativa após a clivagem pela enzima catalase-peroxidase (*KatG*) do *Mycobacterium tuberculosis*, formando um radical isonicotinoíla, que reage com NAD⁺ para formar um “aduto” INH+NAD (Figura 3) (KASPER; FAUCI, 2015; VILCHEZE; JACOBS, 2019). Nesta etapa, há liberação de espécies reativas de oxigênio tais como o superóxido, H₂O₂, hidroperóxidos e óxido nítrico, que contribuem para os efeitos bactericidas sobre o *M. tuberculosis* (KASPER; FAUCI, 2015; TIMMINS; DERETIC, 2006). Após a ativação, o “aduto” INH+NAD inibe a atividade enzimática da *InhA*, a qual está envolvida na produção do ácido micólico, um componente essencial da parede celular bacteriana (KASPER; FAUCI, 2015; VILCHEZE; JACOBS, 2019), bem como na síntese de ácidos nucleicos (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015).

Figura 3. Mecanismo de ativação enzimática da INH.



Fonte: Abbadi *et al.* (2018a).

2.2.2 Mecanismo de resistência à INH

Para estimar os casos de resistência à INH, Jenkins, Zignol e Cohen (2011) reuniram dados da OMS de 1994 a 2009, considerando tanto os casos novos quanto os de retratamento. A região da Europa Oriental apresentou uma incidência substancialmente maior que as demais regiões, que foi de 44,9% (33,5 e 61,4% de casos novos e retratamento, respectivamente). Nas demais regiões, a incidência de casos resistentes à INH foi de 13,9% (10,7 e 29,0% de casos novos e após retratamento, respectivamente). Os dados da OMS, por sua vez, mostram que 8% dos pacientes com TB no mundo são TB suscetível à rifampicina e resistente à isoniazida.

Nestes casos, o tratamento para TB recomendado é a utilização de rifampicina, etambutol, pirazinamida e levofloxacina por 6 meses para tratamento da TB (WHO, 2018).

Segundo Seifert *et al.* (2015), as mutações genéticas que conferem resistência à INH podem ocorrer em 15 diferentes regiões, a considerar: *katG*, *inhA*, *ahpC-oxvR*, *efpA*, *fadE24*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *kasA*, *nat*, *ndh*, Rv1772, Rv1592c, Rv0340 e *srmR*.

A mutação mais frequente (50 a 95%) é a que ocorre com a enzima *KatG* (ZHANG; YEW, 2009). As mutações nesta enzima ocorrem, principalmente, por uma mutação no códon 315, pela substituição do aminoácido serina pela treonina (93,4%) e substituição da serina pela asparagina (3,6%) (SEIFERT *et al.*, 2015). Sugere-se que a redução na ativação da INH possa ser explicada por modificações estruturais que estreitam o canal de acesso ao grupo heme na enzima ou por perturbações na transferência de elétrons devido a alterações no ciclo catalítico da catalase-peroxidase ou simplesmente por modificações no sítio de ligação da INH (DEEMAGARN *et al.*, 2005).

Outra mutação, que pode estar presente entre 8 a 43% dos casos de resistência a INH (ZHANG; YEW, 2009), é a que ocorre no promotor *inhA*, que se trata de uma substituição de nucleotídeos C-15t, resultando em menor afinidade desta enzima pelo cofator NADH (ABBADI *et al.*, 2018b; VILCHEZE; JACOBS, 2019). Já a mutação na *ahpC-oxvR*, enzima envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo, ocorre em torno de 1% dos isolados resistentes (SEIFERT *et al.*, 2015).

2.2.3 Efeitos adversos da INH

Conforme já mencionado, os efeitos adversos da INH estão classificados como menores ou maiores. Dentre os efeitos adversos menores estão náuseas, vômito, epigastralgia, elevação transitória e assintomática das enzimas hepáticas (ocorre em 20% dos pacientes), artralgia, alterações de comportamento (cefaleia, insônia, euforia, agitação, ansiedade e sonolência), acne na face e tronco e prurido cutâneo ou febre. Já os efeitos adversos maiores são: neuropatia periférica (ocorre em cerca de 20% dos casos e é dose dependente), lúpus eritematoso, psicose, crise convulsiva, confusão mental, alterações hematológicas ou vasculite e hepatotoxicidade (ARBEX *et al.*, 2010; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015).

A hepatotoxicidade é o efeito adverso mais grave associado à INH e pode ser potencializada pela interação com outros fármacos utilizados na terapia da TB, tanto para indivíduos com TB ativa quanto para TB latente (COCA, 2009). A hepatotoxicidade não é

resultado de hipersensibilidade ou reação alérgica, mas causada principalmente pela produção de metabólitos tóxicos (TOSTMANN *et al.*, 2008). A incidência destes eventos pode variar entre 2 e 28% em indivíduos que utilizam o esquema básico de tratamento da TB. Quando usada como monoterapia nos casos de TB latente, a INH causa elevações significativas de transaminases em cerca de 0,5% dos pacientes. Para os outros fármacos, como são usualmente utilizados em combinação, é mais difícil ter conhecimento de seus dados de toxicidade separadamente (RAMACHANDRAN; SWAMINATHAN, 2014).

A INH é metabolizada em acetilisoniazida e, posteriormente, convertida em acetil-hidrazina pela N-acetil-transferase 2 (NAT2) e em hidrazina por uma reação de hidrólise. A acetil-hidrazina, por sua vez, pode ser convertida em metabólitos hepatotóxicos tais como a hidrazina pela CYP2E1 (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). Desta forma, a hidrazina pode ser obtida tanto pela conversão direta da INH como do seu metabólito acetil-hidrazina. Em acetiladores lentos, ou metabolizadores lentos, intermediários hepatotóxicos se acumulam em maior quantidade, o que acaba por tornar este quadro ainda mais grave (TOSTMANN *et al.*, 2008).

Outro fator relevante, é que a rifampicina, utilizada concomitantemente no tratamento da TB, é um indutor da CYP2E1 e, desta forma, age como um potencializador dos efeitos hepatotóxicos da INH (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). As hepatopatias também se acentuam entre os que consomem bebida alcoólica e nos indivíduos acima de 50 anos, onde a meia-vida da INH torna-se mais longa e níveis séricos mais elevados (ARBEX *et al.*, 2010).

2.2.4 Farmacocinética

A biodisponibilidade oral da INH é de aproximadamente 100%. O fármaco sofre metabolização hepática por acetilação via enzima N-acetiltransferase do tipo 2 (NAT2), produzindo acetilisoniazida e ácido isonicotínico. A depuração da INH depende das características genéticas dos pacientes, que podem apresentar fenótipo para a acetilação rápida, intermediária ou lenta. Esta variabilidade na acetilação tem relação com o polimorfismo exibido pela NAT2 (RAMACHANDRAN; SWAMINATHAN, 2012). Entre 70 a 96% da INH é excretada pela urina em 24 h, predominantemente na forma de ácido isonicotínico e acetilisoniazida (ARBEX *et al.*, 2010; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). O fármaco é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, com picos de concentrações plasmáticas de 3-5 µg/mL após administração de 5-20 mg/Kg, alcançados entre 1-2 horas (KASHUBA *et al.*, 1998). Seu tempo de meia-vida é em torno de 1 h nos acetiladores rápidos e de 2-5 h em

acetiladores lentos. Na presença de hepatopatias e de insuficiência renal, este parâmetro pode ser aumentado (ARBEX *et al.*, 2010). A presença de alimentos e antiácidos reduz ambas, absorção e biodisponibilidade da INH (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015).

2.3 MUCOSA BUCAL

Embora a administração de fármacos pela via oral seja mais conveniente (SOHI *et al.*, 2010), esta rota possui desvantagens tais como a degradação do fármaco no trato gastrointestinal (GI), absorção imprevisível e irregular, intolerância GI e metabolismo hepático de primeira passagem (PATEL *et al.*, 2012).

Para contornar estes problemas, o fármaco pode ser alternativamente administrado via transmucosas tais como a mucosa nasal, retal, vaginal, ocular e bucal. Tanto o efeito de primeira passagem hepático quanto o metabolismo ou degradação de fármacos no trato GI podem ser evitados mediante uso destas rotas (PATIL; SAWANT, 2008).

A administração de fármacos na cavidade oral é altamente aceitável pelos pacientes e apresenta outras vantagens que incluem: baixa atividade enzimática, é indolor durante a aplicação; fácil remoção do fármaco em caso de necessidade; promotores de permeabilidade, inibidores enzimáticos ou modificadores de pH podem ser incluídos na formulação; versatilidade no desenvolvimento de medicamentos de forma a liberar o fármaco multi- ou unidirecional para ações locais ou sistêmicas; possibilidade de propor sistema de liberação modificada e de entrega de moléculas inadequadas pela via oral (HASSAN *et al.*, 2010; SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012; SINGH *et al.*, 2011).

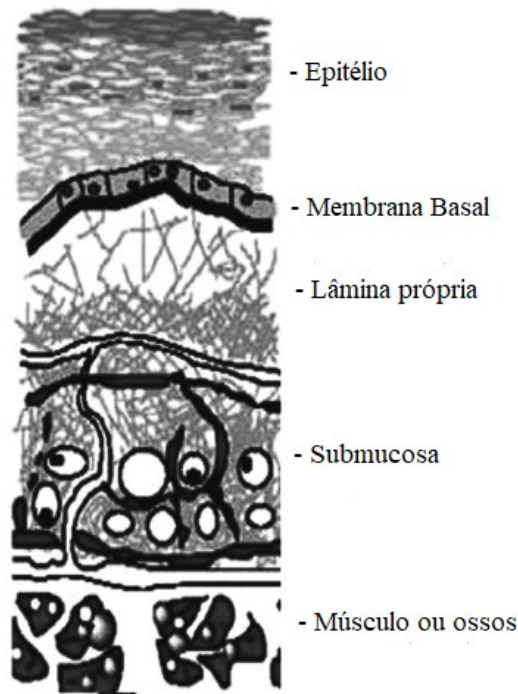
A mucosa bucal se torna atrativa para a administração de fármacos por apresentar uma rápida recuperação após estresse ou dano, ser relativamente permeável, apresenta rico suprimento sanguíneo que permite o acesso direto à circulação sistêmica através da veia jugular interna, o que evita a metabolização hepática de primeira passagem (HASSAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011) e redução da dose e efeitos colaterais (BOBADE *et al.*, 2013; SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012).

2.3.1 Anatomia e fisiologia da mucosa bucal

A mucosa bucal possui superfície áspera e é composta por uma camada externa de epitélio escamoso estratificado que serve como uma barreira mecânica, protegendo os tecidos

subjacentes (SINGH *et al.*, 2011). O epitélio é composto por aproximadamente 40 a 50 camadas de células. Abaixo do epitélio, encontra-se a membrana basal, a lâmina própria e a submucosa (Figura 4). A lâmina própria é composta por quantidades variáveis de fibras colágenas e elásticas, nervos e vasos sanguíneos. Uma vez que os fármacos alcancem à lâmina própria, podem ser absorvidos pelos vasos e capilares sanguíneos conectados à veia jugular através das veias retromandibulares. Isto possibilita a absorção direta de fármacos nas veias portais, evitando o efeito de primeira passagem, que corresponde a principal vantagem da administração bucal sobre a administração oral de fármacos (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

Figura 4. Anatomia da mucosa oral



Fonte: Manohar *et al.* (2012)

A mucosa bucal possui uma espessura em torno de 500-800 μm e sua renovação ocorre a cada 5-6 dias. Sua permeabilidade foi estimada em 4-4000 vezes maior que a da pele (BOBADE *et al.*, 2013), dependendo das características físico-químicas do permeante, o que a torna atrativa para administração sistêmica de fármacos.

A mucosa bucal apresenta áreas de epitélio queratinizados e não-queratinizado. O epitélio queratinizado, que compreende a gengival e o palato duro, são relativamente impermeáveis à água e apresentam função de barreira (SOHI *et al.*, 2010). A função de barreira se deve a presença de lipídios neutros, tais como as ceramidas e acilceramidas, organizados de forma lamelar e representando a maior barreira para difusão de moléculas (GANEM-

QUINTANAR *et al.*, 1997). Já as regiões de tecido não queratinizado (sublingual, palato mole e bucal) são caracterizados por uma maior permeabilidade (HASSAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011), pois nestas regiões os espaços intercelulares apresentam baixas quantidades de ceramidas e não há acilceramidas. Estas regiões são compostas por lipídios polares, principalmente sulfato de colesterol e glicosilceramidas, empacotados de forma amorfa, tornando este epitélio mais permeável a água e, naturalmente, a fármacos hidrossolúveis (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005; SOHI *et al.*, 2010).

2.3.2 Saliva e muco

A saliva é um fluido aquoso com aproximadamente 1% de material orgânico e inorgânico. Sua função é lubrificar a cavidade bucal, iniciar a digestão e controlar a flora bacteriana local (RATHBONE; DRUMMOND; TUCKER, 1994). A presença de sais, principalmente cálcio e fósforo, tem função primordial na remineralização dos dentes. Seu fluxo contínuo na cavidade oral pode dificultar a retenção das formulações por um período significativo e dificultar a absorção (BOBADE *et al.*, 2013).

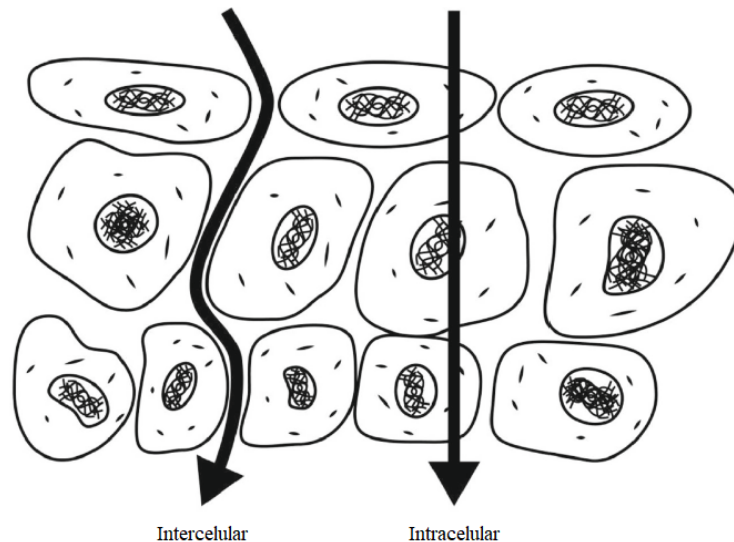
O muco que recobre a mucosa bucal apresenta uma espessura entre 1 e 400 μm , representando uma barreira física a permeabilidade de fármacos (SOHI *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011; SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012). A mucina é composta por 70-80% de açúcares, 12-25% de proteína e até 5% de ésteres sulfatados (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). As glicoproteínas presentes na mucina apresentam um alto peso molecular e são compostas por uma cadeia de oligossacarídeos ligada a um núcleo de proteína, fortemente glicosiladas. Como consequência, o muco é caracterizado por um aspecto gelatinoso (JIMÉNEZ-CASTELLANOS; ZIA; RHODES, 1993). Devido à presença de resíduos de ácido siálico e sulfatos, a carga total do muco é negativa. Assim, interações eletrostáticas com componentes da formulação podem ser estabelecidas, aumentando o tempo de residência na mucosa, o que acaba por contribuir com o aumento da quantidade de fármaco absorvida (SOHI *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011; SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012).

2.3.3 Rotas de permeabilidade

A mucosa bucal possui duas rotas de permeabilidade de fármacos, a intercelular (paracelular) e a intracelular (transcelular). A via intercelular, apresenta conteúdo extrudado dos grânulos da membrana celular e lipídeos de característica polar e não lamelar, tornando-a

atrativa para moléculas da natureza hidrofílica (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). A rota intracelular, por sua vez, é preferencialmente utilizada por fármacos lipofílicos já que as membranas celulares são caracterizadas por uma natureza lipofílica (Figura 5) (SMART, 2005).

Figura 5. Rotas de transporte de moléculas através da mucosa bucal.



Fonte: Caon *et al.* (2015b).

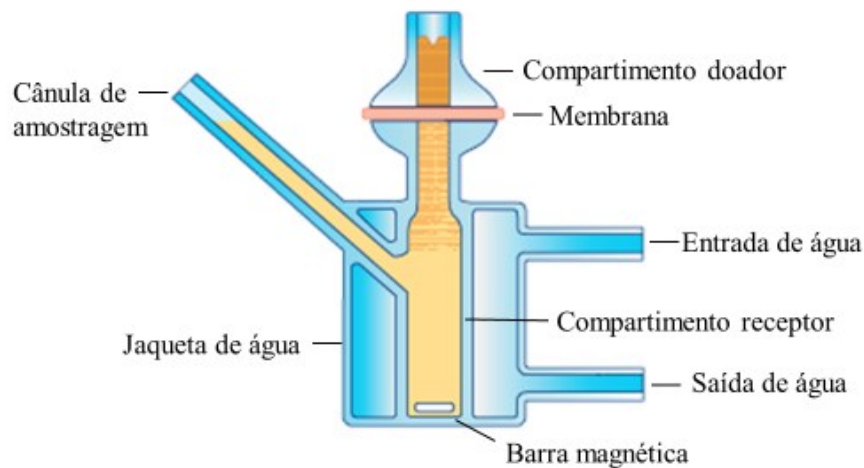
A mucosa bucal se mostra promissora para a administração de fármacos, pois até mesmo em modelos de epitélio de mucosa queratinizado, observou-se que moléculas de baixo peso molecular (~100 Da) se difundem rapidamente através do epitélio bucal. Gradualmente, a permeabilidade reduz para moléculas de até 300 Da. Já para as macromoléculas, como peptídeos ou grandes proteínas que apresentam estruturas entre 600 Da e 100 kDa, o mecanismo de permeabilidade se torna mais complexo, exigindo a inclusão de promotores de absorção na formulação (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

2.3.4 Modelo de avaliação de permeabilidade de fármacos na mucosa bucal

O modelo da câmara de difusão de Franz, proposto em 1975, é um dos mais utilizados para a avaliação da permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal. As câmaras de difusão de Franz (Figura 6) possuem dois compartimentos, doador e receptor, entre os quais é disposta uma membrana. Esta membrana pode ser sintética ou obtida a partir de algum tecido animal ou até mesmo humano. A parte epitelial da membrana deve estar voltada para o compartimento doador, onde é adicionado o fármaco ou formulação e, se necessário, soluções

tampões que mimetizam as condições da região corporal de estudo. O compartimento receptor também é preenchido com uma solução, geralmente tamponante, que deve mimetizar o comportamento do sangue. Ainda, no compartimento receptor, é depositada uma barra magnética que fica sob agitação durante todo o ensaio a fim de manter o sistema homogêneo. Recobrimo a câmara receptora, há a presença de um compartimento adicional, denominado de jaqueta de água, onde ocorre a circulação de água para controle da temperatura (FRANZ, 1975).

Figura 6. Câmara de difusão de Franz



Fonte: PermeGear (2019).

A seleção de tecidos animais para estudos de permeabilidade baseia-se na semelhança histológica com os tecidos humanos. A mucosa bucal humana apresenta áreas de epitélio não queratinizado, assim como os macacos, cães e porcos. Assim, a mucosa suína apresenta-se como uma opção promissora tanto do ponto de vista histológico quanto em relação a facilidade de obtenção dos tecidos em abatedouros (HOOGSTRAATE; BODDÉ, 1993). Pode ser utilizada para estudos de liberação e/ou transporte bucal, bem como para investigações mecânicas. Além disto, o custo da realização de estudos *in vitro* é significativamente menor do que os estudos *in vivo*, pois pequenas partes de mucosa bucal são necessárias para cada experimento (KULKARNI *et al.*, 2010). A facilidade de obtenção, preparo do tecido e custo são determinantes-chaves para a escolha do modelo animal.

Após a obtenção da mucosa bucal de interesse, a mesma deve ser conservada em uma solução tampão isotônica e utilizada imediatamente. Apesar do congelamento ser uma técnica comum e muito útil para armazenar células vivas, é um método inadequado para armazenar partes de tecido (HOOGSTRAATE; BODDÉ, 1993). Pesquisas tem demonstrado que as

mucosas apresentam alterações morfológicas após o congelamento, particularmente danos no epitélio, o que é atribuído a formação cristais de gelo no tecido (CAON; SIMÕES, 2011; HOOGSTRAATE; BODDÉ, 1993). Como consequência, as propriedades de barreira natural da mucosa podem ser alteradas, aumentando a permeabilidade de fármacos de forma indesejável (CAON; SIMÕES, 2011; FRANZ-MONTAN *et al.*, 2016). Isto destaca a importância de se realizem estudos com membrana fresca e íntegra a fim de que se possam gerar resultados fidedignos.

2.4 PROMOTORES DE PERMEABILIDADE

Devido as propriedades de barreira do epitélio e considerando que, em algumas situações, baixas quantidades de fármaco são disponibilizadas na circulação sistêmica, modificadores químicos desta barreira podem ser necessários para otimizar a permeabilidade de fármacos (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). Vários mecanismos de ação são propostos para estes agentes, tais como, o aumento do particionamento do fármaco no epitélio da mucosa bucal; extração de lipídios intercelulares; interação com os domínios de proteínas epiteliais; redução da viscosidade do muco e prolongamento do tempo de contato de moléculas na superfície da mucosa bucal (CAON *et al.*, 2015; NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005; VEUILLEZ *et al.*, 2001).

Os promotores ideais devem ser seguros; não danificar irreversivelmente ou permanentemente a mucosa (ŞENEL; HINCAL, 2001; SOHI *et al.*, 2010); não serem tóxicos, irritantes e alérgicos; ação rápida e reprodutível; devem ser inertes química e farmacologicamente; agirem unidirecionalmente, ou seja, devem permitir que agentes terapêuticos entrem no organismo, sem que ocorra perda de substâncias endógenas; serem apropriados a diversas formulações e compatíveis com os demais excipientes (SHARMA; KULKARNI; PAWAR, 2006; SINHA; PAL KAUR, 2000).

Os tensoativos, sais biliares, ácidos graxos, etanol, quelantes, Azone[®] e a quitosana tem sido os principais promotores químicos de absorção utilizados (CAON *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2010; LEE, 1990; NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005).

2.4.1 Tensoativos

Os tensoativos são moléculas anfífilas, caracterizadas por possuírem uma extremidade da molécula polar ligada a uma cadeia carbônica (linear, ramificada ou com partes

cíclicas) apolar (DALTIM, 2011). Quando as soluções de tensoativos alcançam a concentração micelar crítica (CMC), que é a concentração na qual os monômeros sofrem auto agregação, ocorre a formação de micelas (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 1998). Em água, as micelas se formam a partir da agregação da parte hidrofóbica dentro do núcleo e a parte hidrofílica associa-se à água (HAMMOUDA, 2013). A formação de micelas em uma solução pode ser observada pela redução da tensão superficial do sistema e alterações de propriedades físicas tais como a condutividade elétrica, pressão osmótica, densidade, dispersão da luz, ou índice de refração (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 1998).

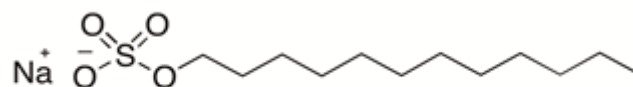
A formação de micelas é a base da técnica de solubilização por tensoativos, o que faz que estes sejam utilizados em diversas áreas, como a perfumaria, cosmetologia e tecnologia farmacêutica. No caso de estudos de permeabilidade, um dos mecanismos atribuído aos tensoativos é justamente a solubilização ou micelização de lipídeos intercelulares (NETZ; ORTEGA, 2005).

Os tensoativos são considerados agentes promissores como promotores de permeabilidade e, dependendo de suas características físico-químicas, concentração e tempo de exposição, podem agir sobre os tecidos promovendo a desnaturação ou extração de proteínas, inativação enzimática, intumescimento do tecido e extração de lipídicos (GANEM-QUINTANAR *et al.*, 1997).

2.4.2 Dodecil sulfato de sódio (SDS)

O SDS é um tensoativo aniônico, com uma cauda hidrofóbica formada por hidrocarbonetos lineares (Figura 7). Apresenta uma CMC entre 7 a 10 mM e peso molecular de 288,37 g/mol. As micelas de SDS são formadas pela agregação de aproximadamente 60 monômeros (BHAIRI *et al.*, 2017). A presença de sal pode aumentar o número de agregação e, conseqüentemente, o volume da micela. O aumento da temperatura, por sua vez, causa um efeito inverso, ou seja, reduz o tamanho micelar (HAMMOUDA, 2013).

Figura 7. Estrutura química do dodecil sulfato de sódio



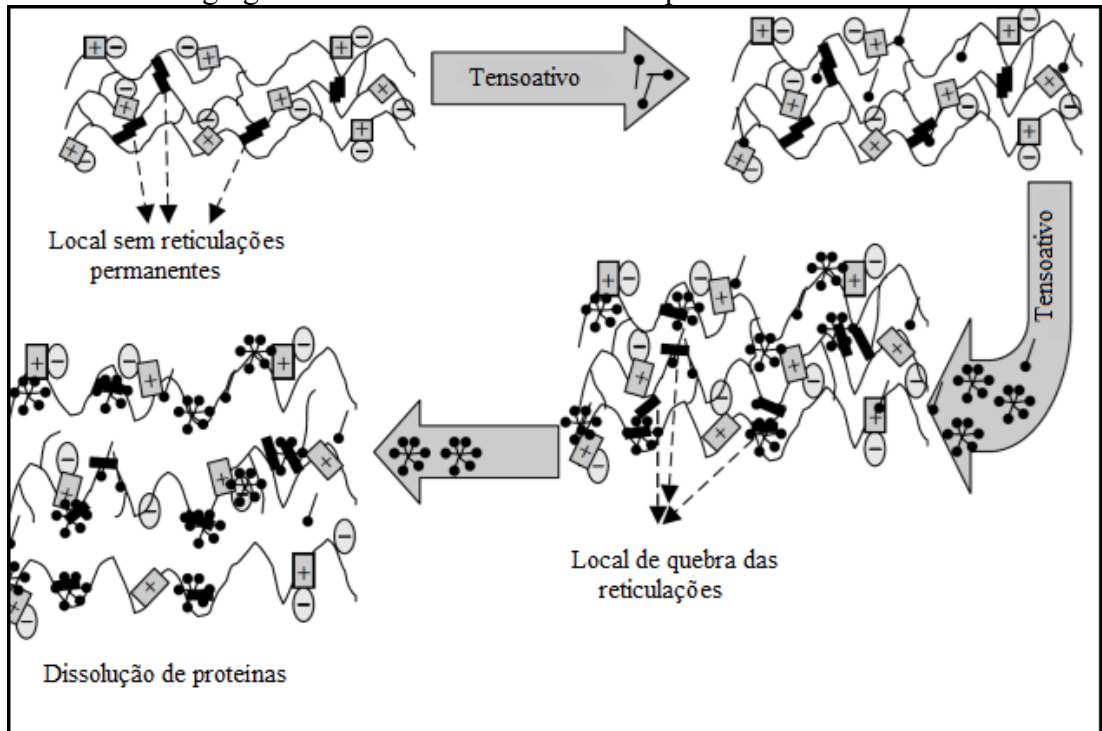
Dodecil sulfato de sódio

O papel do SDS como promotor de permeabilidade foi estudado por Nicolazzo, Reed e Finnin (2004) utilizando cafeína e estradiol como modelos de fármacos. Para a cafeína, observou-se um aumento da taxa de transporte após pré-tratamento com 0,05, 0,1 e 1% de SDS durante 2 h. Para o estradiol, um fármaco lipofílico, este agente não foi capaz de alterar a permeabilidade. Um dos mecanismos atribuídos ao SDS foi a formação de micelas capazes de extraírem os lipídeos intercelulares, tornando a via paracelular ainda mais hidrofílica. Já no caso do estradiol, o mesmo pode ter sido encapsulado na porção hidrofóbica das micelas. Em outro estudo com 5-fluoracila, um agente quimioterápico hidrofílico, um incremento na permeabilidade foi observado com o aumento da concentração do SDS (0,5, 1 e 1,5%) (DHIMAN; DHIMAN; SAWANT, 2009). Da mesma forma, o saquinavir apresentou um incremento na taxa de transporte na presença de SDS a 0,5% (RAMBHAROSE *et al.*, 2014). No estudo realizado por Hansen *et al* (2018), o tratamento com 1% de SDS reduziu a permeabilidade da cafeína e do diazepam e aumentou o transporte paracelular do manitol. Os autores sugeriram que as micelas de SDS extraem os lipídios da mucosa e, desta forma, poderia ocorrer um depósito de lipídios na superfície da mucosa, criando uma barreira para o transporte da cafeína. Para o diazepam, que tem uma maior lipofilicidade, foi hipotetizado seu encapsulamento nas micelas de SDS, da mesma forma como o estradiol (citado anteriormente). O fato de o SDS ter aumentado o transporte do manitol trouxe fortes indícios da ação deste tensoativos sobre a via paracelular (HANSEN *et al.*, 2018). Estes mesmos autores fizeram uma análise do estudo anterior realizado Nicolazzo, Reed e Finnin (2004), sugerindo que o aumento do transporte da cafeína pode ter ocorrido devido as diferenças no tipo de membrana utilizado. Hansen *et al* (2018) consideraram toda a mucosa bucal enquanto o estudo anterior considerou apenas o epitélio. O efeito de redução na permeabilidade de fármacos devido ao aumento da espessura do epitélio/mucosa também foi relatado por Kulkarni *et al* (2010).

Outra hipótese para o efeito de tensoativos sobre o incremento da permeabilidade de fármacos é que os monômeros de tensoativos aniônicos penetrariam em tecidos tais como a pele, interagindo com proteínas e aumentando a carga negativa da rede proteica, o que levaria ao intumescimento do tecido. Este efeito inicial promoveria ligações progressivas do tensoativo em camadas mais profundas da pele, tornando-a mais intumescida. Posteriormente, micelas e agregados do tensoativo penetrariam o tecido. A interação de tensoativos aniônicos às proteínas do epitélio ocorreriam por ligações cooperativas que aumentam a carga negativa da proteína, resultando em inchaço e eventual quebra da estrutura proteica (Fig. 8) (LIPS *et al.*, 2006; MORRIS *et al.*, 2019). Embora esta hipótese tenha sido inicialmente proposta utilizando a pele

como modelo de membrana, mecanismos semelhantes poderiam ser observados no epitélio bucal.

Figura 8. Esquema do intumescimento e dissolução devido à formação de agregados semelhantes a micelas em proteínas.



É improvável que a quebra das reticulações não permanentes seja totalmente reversível após a remoção dos tensoativos por diluição/enxágue. No caso de proteínas sem reticulações, a presença de cargas leva à dissolução. Por outro lado, para proteínas reticuladas, um significativo inchaço pode levar à penetração de quantidade maior de tensoativos em camadas mais profundas.

Fonte: Lips *et al.* (2006).

Hammouda (2013) sugere que, em soluções de SDS a 1%, aproximadamente 80% das moléculas de SDS participam na formação de micelas e os outros 20% ficam livres para manter o SDS dissolvido próximo ao nível da concentração micelar crítica (CMC). Desta forma, moléculas livres estariam disponíveis para interação com o epitélio.

2.4.3 Sais Biliares

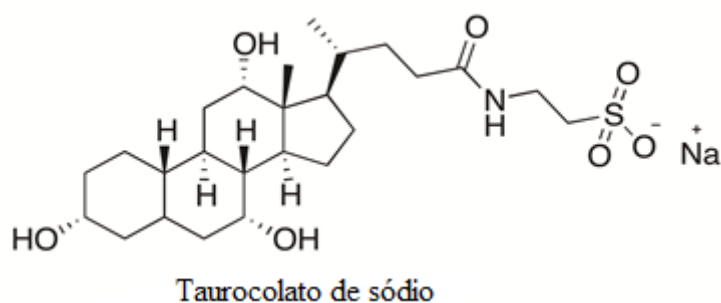
Os sais biliares, considerados detergentes biológicos, são derivados do ácido cólico e deoxicólico e formam estruturas micelares diferentes dos tensoativos clássicos. No organismo humano, participam da absorção de lipídeos e vitaminas lipossolúveis (ŞENEL; HINCAL, 2001). Sugere-se que sejam efetivos como promotores de permeabilidade por extraírem

proteínas ou lipídios da membrana, pela fluidização e/ou micelização reversa na membrana, criando canais aquosos para o transporte de fármacos (MOGHIMIPOUR; AMERI; HANDALI, 2015; VEUILLEZ *et al.*, 2001).

O 5-fluoruracila teve sua permeabilidade bucal aumentada tanto na presença de glicocolato de sódio (2, 4 e 6%) quanto taurodeoxicolato de sódio (1, 3 e 5%), sendo que este último foi mais efetivo (DHIMAN; DHIMAN; SAWANT, 2009). O glicocolato de sódio a 1% também melhorou o transporte bucal do acetato de flecainida, o que não foi observado para sua forma base, que tem um caráter lipofílico (DENEER *et al.*, 2002). Para a 2,3-didesoxicitidina, um efeito concentração-dependente foi observado. Ao contrário do glicocolato de sódio a 4 mM, concentrações de 10 e 50 mM não resultaram em um incremento significativo na taxa de transporte deste ativo (XIANG; FANG; LI, 2002). Da mesma forma, outros fármacos hidrofílicos como decitabina (MAHALINGAM *et al.*, 2007), cloridrato de morfina (SENEL *et al.*, 1998) e FITC (HOOGSTRAATE *et al.*, 1996) apresentaram um aumento da permeabilidade na presença de sais biliares. Estes estudos confirmam a eficácia dos sais biliares na otimização da permeabilidade de fármacos hidrofílicos por afetar o transporte pela rota paracelular.

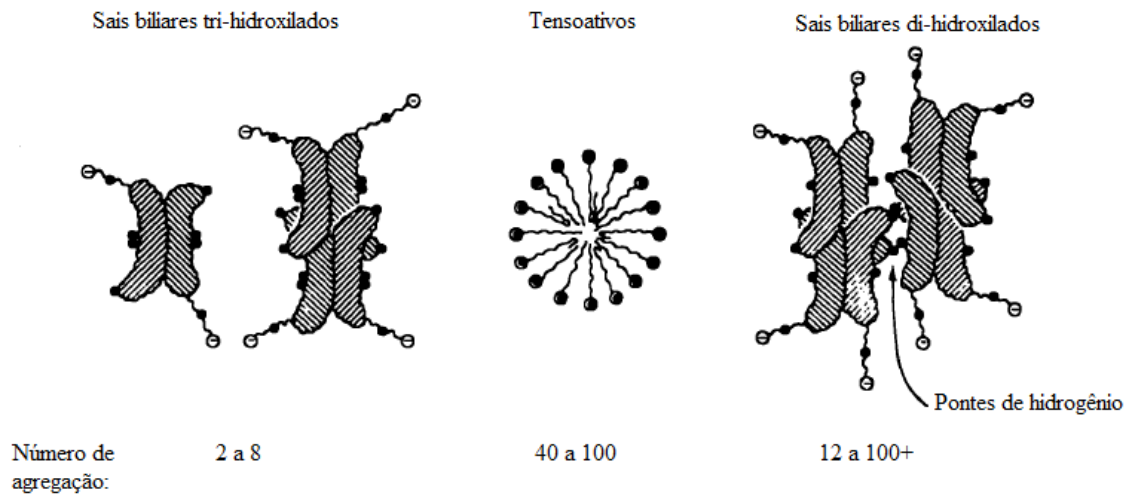
Outro fator relevante no uso de sais biliares como promotores de absorção é a variação da performance dependendo do grau de hidroxilação. Para sais tri-hidroxilados, tal como o taurocolato de sódio (Figura 9), o efeito sobre a permeabilidade ocorre apenas em concentrações muito acima da CMC. Nielsen e Rassing (1999), por exemplo, sugerem que a concentração do taurocolato de sódio (ST) deva ser 2 a 3 vezes maior que a CMC para a promoção da permeabilidade. Mahalingam *et al* (2007), por sua vez, observou um aumento do fluxo de permeabilidade da decitabina através da mucosa bucal mediante tratamento com ST e glicocolato de sódio apenas para concentrações maiores que 10 vezes a CMC. Um efeito contrário foi observado com o taurodeoxicolato de sódio e o glicodeoxicolato de sódio, ambos sais di-hidroxilados. Estes últimos foram eficientes promotores de absorção já em concentrações próximas da CMC.

Figura 9. Estrutura química do taurocolato de sódio



Small (1968) propôs que os sais biliares tri-hidroxilados formam micelas primárias, pequenas, formadas por apenas 2 a 8 monômeros (Figura 10) e menos hidrofóbicas comparativamente às micelas de sais biliares com duas hidroxilas. Estas últimas seriam mais hidrofóbicas, formando micelas primárias e secundárias. As micelas secundárias são maiores em função da agregação das micelas primárias por ligações de hidrogênio (SMALL, 1968).

Figura 10. Comparação da estrutura de micelas primárias e secundárias de sais biliares e micelas de tensoativos clássicos.



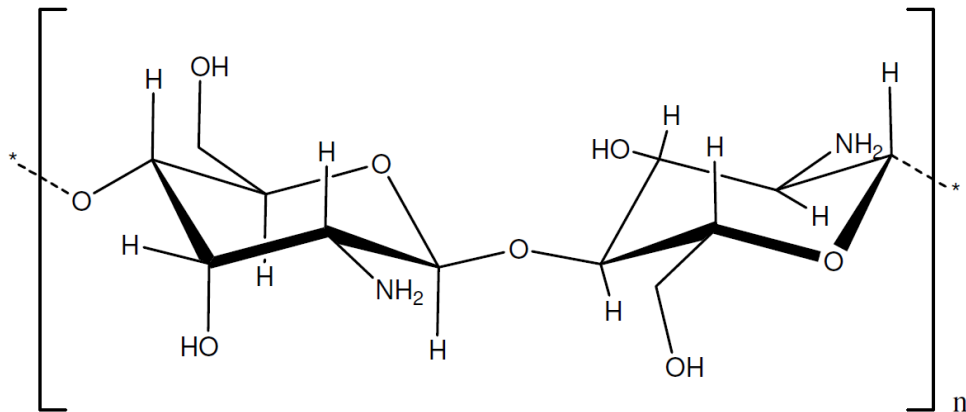
Fonte: Small (1968).

Desta forma, os sais biliares di-hidroxilados apresentam maior potencial como adjuvante de incremento da permeabilidade já que formam estruturas micelares maiores e mais hidrofóbicas, o que facilita a formação de poros intramembranosos. Já os sais biliares tri-hidroxilados conjugados com aminoácidos, como é o caso do ST, além de um grupo OH adicional, apresentam aminoácidos altamente carregados, que aumenta a hidrofiliidade (GORDON *et al.*, 1985). O efeito do aminoácido na molécula de sal biliar conjugado também pode ser observado pela redução da CMC, quando comparado ao mesmo sal biliar não-conjugado, com grupo terminal carboxilato. A micropolaridade do núcleo de micelas de sais biliares com o grupo terminal taurina apresenta-se mais hidrofílica, comparativamente ao mesmo sal com grupo terminal carboxilato (MUKHERJEE *et al.*, 2016). Os autores sugerem que a hidrofobicidade do núcleo esteroideal dos sais biliares seria o principal determinante na permeabilidade de fármacos, por apresentar maior interação e/ou solubilização dos componentes da membrana (GORDON *et al.*, 1985; MAHALINGAM *et al.*, 2007).

2.4.4 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo biodegradável de origem natural, biocompatível, de baixa toxicidade e custo (HU; SUN; WU, 2013). É frequentemente obtida através da desacetilação da quitina, que é considerada o segundo polímero mais abundante na natureza. A quitina representa o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e paredes celulares de alguns fungos como *Aspergillus*, *Zygomycetes* e *Mucor* (SINHA *et al.*, 2004). O grau de desacetilação da quitosana varia de 40 a 98% e o peso molecular entre 5×10^4 e 2×10^6 Da (MOURYA; INAMDAR, 2008). Quimicamente, é composta de um copolímero de glucosamina e N-acetil-glucosamina, com um grupamento amino primário e duas hidroxila livres para cada unidade de construção (Figura 11) (DASH *et al.*, 2011; SINHA *et al.*, 2004). As amins primárias conferem à quitosana carga positiva, o que permite sua ligação a diversos outros grupos carregados negativamente, tornando-a um polímero bastante atrativo e versátil para sistemas de administração de fármacos (HU; SUN; WU, 2013). Modificações estruturais nesta região permitem adquirir polímeros com diferentes propriedades, adaptáveis para cada tipo de aplicação.

Figura 11. Estrutura química da quitosana



A quitosana apresenta um valor de pKa de 6,3 e é facilmente solúvel em soluções com pH abaixo de 6,0. A solubilidade ocorre devido à protonação dos grupos amino, que faz com que ocorra repulsão de cargas e uma menor interação intermolecular. A transição de estado solúvel-insolúvel ocorre em seu valor de pKa (DASH *et al.*, 2011).

A quitosana vem sendo utilizada como promotor de permeabilidade por aumentar o tempo de residência da formulação na mucosa, resultando em um gradiente de concentração aumentado, que favorece a absorção de fármaco (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Isto ocorre principalmente pela interação eletrostática dos grupos amino primários catiônicos da

quitosana com o muco carregado negativamente (CAON *et al.*, 2015). Em pH fisiológico, o muco apresenta uma carga negativa devido a presença do ácido siálico e resíduos de sulfato, carga esta que contribui para a bioadesão (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012; SINGH *et al.*, 2011).

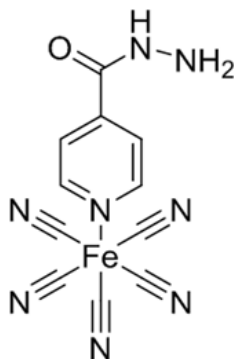
2.5 COMPLEXOS METÁLICOS

Cepas resistentes a INH foram identificadas logo após a inclusão deste fármaco na terapia da TB (MIDDLEBROOK, 1952). Como descrito anteriormente, a resistência a INH pode estar relacionada a mutação de pelo menos 15 regiões diferentes. A *KatG*, gene que codifica a enzima ativadora da INH, é um dos principais alvos de mutação gênica, o que torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias para combater o *M. tuberculosis* (SCHROEDER *et al.*, 2002).

Um análogo da INH, obtido a partir da sua reação com aminopentacianoferrato, formando o pentacianoferrato de isoniazida (PCF-INH), também denominado de IQG-607, tem sido proposto para o tratamento da tuberculose resistente a INH que ocorre devido a mutação do gene peroxidase-catalase. Este composto é caracterizado por agir diretamente sobre a *inhA*, sem necessidade de ativação enzimática pela *KatG* (LABORDE *et al.*, 2018; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2012).

Este composto é caracterizado pela presença de um grupamento inorgânico (pentacianoferrato III/II) ligado ao átomo de nitrogênio do anel heterocíclico da INH (Figura 12). É altamente solúvel em água (> 40mM), sensível ao oxigênio e à luz, e tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas na última década (ABBADI *et al.*, 2018a, 2018b; LABORDE *et al.*, 2018; NAIK *et al.*, 2013; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2014).

Figura 12. Estrutura química do pentacianoferrato de isoniazida (IQG-607)



Após a sua oxidação, o complexo termodinamicamente instável de ferro (III) sofre uma rápida reação intramolecular de transferência eletrônica, formando as espécies intermediárias $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{isonicotinila})]^{3-}$, resultando no complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{L})]^{3-}$ onde o “L” pode representar ácido isonicotínico, isonicotinamida ou isonicotinaldeído. Estes subprodutos podem se ligar a enoil redutase (*inhA*), ocorrendo a inibição da produção de ácido micólico, sem necessidade da enzima *KatG* (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A atividade do IQG-607 foi avaliada em cepas resistentes a INH. Oliveira *et al* (2004) avaliaram a inibição enzimática da *inhA* selvagem e da I21V, uma enoil redutase mutante, ambas resistentes à INH. As análises foram realizadas na ausência e presença de NADH (10 e 100 μM). Ambas as cepas (com *inhA* selvagem e com a enzima mutante I21V) mostraram-se sensíveis ao IQG-607, não requerendo ativação pela *KatG* e sem necessidade de NADH. O mecanismo de ação provavelmente envolve a interação com o sítio de ligação NADH da enzima.

A concentração inibitória mínima (CIM) do IQG-607 foi determinada utilizando uma cepa de referência do *M. tuberculosis*, a H37Rv, através do sistema radiométrico BACTEC[®]. Encontrou-se um valor de CIM de 0,2 $\mu\text{g/mL}$, o que foi comparável ao valor da CIM da INH (0,02 - 0,2 $\mu\text{g/mL}$) (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Outra análise para a determinação da CIM da INH e IQG607 foi realizada através de ensaio colorimétrico baseado em microplaca Alamar Blue (MABA), utilizando cepas H37Rv sensível a INH e dois isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à INH, um com mutações estruturais na *inhA* (S94A) e outro na região reguladora da *inhA* [C(-15)T]. Os valores da CIM do IQG-607 foram de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para S94A, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para [C(-15)T] e 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cepas H37Rv (BASSO *et al.*, 2010).

A ação antimicrobiana do IQG-607 também foi identificada em camundongos infectados com *M. tuberculosis*, o qual mostrou ser capaz de reduzir as lesões pulmonares (RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2012). Ensaios toxicológicos e de segurança realizados em ratas demonstraram efeitos adversos leves e de baixa incidência. Após a administração de doses únicas de 300 e 2000 mg/Kg, não houve mortalidade das cobaias. Assim, o valor da dose letal (DL50) para o IQG-607 foi considerado superior a 2000 mg/kg (RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2017). Testes de citotoxicidade, em concentrações variadas de IQG-607, foram também realizados em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico e em células Vero, HaCat e HepG2. O estudo demonstrou que não houve alteração significativa da viabilidade celular em todas as culturas celulares testadas (AMORIM *et al.*, 2017).

Com base nestes estudos preliminares, o IQG-607 demonstrou não necessitar da ativação da *KatG* e, desta forma, apresenta-se como um candidato promissor para o tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes do *M. tuberculosis* (BASSO *et al.*, 2010). Em pulmões e baço de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, resultou em baixa contagem de unidades formadoras de colônia. Além disso, o IQG-607 apresenta baixa toxicidade, que é um ponto bem vantajoso, considerando que o tratamento da TB é longo e utiliza-se uma série de outros fármacos. Pesquisas para a determinação dos metabólitos ativos do IQG-607 que atuam sobre a *InhA* e a determinação de seus efeitos hepatotóxicos, comparativamente a INH, são perspectivas para torná-lo um candidato a quimioterápico no tratamento da TB (ABBADI *et al.*, 2018a).

Além das pesquisas contra o *M. tuberculosis*, o IQG-607 também se mostrou um agente eficaz frente à *Leishmania braziliensis*, tanto para formas promastigotas (forma extracelular) quanto para as amastigotas (forma intracelular). Neste sentido, O IQG-607 poderia ser usado como ponto de partida para o desenvolvimento de um novo fármaco para a Leishmaniose, uma doença negligenciada, que ainda possui poucas moléculas ativas para seu controle e exige administração pela via parenteral (AMORIM *et al.*, 2017).

Apesar do seu potencial promissor no tratamento das cepas resistentes do *M. tuberculosis*, Dadda *et al* (2018) observou baixa biodisponibilidade oral para o IQG-607 (250 mg/Kg), com valores de 3,7 e 3,8% em jejum e estado alimentado, respectivamente. A baixa biodisponibilidade pode estar associada a fatores tais como a baixa permeabilidade gastrointestinal, significativo metabolismo hepático de primeira passagem, distribuição e biotransformação que limitam a dose adequada no tecido-alvo bem como a existência de bombas efluxadoras na mucosa (ABBADI *et al.*, 2018a). Desta forma, a investigação de rotas alternativas à via oral para administração de IQG-607 é de grande relevância, pois além da possibilidade de proporcionar menor toxicidade (< dose), problemas de resistência microbiana também poderão ser superados.

O azul da Prússia (PB), outro composto inorgânico, amplamente utilizado como pigmento, teve sua propriedade eletroquímica relatada em 1978 e desde então, inúmeros estudos e aplicações vem sendo investigadas (LI *et al.*, 2019; LIAN *et al.*, 2012; QIN; LI; GU, 2018; YANG *et al.*, 2019). O PB, também conhecido como hexacianoferrato férrico, apresenta fórmula molecular $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$, é termodinamicamente estável, apresenta excelente biocompatibilidade e é aprovado pelo FDA para tratamento interno de contaminação radioativa

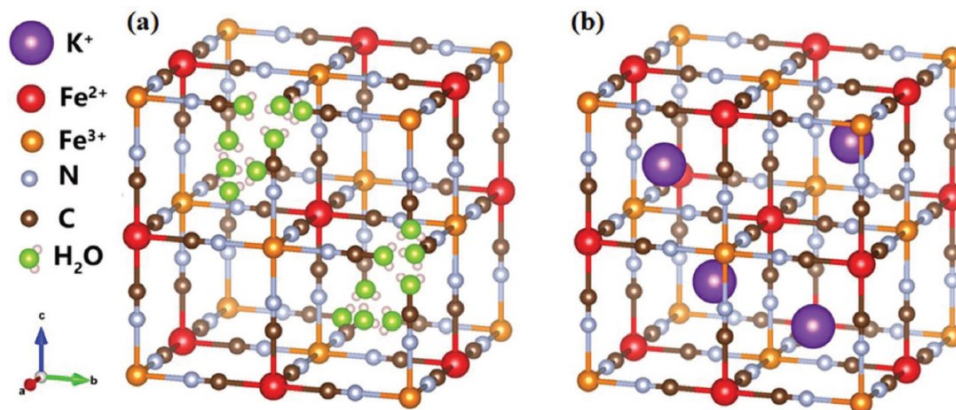
por céσιο e tálio (SANDAL *et al.*, 2017). Foi utilizado no Brasil, durante o incidente de Goiânia, onde 104 indivíduos mostraram evidências de contaminação interna com radiocésio.

O PB forma uma unidade cúbica, onde os íons férricos estão conectados ao nitrogênio de cianetos e os íons ferrosos são ligados aos átomos de carbono de cianetos, formando uma estrutura alternadamente coordenada (Figura 13) (KONG *et al.*, 2015). Pode apresentar duas formas cristalinas que são diferenciadas quanto a solubilidade. A forma insolúvel $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ é preparada misturando-se água e soluções de Fe^{III} com íons $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_4$, formando uma estrutura que apresenta moléculas de água intersticiais e que podem resultar em alguns defeitos estruturais. A forma solúvel $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ tipicamente apresenta íons de metais alcalinos (por exemplo, Na^+ e K^+) para equilibrar a carga da estrutura (QIN; LI; GU, 2018; ZAKARIA; CHIKYOW, 2017).

Devido às falhas estruturais, apresenta uma estrutura porosa, com alguns espaços intersticiais e lacunas onde contra-cátions, moléculas pequenas (KONG *et al.*, 2015) e gases podem ser intercalados (QIN; LI; GU, 2018; ZAKARIA; CHIKYOW, 2017). Desta forma, o PB pode ser considerado uma “esponja química” com ampla aplicação, como na limpeza ambiental, no armazenamento de gases, em baterias, catálise e liberação de fármacos (ZAKARIA; CHIKYOW, 2017).

Para fármacos, o PB pode ser útil para driblar certas características dos fármacos como baixa solubilidade, especificidade insuficiente do local alvo e toxicidade sistêmica. Também vem sendo investigado para proporcionar uma liberação sustentada de fármacos, como antídoto, agente de contraste, conversor fototérmico, ou ainda, para o preparo de nanoenzimas na área biomédica (QIN, LI, GU, 2018).

Figura 13. Estrutura do azul da Prússia (a) insolúvel e (b) solúvel.



Fonte: Qin *et al.* (2018).

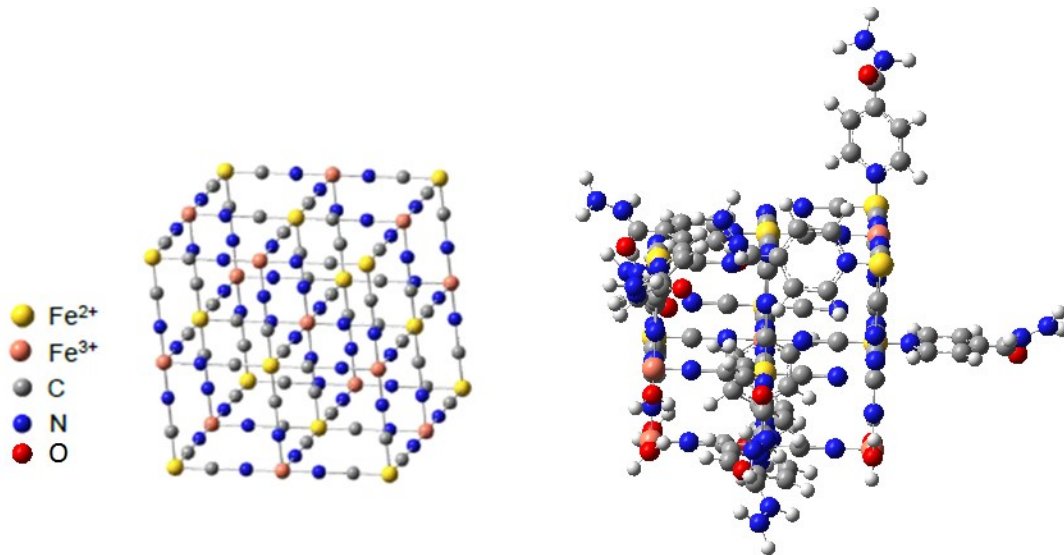
Nanopartículas de azul da Prússia vem sendo investigadas como sistemas de administração de fármacos já que apresentam estabilidade no sangue, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa citotoxicidade e custo, fácil preparo, morfologia ajustável e tamanho controlável. Estas características podem otimizar a entrega de diferentes fármacos, além de alta eficiência no transporte e especificidade do alvo. Outra forma de melhorar a capacidade de carga de fármacos pelas nanopartículas de PB é modificar sua superfície com materiais orgânicos ou inorgânicos e outras estruturas metal-orgânicas. A estrutura do PB envolvida por polímeros tais como a quitosana, polietilenimina, ácido oxálico e poli(cloreto de dialildimetilamônio), entre outros, pode diminuir a energia de superfície, inibir a aglomeração e aumentar a solubilidade das nanopartículas. A combinação com polímeros possibilita ainda uma maior interação fármaco/polímero, aumentando a eficiência de encapsulação (QIN, LI, GU, 2018).

Por apresentar absorção em torno de 700 nm, o PB é considerado um novo candidato a agente de ablação fototérmica para tratamentos de câncer, pois a irradiação próxima a luz infravermelho (faixa de 700 a 1100 nm), utilizada nestes casos, possui uma penetração mais profunda, menos energética e absorção mínima em tecidos biológicos. Assim, danos às células de tecidos saudáveis seriam minimizados (XUE *et al.*, 2015).

Yang e colaboradores (2019) prepararam nanopartículas de PB com microporos carregados com doxorubicina (quimioterápico) e indocianina verde (utilizada em diagnóstico de câncer) a fim de realizar uma combinação de quimioterapia e terapias fotodinâmicas e fototérmicas ativadas por irradiação com laser no NIR. Em estudos *in vitro*, a cisplatina também foi transportada com êxito por nanopartículas microporosas de PB para entrega em células cancerígenas (LIAN *et al.*, 2012). Li e colaboradores (2019), por sua vez, combinaram PB com zinco (ZnPB) a fim de tratar *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. O efeito fototérmico acelerou a liberação e penetração do Zn nas bactérias, acelerando a mortalidade das mesmas. Além disto, o tratamento com ZnPB levou à regulação positiva de genes envolvidos na remodelação do tecido, contribuindo para a deposição de colágeno e o reparo tecidual.

Neste estudo, preparou-se um complexo de azul da Prússia com isoniazida (Figura 14), formando um derivado insolúvel em água, porém, solúvel em meio levemente alcalino (tampão fosfato PBS pH 7,4). O intuito foi avaliar uma nova estrutura metálica complexada com isoniazida como forma de melhorar o transporte e liberação deste fármaco, assim como driblar o mecanismo de ativação enzimática mediada pela *KatG*, já que a mutação nesta enzima representa o maior número de casos resistência à INH.

Figura 14. Estruturas do azul da Prússia (esquerda) e do derivado do azul da Prússia complexado com isoniazida (direita).



Fonte: elaborado pela autora.

REFERÊNCIAS

- ABBADI, Bruno L. *et al.* Is IQG-607 a potential metallodrug or metallopro-drug with a defined molecular target in *Mycobacterium tuberculosis*? **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. MAI, p. 1–21, 2018 a.
- ABBADI, Bruno L. *et al.* Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 62, n. 2, 2018 b.
- AKOLO, Christopher *et al.* Debunking the myths perpetuating low implementation of isoniazid preventive therapy amongst human immunodeficiency virus-infected persons. **World Journal of Virology**, United States, v. 4, n. 2, p. 105–112, 2015.
- AMORIM, Camila F. *et al.* Inhibitory activity of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), IQG-607, against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*. **PloS one**, United States, v. 12, n. 12, p. e0190294, 2017.
- ARBEX, Marcos Abdo *et al.* Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. **Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 641–56, 2010.
- BASSO, Luiz 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 1384–1389, 2010.
- BECKER, C. *et al.* Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: isoniazid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, United States, v. 96, n. 3, p. 522–531, 2007.
- BHAIRI, Srirama M. *et al.* **Detergents a guide to the properties and uses of detergents in biological systems**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/1/content/commerce/pdfs/detergents/detergents-guide-mk.pdf. Acessado em: 16 jan. 2020
- BOBADE, Nishan N. *et al.* A review on buccal drug delivery system. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 35–40, 2013.
- BOMBARDA, S. *et al.* Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 27, n. 6, nov/dez. , 2001.
- BRASIL. **Protocolo de vigilância da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. *E-book*. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/protocolo_vigilancia_infeccao_latente_mycobacterium_tuberculosis_brasil.pdf Acessado em: 19 dez. 2019.
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico 09. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**. Brasília . *E-book*. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>. Acessado em: 19 dez. 2019.

BRASIL. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019 b. *E-book*. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf. Acessado em: 20 dez. 2019.

CAON, Thiago *et al.* Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 1–21, 2015.

CAON, Thiago; SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. Effect of freezing and type of mucosa on *ex vivo* drug permeability parameters. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 587–592, 2011.

CHEN, Q.; CHEN, W.; HAO, F. Cutaneous Tuberculosis: A Great Imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 37, p. 192–199, 2019.

COCA, M. N. S. S. M. **Hepatotoxicidade ao esquema rifampicina, isoniazida e pirazinamida no tratamento da tuberculose em pacientes com e sem a síndrome da imunodeficiência humana adquirida**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ECJS-7WYFYK/1/maria_nat_lia_coca.pdf. Acessado em: 17 dez. 2019.

DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Edgard Blucher, 2011.

DASH, Mamoni *et al.* Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 36, p. 981–1014, 2011.

DEEMAGARN, Taweewat *et al.* Structural characterization of the Ser324Thr variant of the catalase-peroxidase (KatG) from *Burkholderia pseudomallei*. **Journal of Molecular Biology**, England, v. 345, n. 1, p. 21–28, 2005.

DENEER, V. H. M. *et al.* Buccal transport of flecainide and sotalol: effect of a bile salt and ionization state. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 241, n. 1, p. 127–134, 2002.

DHIMAN, Munish Kumar; DHIMAN, Anupama; SAWANT, Krutika K. Transbuccal delivery of 5-fluorouracil: permeation enhancement and pharmacokinetic study. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 258–265, 2009.

DIAS, Maria Fernanda Reis Gavazzoni *et al.* Update on cutaneous tuberculosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.89, n.6, p.925-938, 2014.

DOGRA, S. S.; CHANDER, B.; KRISHNA, M. Tuberculosis of oral cavity: a series of one primary and three secondary cases. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 275–279, 2013.

DONALD, P. R; MCILLERON, H. Antituberculosis drugs. *In*: ZUMLA, H. *et al.* (org.). **Tuberculosis**. [S. l.]: Saunders Elsevier, 2009. p. 608–617.

FRANZ-MONTAN, Michelle *et al.* Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 81, p. 52–59, 2016.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 190-5, 1975.

GANEM-QUINTANAR, A. *et al.* Mechanisms of oral permeation enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 156, n. 2, p. 127–142, 1997.

GORDON, G. S. *et al.* Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 82, n. 21, p. 7419–7423, 1985.

HAMMOUDA, Boualem. Temperature effect on the nanostructure of SDS micelles in water. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, [S. l.], v. 118, p. 151–167, 2013.

HANSEN, Stine Egebro *et al.* Buccal delivery of small molecules – Impact of levulinic acid, oleic acid, sodium dodecyl sulfate and hypotonicity on *ex vivo* permeability and spatial distribution in mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 133, n. August, p. 250–257, 2018.

HASSAN, Nisreen *et al.* Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 97–112, 2010.

HILAL-DANDAN, Randa; BRUNTON, Laurence L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. *E-book*. Disponível em:

[https://books.google.com.br/books?id=ofidBgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Manual+de+Farmacologia+e+Terapêutica+de+Goodman+%26+Gilman&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwj6w-vBirbnAhU-D7kGHT_FC4AQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman %26](https://books.google.com.br/books?id=ofidBgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Manual+de+Farmacologia+e+Terapêutica+de+Goodman+%26+Gilman&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwj6w-vBirbnAhU-D7kGHT_FC4AQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Manual+de+Farmacologia+e+Terapêutica+de+Goodman+%26). Acessado em: 18 dez. 2019.

HOOGSTRAATE, A. J. *et al.* Effects of bile salts on transport rates and routes of FITC-labelled compounds across porcine buccal epithelium *in vitro*. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 211–221, 1996.

HU, Liming; SUN, Yun; WU, Yan. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. **Nanoscale**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 3103–3111, 2013.

JANET HOOGSTRAATE, A.; BODDÉ, Harry E. Methods for assessing the buccal mucosa as a route of drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 1–2, p. 99–125, 1993.

JIMÉNEZ-CASTELLANOS, Ma Rosa; ZIA, Hussein; RHODES, C. T. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 19, n. 1–2, p. 143–194, 1993.

JUNG, Ho Yeon *et al.* Prevalence and clinical features of drug reactions with eosinophilia and systemic symptoms syndrome caused by antituberculosis drugs: A retrospective cohort study. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 90–103, 2019.

KAKISI, Ourania K. *et al.* Tuberculosis of the oral cavity: a systematic review. **European Journal of Oral Sciences**, [S. l.], v. 118, n. 2, p. 103–109, 2010.

KASHUBA, A. D. *et al.* Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, United States, v. 63, n. 5, p. 540–551, 1998.

KASPER, L. D.; FAUCI, S. A. **Doenças infecciosas de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

KHAN, Mohammad F. *et al.* Theoretically guided analytical method development and validation for the estimation of rifampicin in a mixture of isoniazid and pyrazinamide by UV spectrophotometer. **Frontiers in Chemistry**, Switzerland, v. 5, p. 27, 2017.

KONG, Biao *et al.* New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 44, n. 22, p. 7997–8018, 2015.

KULKARNI, Upendra *et al.* Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: effect of biological and experimental variables. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 99, p. 1265–1277, 2010.

LABORDE, Julie *et al.* Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 179, p. 71–81, 2018.

LEE, Vincent H. L. Protease inhibitors and penetration enhancers as approaches to modify peptide absorption. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 213–223, 1990.

LI, Jun *et al.* Zinc-doped Prussian blue enhances photothermal clearance of *Staphylococcus aureus* and promotes tissue repair in infected wounds. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019.

LIAN, Hong Yuan *et al.* Highly biocompatible, hollow coordination polymer nanoparticles as cisplatin carriers for efficient intracellular drug delivery. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 48, n. 42, p. 5151–5153, 2012.

LIPS, A. *et al.* Role of surfactant micelle charge in protein denaturation and surfactant-induced skin irritation. *In*: RHEIH, Linda D. *et al.* (org.). **Surfactants in personal care**

products and decorative cosmetics. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 184–194.

MAHALINGAM, Ravichandran *et al.* Transbuccal delivery of 5-aza-2 -deoxycytidine: effects of drug concentration, buffer solution, and bile salts on permeation. **AAPS PharmSciTech**, United States, v. 8, n. 3, p. E55, 2007.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. **American Review of Tuberculosis**, United States, v. 65, n. 6, p. 765–767, 1952.

MOGHIMIPOUR, Eskandar; AMERI, Abdulghani; HANDALI, Somayeh. Absorption-enhancing effects of bile salts. **Molecules**, [*S. l.*], v. 20, n. 8, p. 14451–14473, 2015.

MORALES, Javier O.; MCCONVILLE, Jason T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.

MORRIS, Stephanie A. V. *et al.* Mechanisms of anionic surfactant penetration into human skin: Investigating monomer, micelle and submicellar aggregate penetration theories. **International Journal of Cosmetic Science**, [*S. l.*], v. 41, n. 1, p. 55–66, 2019.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, Nazma. Chiosan-modifications and applications: opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, [*S. l.*], v. 68, p. 1031–1051, 2008.

MUKHERJEE, Bedachhanda *et al.* Micellization and adsorption behaviour of bile salt systems. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 1769–1781, 2016.

NAIK, Radhey M. *et al.* Ligand substitution kinetic assay of antitubercular drug isoniazid in pure and pharmaceutical formulations. **Microchemical Journal**, [*S. l.*], v. 111, p. 108–115, 2013.

NEMES, Roxana Maria *et al.* Tuberculosis of the oral cavity. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Romania, v. 56, n. 2, p. 521–525, 2015.

NETZ, Paulo A.; ORTEGA, George Gonzales. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

NICOLAZZO, Joseph A.; REED, Barry L.; FINNIN, Barrie C. Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 93, n. 2, p. 431–440, 2004.

NICOLAZZO, Joseph A.; REED, Barry L.; FINNIN, Barrie C. Buccal penetration enhancers - How do they really work? **Journal of Controlled Release**, [*S. l.*], v. 105, n. 1–2, p. 1–15, 2005.

NIELSEN, H. M.; RASSING, M. R. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: III. Permeability enhancement by different pH values, different osmolality values, and bile salts. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 185, n. 2, p. 215–225, 1999.

- OLIVEIRA, Jaim *et al.* Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 12, n. 19, p. 2409–2424, 2006.
- OLIVEIRA, Jaim 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*. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 312–313, 2004.
- PATEL, D. A. *et al.* Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **International Journal of Drug Development and Research**, [S. l.], v. 4, p. 99–116, 2012.
- PATIL, Sanjay; SAWANT, Krutika. Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery. **Current Drug Delivery**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 312–318, 2008.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, Martín *et al.* A Comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements. **Langmuir**, [S. l.], v. 14, n. 16, p. 4422–4426, 1998.
- PERMEGEAR. Hellertown, 2019. Parts of a Franz cell. Disponível em: <https://permegear.com/parts-of-a-franz-cell/>. Acessado em: 20 jan. 2020.
- PERWITASARI, J. A.; WILFFERT, B. Pharmacogenetics of isoniazid-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism Reviews**, [S. l.], v. 47, p. 222–28, 2015.
- QIN, Zhiguo; LI, Yan; GU, Ning. Progress in applications of Prussian blue nanoparticles in biomedicine. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 7, n. 20, p. 1–13, 2018.
- RABAHI, M. F. *et al.* Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 472–486, 2017.
- RAMACHANDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Tuberculosis. In: PADMANABHAN, S. (org.). **Handbook of pharmacogenomics and estratified medicine**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 835–857.
- RAMACHANDRAN, Geetha; SWAMINATHAN, Soumya. Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, New Zealand, v. 5, p. 89–98, 2012.
- RAMBHAROSE, Sanjeev *et al.* High-energy ball milling of saquinavir increases permeability across the buccal mucosa. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, England, v. 40, n. 5, p. 639–648, 2014.
- RATHBONE, Michael J.; DRUMMOND, Bernadette K.; TUCKER, Ian G. The oral cavity as a site for systemic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–22, 1994.
- RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. *et al.* Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **International Journal of**

Antimicrobial Agents, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 182–185, 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. *et al.* Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: an essential step towards phase I clinical trial. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 90, p. 78–86, 2017.

ROSA, J. **Modulação da solubilidade e permeação cutânea da isoniazida através da cocristalização com coformadores “inteligentes”**. 2018. Dissertação (mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

ROUT, Purnendu *et al.* Prevalence of oral lesions in tuberculosis: a cross sectional study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, India, v. 8, n. 12, p. 3821–3825, 2019.

SANDAL, Nidhi *et al.* Preparation, characterization, and *in vivo* pharmacoscintigraphy evaluation of an intestinal release delivery system of Prussian blue for decorporation of cesium and thallium. **Journal of Drug Delivery**, [S. l.], v. 2017, p. 1–9, 2017.

SCHROEDER, E. K. *et al.* Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Netherlands, v. 3, n. 3, p. 197–225, 2002.

SEIFERT, Marva *et al.* Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. **Plos One**, United States, v. 10, n. 3, p. e0119628, 2015.

SENEL, S. *et al.* *In vitro* studies on enhancing effect of sodium glycocholate on transbuccal permeation of morphine hydrochloride. **Journal of Controlled Release**, Netherlands, v. 51, n. 2–3, p. 107–113, 1998.

ŞENEL, Sevda; HINCAL, A. Atilla. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 72, n. 1–3, p. 133–144, 2001.

SHARMA, S.; KULKARNI, J.; PAWAR, A. P. Permeation enhancers in the transmucosal delivery of macromolecules. **Pharmazie**, [S. l.], v. 61, n. 6, p. 495–504, 2006.

SHINKAR, Dattatraya; DHAKE, Avinash; SETTY, Chitral. Drug delivery from the oral cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, [S. l.], v. 66, p. 466–500, 2012.

SINGH, Stuti Gupta *et al.* Buccal mucosa as a route for drug delivery: mechanism, design and evaluation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 358–372, 2011.

SINHA, V. R. *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 274, n. 1–2, p. 1–33, 2004.

SINHA, V. R.; PAL KAUR, M. Permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 1131–1140, 2000.

SMALL, Donald M. Size and structure of bile salt micelles. *In: Molecular Association in Biological and Related Systems*. [S. l.]: American Chemical Society, 1968. (Advances in Chemistry).v. 84p. 4–31.

SMART, John D. Buccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 507–517, 2005.

SOHI, Harmik *et al.* Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 254–282, 2010.

SOUSA, Eduardo Henrique Silva *et al.* [Fe(CN)₅(isoniazid)]₃ -: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 140, p. 236–244, 2014.

SUDHAKAR, Yajaman; KUOTSU, Ketousetuo; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 114, n. 1, p. 15–40, 2006.

TIMMINS, Graham S.; DERETIC, Vojo. Mechanisms of action of isoniazid. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 1220–1227, 2006.

TOSTMANN, Alma *et al.* Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Australia, v. 23, n. 2, p. 192–202, 2008.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VEUILLEZ, F. *et al.* Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 93–109, 2001.

VILCHEZE, Catherine; JACOBS, William R. Jr. The isoniazid paradigm of killing, resistance and persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, England, v. 431, n. 18, p. 3450–3461, 2019.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**. Geneva: World Health Organization, 2019. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em: 04 fev. 2020.

WHO. **Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate-release, solid oral dosage forms**. Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19640en/s19640en.pdf>. Acessado em: 07 jan. 2020.

WHO. **WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis**. Geneva: World Health

Organization, 2018. *E-book*. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260494/9789241550079-eng.pdf;jsessionid=0C8B112AEA3DEC3780E7469A3C259E4B?sequence=1>. Acessado em: 07 jan. 2020.

XIANG, Jun; FANG, Xiaoling; LI, Xiaoling. Transbuccal delivery of 2',3'-dideoxycytidine: In vitro permeation study and histological investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 231, n. 1, p. 57–66, 2002.

YANG, Ruihao *et al.* Indocyanine green-modified hollow mesoporous Prussian blue nanoparticles loading doxorubicin for fluorescence-guided tri-modal combination therapy of cancer. **Nanoscale**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 5717–5731, 2019.

ZAKARIA, Mohamed B.; CHIKYOW, Toyohiro. Recent advances in Prussian blue and Prussian blue analogues: synthesis and thermal treatments. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 352, p. 328–345, 2017.

ZHANG, Y.; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, France, v. 13, n. 11, p. 1320–1330, 2009.

3 CAPÍTULO I: ARTIGO SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO

A administração oral da isoniazida (INH), um dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, pode levar à descontinuação do tratamento devido a eventos de hepatotoxicidade. Neste sentido, a via transbucal tem sido aqui proposta, de forma inédita, para a administração da INH já que é altamente permeável e evita o metabolismo de primeira passagem. Este capítulo avaliou a permeabilidade da isoniazida isolada e em combinação com diferentes promotores químicos de permeabilidade (dodecil sulfato de sódio, taurocolato de sódio e quitosana) considerando a mucosa bucal suína fresca como modelo de membrana. Além disso, este estudo avaliou o mecanismo de promoção da absorção dos promotores selecionados através de análises de mobilidade eletroforética, espalhamento de luz dinâmico, viscosidade e técnicas espectroscópicas. O produto deste capítulo é um artigo científico, que será submetido para apreciação no *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

**TRANSBUCCAL DELIVERY OF THE ISONIAZID: *EX VIVO* PERMEABILITY
AND EFFECTS OF MICELAR ABSORPTION ENHANCERS**

Roselene Kroth¹, Julia Conte¹, Debora Fretes Argenta¹, Beatriz Ribeiro do Amaral¹,
Thiago Caon¹

¹Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Thiago Caon
Email: thiagocaon@gmail.com

ABSTRACT

Considering that the oral administration of isoniazid (INH) may lead to tuberculosis treatment discontinuation due to hepatotoxicity events, the buccal delivery of this drug was purposed as an alternative administration route. *Ex vivo* permeability assays were performed in Franz diffusion chambers, applying INH alone and in combination with sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium taurocholate (ST) and chitosan (CS). After confirming the formation of micelle structures by dynamic light scattering analysis, UV-visible spectroscopy and zeta potential analyses were used to investigate chemical drug-micelle interactions. Although the presence of drug has reduced the zeta potential of SDS at pH 2.0, this same behavior was not observed at pH 6.8 (saliva buffer) for both surfactants. Spectrophotometric analyses, in turn, indicated chemical interactions between INH and SDS in both pH values (2.0 and 6.8) whereas no interaction between the drug and ST was observed. Despite the chemical interaction between these agents, SDS increased the buccal transport rate of INH by approximately 11 times when compared to the control. In contrast, ST and CS did not increase the permeability of INH. The INH retention in SDS-treated mucosa was significantly higher when compared to the control and an effect on intercellular lipids was suggested.

Keywords: buccal permeability; isoniazid; absorption enhancers; surfactants, micelle structures.

1 INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is one of the top 10 causes of death globally and is the leading cause of death from a single infectious disease agent [1]. In 2017, TB caused an estimated 1.3 million deaths among HIV-negative individuals and there were an additional 300,000 deaths from TB among HIV-positive individuals [2]. Most of these deaths could be averted with earlier diagnosis and treatment. Currently, patients presenting uncomplicated TB are treated considering a 6-month regimen, i.e., 2 months of daily isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol followed by 4 months of daily isoniazid and rifampicin therapy [3].

Although new drugs are being developed to face the challenge of emerging multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, INH remains as a widely used and effective first-line agent. In addition to its high bactericidal potency, INH administered orally is almost completely absorbed from the gastrointestinal tract and penetrates all body fluid cavities. The drug levels achieved in these regions are similar to serum levels [4]. INH acts by inhibiting the synthesis of mycolic acids, essential constituents of mycobacterial cell walls [5]. Despite its high efficacy and appropriate pharmacokinetic properties, the incidence of hepatotoxicity varies from 2 to 28% in INH-treated patients. This event has been related to the slow clearance of acetyl hydrazine, a toxic metabolite of INH, which have been particularly identified in slow acetylators [6]. If abnormalities of liver function exceed three to five times the upper limit of normal, discontinuation of INH is recommended. Moreover, gastrointestinal effects such as nausea, vomiting, and abdominal pain are observed in 50 to 75% of patients with severe illness [7]. Taken together, these disadvantages encourage the investigation of alternative routes to administer this drug in order to reduce both toxic effects and first-pass metabolism.

The absorption of this drug in a porcine skin model has already been investigated by our research team [8]. In this new study, the buccal delivery of INH is proposed. Unlike the skin, the buccal mucosa is generally more permeable due to the absence of the stratum corneum [9] and buccal formulations are usually cheaper than transdermal devices. The buccal delivery provides direct access to the systemic circulation through the internal jugular vein, reducing or even avoiding the extensive first-pass metabolism [10] and gastrointestinal complications.

Although the buccal mucosa is more permeable than the skin, the outermost layer, the epithelium, represents a significant barrier to permeability [11]. As a consequence, the inclusion of absorption enhancers in buccal formulations may be required to achieve drug therapeutic

concentrations. Basically, transcellular and paracellular routes are involved in the transport of drugs through buccal mucosa [12]. Given the hydrophilic nature of INH ($\log P = -0.64$) and that the passive transcellular pathway is still by far the most important absorption pathway, absorption enhancers able to affect this route were considered.

Once the surfactants and bile salts have been shown to improve the buccal permeability of hydrophilic compounds [13] and are able to extract buccal epithelium lipids [14], these agents were selected for this study (Figure 1). Bile salts can act by extraction of lipids and proteins of the epithelium, membrane fluidization and reverse micellization in the membrane, creating aqueous channels for drug transport [15]. Sodium dodecyl sulfate (SDS), in turn, has been used as permeability enhancer to improve absorption of drugs across buccal mucosa in various studies [13,16,17]. The permeability enhancer effect of the SDS has been attributed to its hydrophobic region, which may interact with the epithelium lipids, whereas the sulfate group (hydrophilic part) of the SDS can form a complex with water, increasing the tissue hydration [16].

Chitosan was also considered given that it can interact electrostatically with mucin, removing proteins from the interface. Consequently, increased buccal permeability is observed. The tendency of chitosan to form complexes with mucin and other proteins seems to surpass its ability of binding to membranes [18].

The effect of SDS, sodium taurocholate (a bile salt) and chitosan on the buccal permeability of INH was evaluated in this study. *Ex vivo* drug transport studies were initially performed in Franz-diffusion cells, using porcine mucosa as the membrane model. Concomitantly, possible interactions between INH and permeation enhancers were investigated by UV-VIS absorption spectroscopy and zeta potential analysis. This approach was performed in order to obtain a better understanding of the impact of the chemical enhancers on the INH absorption across buccal mucosa.

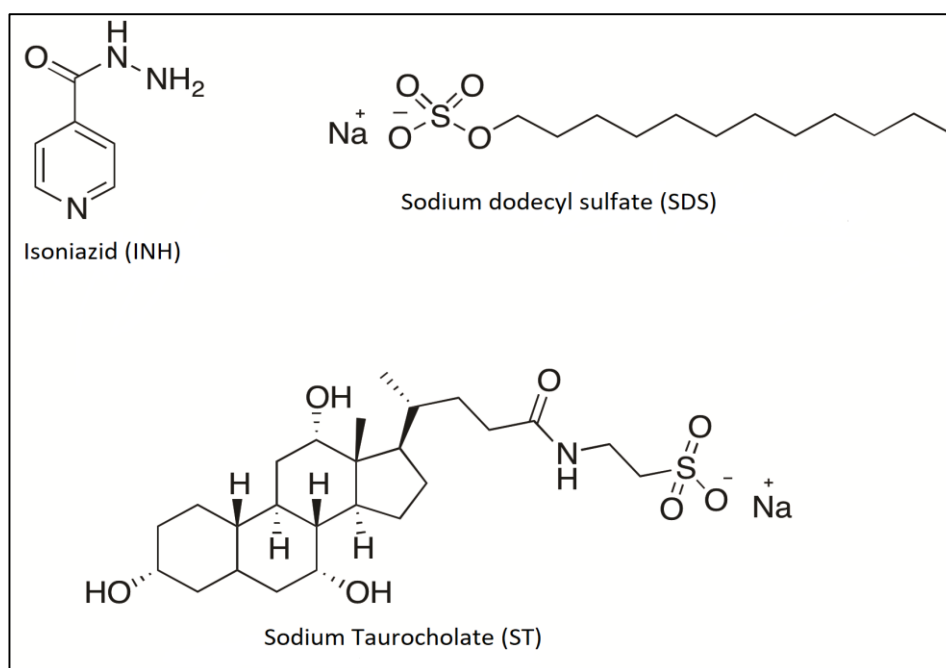


Figure 1. Chemical structures of the isoniazid and surfactants used in this study.

2. MATERIALS & METHODS

2.1 Materials

Isoniazid, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium taurocholate (ST) and medium-molecular weight chitosan (CS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Both Krebs bicarbonate Ringer (KBR) and phosphate (PBS) buffers were prepared according to standardized protocols. The simulated saliva buffer was prepared by dissolving 2.38 g Na₂HPO₄, 0.19 g KH₂PO₄, and 8.00 g NaCl in 1 L of distilled water (adjusted to pH 6.8 with phosphoric acid) [19]. Acetonitrile and methanol were of HPLC grade and all other chemicals and reagents were of analytical grade and used as received. Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, Massachusetts).

2.2 Tissue preparation and transport studies

Once the porcine buccal mucosa resembles human buccal mucosa in structure and permeability [20], it was selected for the *ex vivo* transport studies. Porcine buccal tissue was obtained from a local abattoir immediately after slaughter and transported in ice-cold Krebs–Ringer buffer (pH 7.4). This buffer was selected since it is able to preserve tissue integrity [21]. Within 2 h of slaughter, the buccal mucosa was carefully separated from fat and muscles using a scalpel and surgical scissors. The separated tissue (+/- 1 mm in thickness) was kept in ice-

cold KBR until being placed in Franz diffusion cells (diffusional area 1.77 cm²). These mucosae were mounted at the interface of the donor and receiver chamber with the buccal epithelium facing upwards and equilibrated with Krebs-Ringer buffer during 30 min. After this equilibration period, the buffer was removed, and 10 mL of saliva buffer was added to the receptor chamber. Once the isoniazid presents a high aqueous solubility, the sink condition was maintained without the inclusion of solubilizing agents. In the donor phase, 1 mL of each absorption enhancer solution (SDS 35 mM, ST 10 mM or CS 0.5% in saliva buffer) or saliva buffer was initially added and then more 1 mL of INH at 5 mg mL⁻¹ (final concentration equal to 2.5 mg mL⁻¹). The SDS concentration (35 mM or 1% w/V) was defined based on other transbuccal permeability studies [17, 22]. All solutions were solubilized in saliva buffer. The system was kept at 37 °C by circulating heated water through an external water jacket and the solution in the receptor chamber was continuously stirred at 750 rpm using Teflon[®] coated magnetic stirrers. At fixed time intervals (every 1 h, for 10 h), samples (400 µL) were withdrawn from the receptor chamber, replaced by the same volume of fresh medium and quantified by a previously validated HPLC method (see the section below). At the end of the permeation assays, the amount of INH retained in the buccal mucosa was also investigated. Mucosae were placed into separate pre-weighed tubes to determine the amount of INH in each tissue sample collected. The drug was extracted from the tissues with a solution 1:2 of water/acetonitrile, followed by overnight storage to increase the extraction efficiency. In the next day, the tissues were vortexed for 10 min, sonicated for 15 min, and the supernatant was analyzed by HPLC. The extraction method was previously validated in blank experiments and by spiking the mucosae with a known amount of INH. The steady-state permeability flux (J_{ss}) was determined from the linear slope of the cumulative amount of INH absorbed vs. time curve. The apparent permeability coefficient (P_{app}) of INH was then determined by dividing J_{ss} by the initial donor chamber concentration, and P_{app} values from different treatments were compared using a one-way analysis of variance followed by a Tukey's post-hoc test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 5; GraphPad, San Diego, California).

2.3 Apparatus and chromatographic conditions

INH quantification was performed by high efficiency liquid chromatography (HPLC) based on a previously validated method [8]. The HPLC apparatus consisted of a PerkinElmer[®] series 200 system equipped with a binary pump, autoinjector, vacuum degasser and a visible-ultraviolet detector. A C18 analytical column (250 × 4.6 mm, 5.0 µm internal diameter) was

used preceded by a guard column of the same packing material (Phenomenex® KJ0-4282). Isocratic mobile phase was composed by methanol-ammonium acetate buffer, pH 6.8 (5:95 v/v) at a flow-rate of 1 mL min⁻¹, with volume injection of 20 µL and detection at 260 nm. The HPLC system was operated at ambient temperature. The method was specific and linear in the range of 0.6 to 100 µg mL⁻¹ (r > 0.99). No interference biological matrix in the drug peak was observed.

2.4 Physicochemical analysis

2.4.1 Viscosity

The viscosity measurements were performed in saliva buffer and chitosan solution. The viscosity of the saliva solution was determined using a viscometer (Schott AVS 350) coupled to thermostatic bath (Schott CT 52). The measurements were carried out by adjusting the temperature to 37 °C. The following equation (Eq 1) was used to determine the kinematic viscosity:

$$\eta_{cin} = K \cdot (t - v) \quad (\text{Eq 1})$$

Where: η_{cin} : kinematic viscosity (mm² s⁻¹); K: capillary constant n° 50; t: average flow time; v: correction of kinetic energy.

The solution of 1% w/v chitosan was analyzed at 37 °C using a Brookfield DV-II + PRO viscometer with spindle SC4-34. A chart of viscosity values versus shear rate was obtained. All measurements were performed in triplicate.

2.4.2 Particle size and zeta potential analysis

The determination of particle size and zeta potential were performed by photon correlation spectroscopy (PCS) and electrophoretic mobility, respectively, using a Zetasizer® Nano-ZS 90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) at 25 °C and angle of the laser beam of 173°. Solutions of 35 mM SDS or 10 mM ST containing 2.5 mg mL⁻¹ of INH were analyzed at saliva buffer pH 6.8. Zeta potential measurements also were performed using Britton-Robinson buffer pH 2.0 for solutions containing SDS in order to confirm that this technique could be used to predict electrostatic interactions between micelle and drug at pH 6.8 (both drug and micelles can be found in a charged form at pH 2.0). The results were expressed as the mean of three determinations for samples prepared independently.

2.4.3 Spectrophotometric measurements

Absorption spectra were recorded with ultraviolet-visible (UV-VIS) spectrophotometer (Shimadzu UV-1800 UV-Vis, Kyoto, Japan) in the wavelength range of 400-200 nm. The analyses were performed with a fixed concentration of INH ($10 \mu\text{g m}^{-1}$), varying the concentrations of SDS (0.7; 5; 10; 20 and 35 mM at pH 2.0 or pH 6.8) and ST (0.5; 3; 10; 13 and 15mM at pH 6.8). Saliva buffer pH 6.8 and Britton-Robinson buffer pH 2.0 were used as dispersion medium in the analysis. All measurements were performed in triplicate.

3. RESULTS

3.1 Buccal permeability analysis

The simultaneous treatment of INH with 35 mM SDS, 10 mM ST or 0.5% chitosan resulted in different drug permeability profiles (Figures 2, 3 and 4). SDS provided a higher absorption of INH through the mucosa ($328.2 \pm 68.2 \mu\text{g cm}^{-2}$) compared to control ($33.4 \pm 20.9 \mu\text{g cm}^{-2}$), ST ($44.6 \pm 17.54 \mu\text{g cm}^{-2}$) and chitosan ($24.9 \pm 0.92 \mu\text{g cm}^{-2}$) after 10 h ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). SDS increased approximately 9.9-fold the permeated amount of INH when compared to the control (Figure 2). Moreover, INH was quantified earlier in the receptor chamber after the treatment with SDS than the other treatments (2 versus 4 h of kinetic).

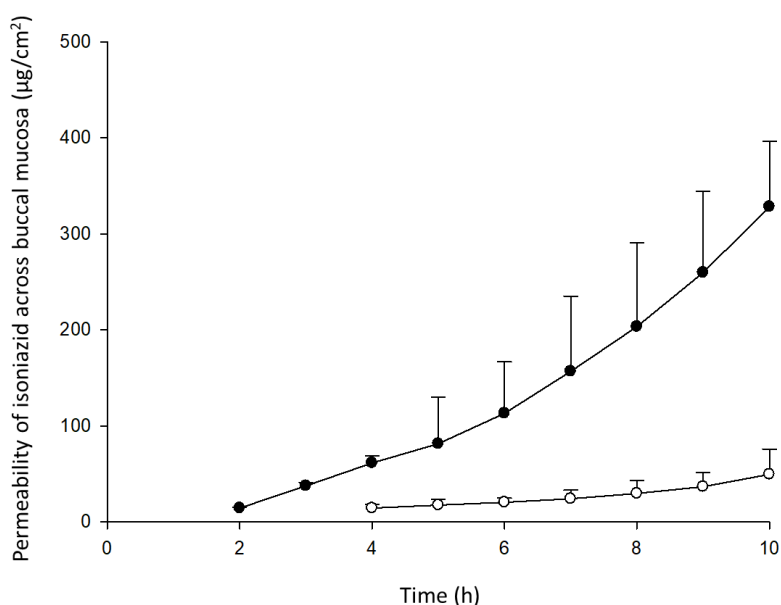


Figure 2. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL^{-1}) isolated (o) and treated with 35 mM SDS (●) through porcine buccal mucosa. Data are presented as mean \pm standard deviation ($n = 6$).

The amount of INH absorbed through mucosa after treatment with ST ($44.6 \pm 17.54 \mu\text{g cm}^{-2}$) was not statistically different ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test) from control ($33.4 \pm 20.9 \mu\text{g cm}^{-2}$) (Figure 3).

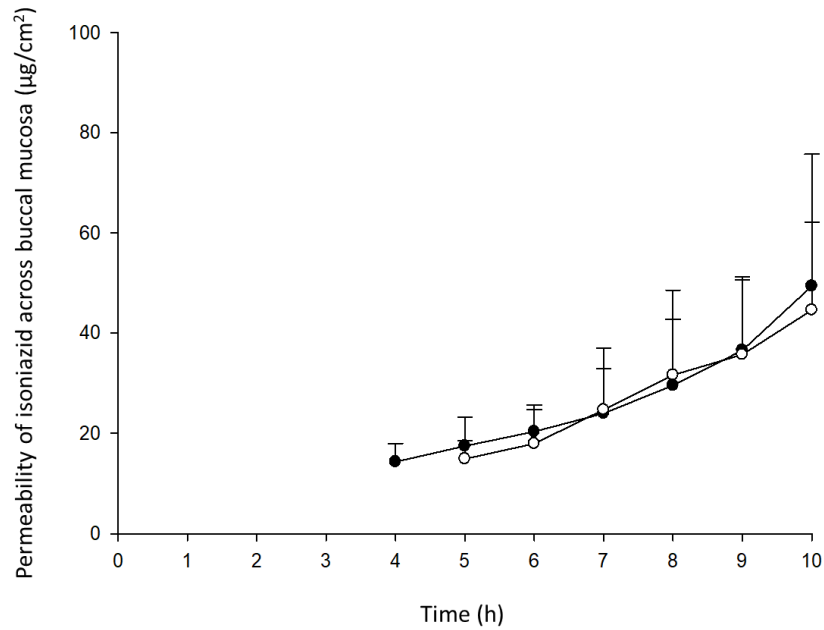


Figure 3. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL^{-1}) isolated (●) and treated with 10 mM ST (○) through the porcine buccal mucosa. Data are presented as mean \pm standard deviation ($n = 6$).

Although the amount of INH absorbed through mucosa after treatment with chitosan has been lower than control (24.9 ± 0.92 and $33.4 \pm 20.9 \mu\text{g cm}^{-2}$, respectively), this difference was not statistically different ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test; Figure 4).

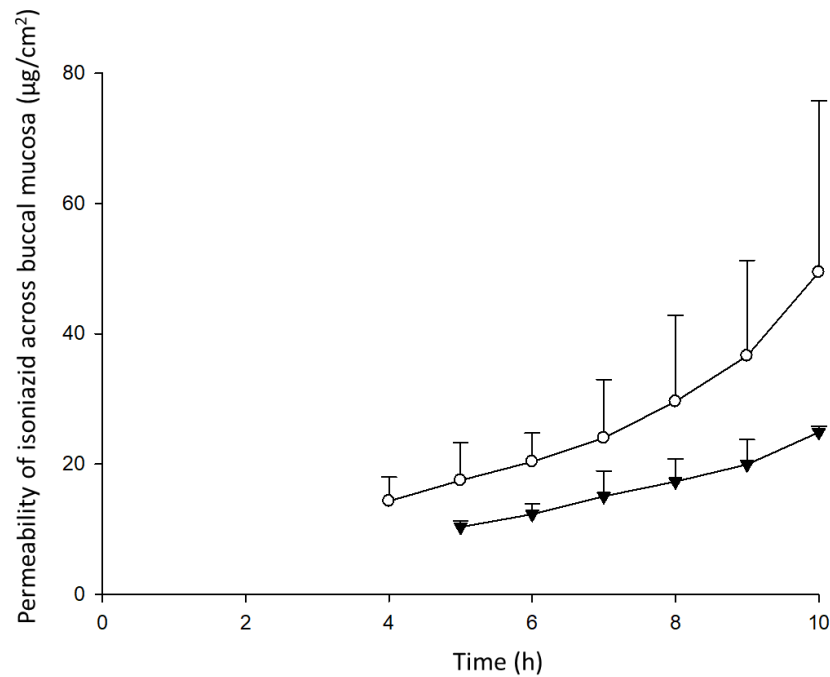


Figure 4. Permeation profile of INH solution (2.5 mg mL^{-1}) isolated (○) and treated with 0.5% (▼) CS through the porcine mucosa. Data are presented as mean \pm standard deviation ($n = 6$).

Consistently, the treatment with SDS resulted in higher values of steady-state flux and permeability coefficient (Table 1). The transport rate of INH increased to approximately 11-fold after SDS treatment. The higher flux of INH indicated an enhancement effect of SDS in facilitating the drug transport across buccal mucosa. The permeability coefficient of INH also was higher with SDS treatment, approximately 11-fold higher than control (similar to permeability flux considering that the drug concentration in the donor chamber was fixed for different treatments). On the other hand, ST and chitosan did not show statistical differences in transport rate and permeability coefficient values compared to control ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). Although the lag time values have ranged from 2.14-3.92 h, they were not statistically different between treatments with chemical enhancers ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). Lag time results indicated a short time taken for the tissue to become saturated, suggesting a fast onset INH therapeutic activity [23].

Table 1. Permeability parameters of isoniazid (INH) alone and combined with absorption enhancers.

Parameter	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	T_L (h)	P ($\text{cm}/\text{h} \times 10^{-3}$)
INH control	4.48 ± 0.31 ^(a)	2.14 ± 1.12 ^(a)	1.80 ± 0.69 ^(a)
INH + SDS 35 mM	49.16 ± 12.55 ^(b)	3.63 ± 1.44 ^(a)	19.70 ± 5.00 ^(b)
INH + ST 10 mM	6.43 ± 2.23 ^(a)	3.92 ± 1.23 ^(a)	2.60 ± 0.89 ^(a)
INH + chitosan 0.5%	3.42 ± 0.56 ^(a)	2.74 ± 1.26 ^(a)	1.40 ± 0.22 ^(a)

Data were plotted as mean \pm standard deviation. Treatments were compared by one-way ANOVA with Tukey's post-test ($n = 6$) (each parameter was analyzed separately). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Different letters indicate statistically significant differences between treatments. J_s = steady state flux; T_L = lag time; P = permeability coefficient.

INH retention results are in accordance with permeability profiles (Figure 5). The treatment with SDS provided a higher INH retention ($155 \pm 56.50 \mu\text{g cm}^{-2}$) than control ($54.32 \pm 27.39 \mu\text{g cm}^{-2}$), ST ($60.1 \pm 33.36 \mu\text{g cm}^{-2}$) and chitosan ($47.36 \pm 13.57 \mu\text{g cm}^{-2}$) after 10 h ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). In other words, SDS promoted drug retention 2.85-fold higher than control. The amount of drug retained after application of ST, chitosan or control solution was not statistically different ($p < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). Overall, the permeability and retention profiles of the INH through buccal mucosa indicated the occurrence of disruption or extraction of the intercellular lipids and lipids from the cell membrane by surfactants [24].

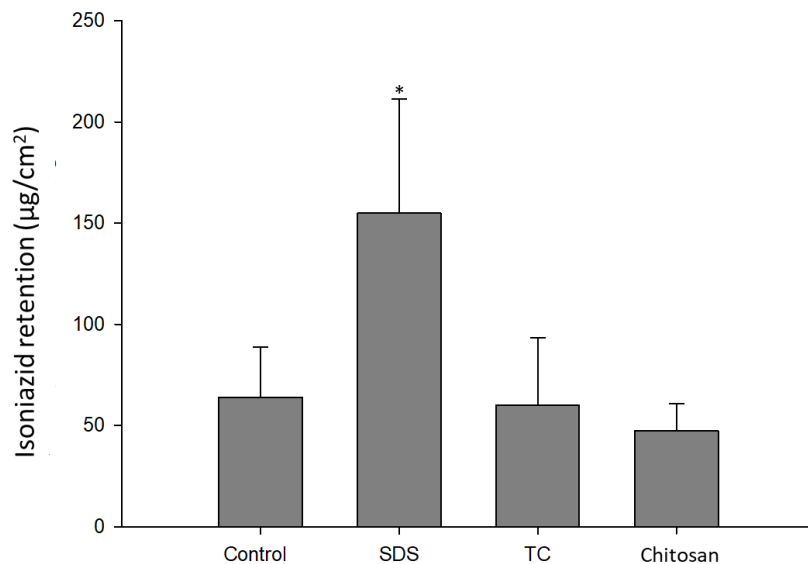


Figure 5. INH retained in porcine buccal mucosa after 10h. Values are represented as mean \pm standard deviation ($n = 6$). *statistically significant difference, values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3.2 Physicochemical characterization

3.2.1 Viscosity analysis

Once the viscosity of the chemical enhancer solutions can affect the drug permeability, the rheological behavior of chitosan solution was analyzed in this study. Overall, diffusion of drugs into Newtonian fluids is facilitated due to lower flow resistance. The saliva buffer, as was expected, presented a Newtonian behavior with a viscosity value of $0.75 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ (cSt). The solution of chitosan (1.0 %), in turn, showed a typical non-Newtonian behavior since the viscosity decreases with increasing the shear rate (Figure 6). This resistance of the medium could reduce the free drug amount in contact with the buccal mucosa or drug diffusion, which would explain the low permeability rate and retention of INH after treatment with chitosan.

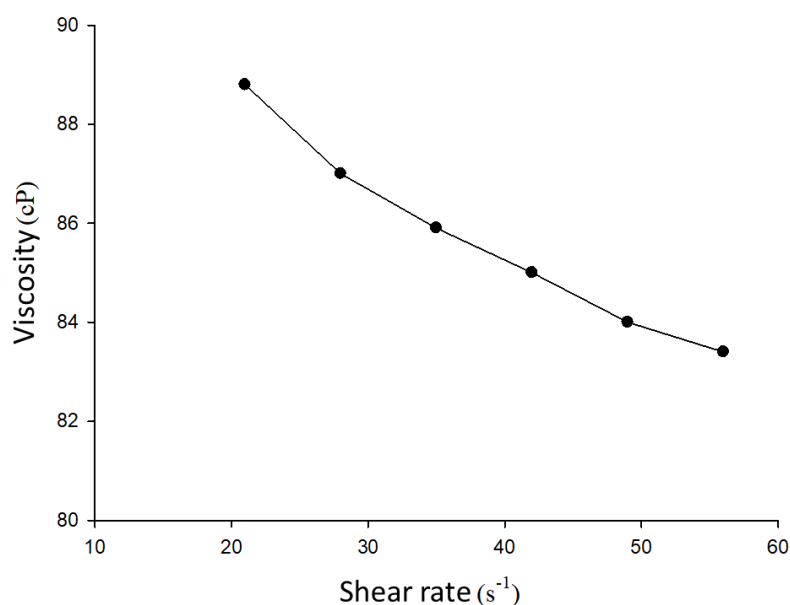


Figure 6. Viscosity and shear rate of 1% chitosan solution.

3.2.2 Micelle size analysis

Potential interactions of INH with absorption enhancers can modulate the drug permeability through the buccal mucosa. The nature of these interactions can be related to the formation of micellar or even aggregated structures of SDS and ST in the aqueous medium. For SDS-prepared solutions, particle size values of approximately 2.50 and 5.70 nm in water and saliva buffer were found, respectively. This size is compatible with the micellar structure of this surfactant (Table 2). ST solution also showed a particle size in the range of micelle structures (approximately 6.70 nm in water). The presence of particles in the range of 325 to 350 nm in

water and 200 to 225 nm in saliva buffer indicated the formation of micellar aggregates of SDS. No statistical difference was observed for the particle size values in the presence of INH. The presence of salts contributed to increasing the micellar diameter of the SDS at pH 6.8. Particle size analysis of the ST solution was inconclusive (data not shown) due to the high discrepancy of the values found for different samples.

Table 2. Micellar sizes of SDS and ST in water and saliva buffer pH 6.8. Data are presented as mean values \pm standard deviation (SD).

	Particle size in water (nm \pm SD)		Particle size in saliva solution (nm \pm SD)	
	Micelles	Aggregates	Micelles	Aggregates
SDS	2.58 \pm 0.61	325.68 \pm 75.58	5.66 \pm 0.41	225.22 \pm 38.67
SDS + INH	2.59 \pm 0.64	350.84 \pm 62.77	5.39 \pm 0.3	200.11 \pm 39.22
ST	6.69 \pm 1.43	IC	IC	IC
ST + INH	4.6 \pm 0.27	IC	IC	IC

SDS: sodium dodecyl sulfate; ST: sodium taurocholate; INH: isoniazid

IC: inconclusive results (relative standard deviation > 50%)

Solutions with surfactants isolated and combined with INH were compared in by t test ($p < 0.05$, $n = 3$).

3.2.3 Zeta potential measurements

The addition of INH to SDS and ST solutions did not change the zeta potential values at pH 6.8 ($p < 0.05$, t-test) (Table 3). For SDS solutions at pH 6.8, zeta potential values were -30.6 to -32.3 mV in presence and absence of INH, respectively. For ST solutions at the same pH, the zeta potential values were -15.7 to -17.0 mV, respectively. Zeta potential parameter was also evaluated at pH 2.0 for the SDS solution in order to confirm that this technique could be used to predict electrostatic interactions between micelle and drug. At this pH, the INH is protonated, interacting with SDS through electrostatic interactions. The zeta potential values for the SDS solution were higher at pH 2.0 than pH 6.8, -42.10 ± 3.29 and -32.30 ± 4.20 mV, respectively. The addition of INH significantly decreased the zeta potential (-20.77 ± 1.65 mV) at strong acid pH ($p < 0.05$, t-test). These findings suggest that the interactions should depend on the pH of the medium and, hence can affect electrophoretic mobility. Electrostatic interactions between INH and micelles would not be observed at pH 6.8.

Table 3. Zeta potential values of SDS and ST in saliva buffer pH 6.8 and Britton-Robinson buffer pH 2.0. Data are presented as mean values \pm standard deviation (SD).

	Zeta potential at pH 2.0 (mV \pm SD)	Zeta potential at pH 6.8 (mV \pm SD)
SDS	-42.1 \pm 3.3	-32.3 \pm 4.2
SDS + INH	-20.8 \pm 1.6	-30.6 \pm 2.9
ST	-	-17.0 \pm 1.4
ST + INH	-	-15.7 \pm 1.7

SDS: sodium dodecyl sulfate; ST: sodium taurocholate; INH: isoniazid
Solutions with surfactants isolated and combined with INH were compared by t-test ($p < 0.05$, $n = 3$).

3.2.4 UV-VIS studies

The absorption spectra of INH containing different SDS or ST concentrations were recorded in order to investigate the molecular interactions between drug and surfactants. SDS showed no absorption at the wavelength of INH (Figure 7). Thus, the absorbance intensity observed in the UV spectrum with SDS and INH corresponds to the drug. The presence of the SDS provided a reduction of the absorbance of the INH in both pH values (2.0 and 6.8). The reduction in the absorbance intensity showed a concentration-dependent behavior (Figure 7 and 8), i.e. the increase in SDS concentration corresponded to lower absorbance values of INH.

The absorbance of INH in the absence of SDS was 0.355 at pH 6.8. The addition of 0.7 and 5 mM of SDS (below the CMC), showed absorbance values of 0.344 and 0.326, respectively. For SDS concentrations in the CMC (10 mM) and above its CMC (35 mM), the absorbance values were 0.310 and 0.271, respectively (Figure 8). At pH 2.0, a similar spectral profile was found; however, the absorbance values were higher than at pH 6.8.

At strong acid pH, the absorbance of the INH in the absence of SDS was 0.456. SDS concentrations below its CMC showed absorbance values of 0.443 and 0.425 at 0.7 and 5 mM, respectively. SDS concentrations in the CMC (10 mM) and above its CMC (35 mM) presented absorbance values of 0.417 and 0.379, respectively (Figure 9). Moreover, the analysis at pH 2.0 showed a bathochromic displacement at 5 mM SDS.

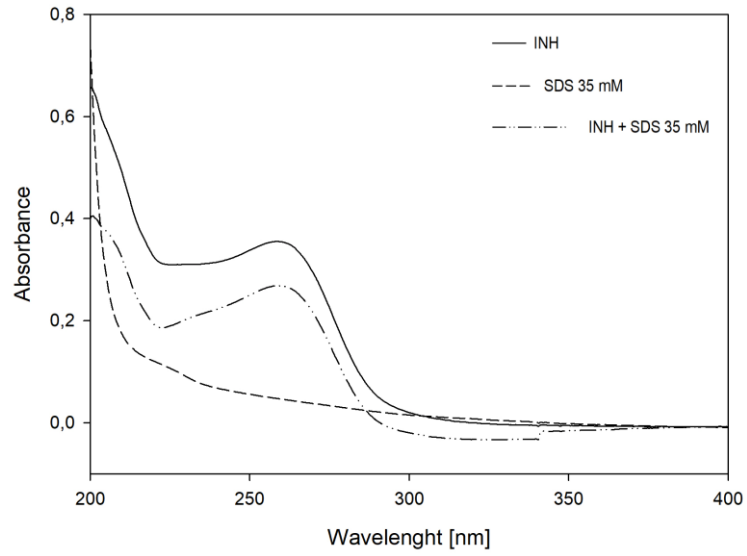


Figure 7. UV spectrum of the INH and 35 mM SDS alone and combined in saliva buffer pH 6.8.

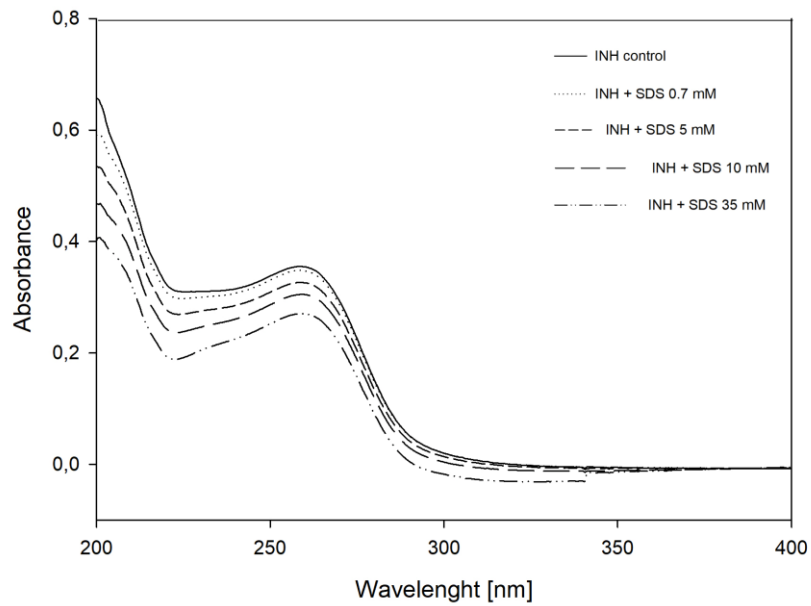


Figure 8. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of SDS in saliva buffer pH 6.8.

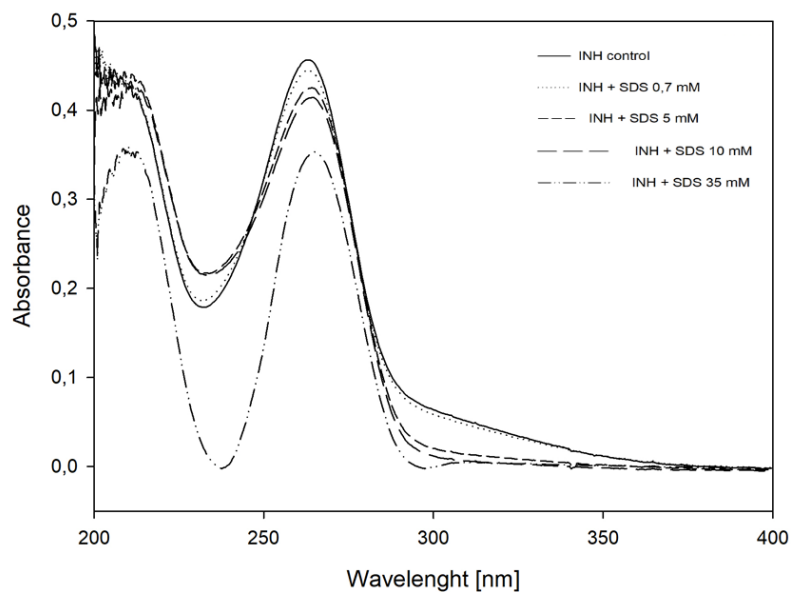


Figure 9. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of SDS in Britton-Robinson buffer pH 2.0.

Once the ST is not soluble at pH 2, INH absorption spectra containing different ST concentrations were measured only at pH 6.8. Unlike the spectra with SDS, the mixture of ST and INH showed absorbance values higher than INH free (Figure 10). The absorbance of the drug in the absence of ST was 0.378. The addition of 0.5 mM ST (below CMC) showed an absorbance of 0.477. Absorbance values > 1.0 were registered at concentrations close (3 and 10 mM) and above CMC (13 and 15 mM), which increased with increasing ST concentration.

The UV spectra of the 10 mM ST showed a maximum absorption value at 265 nm, presenting an absorbance of 2.313. INH, in turn, presented a maximum absorption at 258 nm and absorbance of 0.379. After the mixture of the INH with 10 mM ST, the absorption shifted to 266 nm and the absorbance increased to 2.639 (Figure 11). A sum of absorbance signals of INH and ST was observed. In summary, the results did not indicate an interaction between the drug and the ST surfactant.

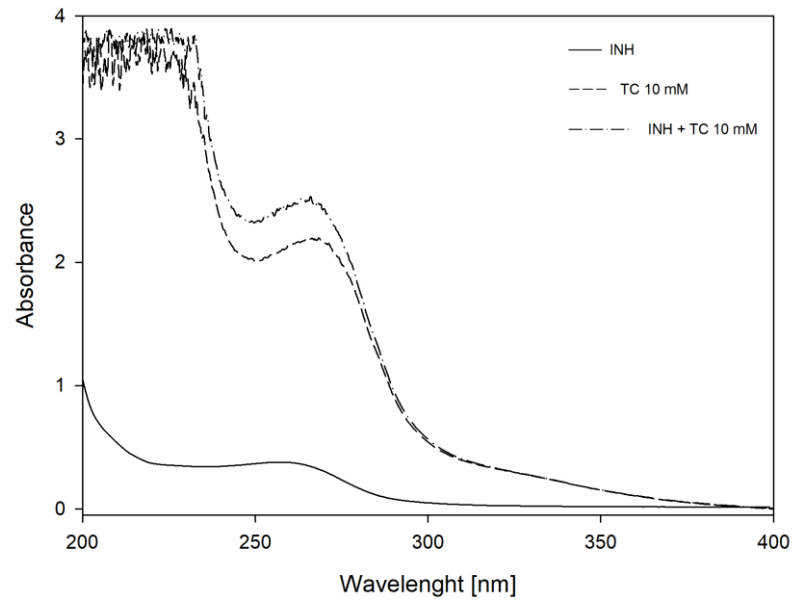


Figure 10. UV spectrum of the INH and 10 mM ST alone and combined in saliva buffer pH 6.8.

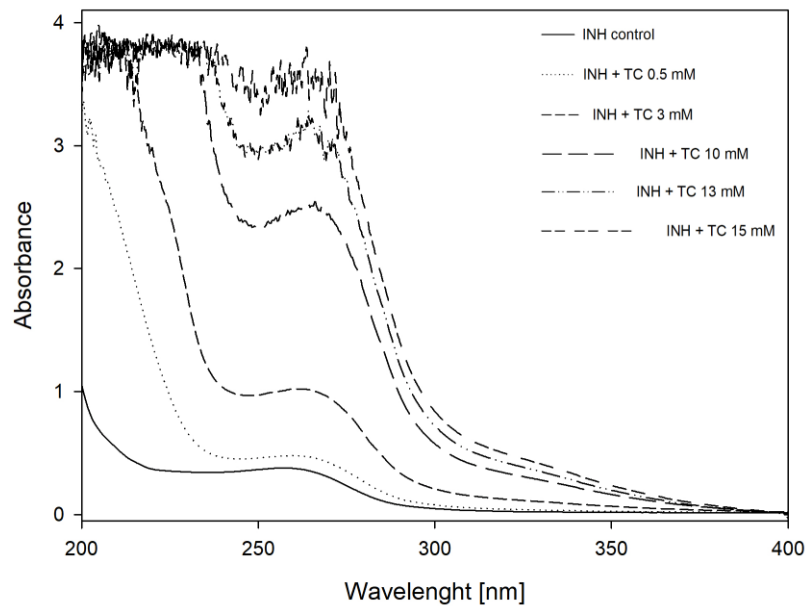


Figure 11. UV spectrum of INH alone and combined with different concentrations of ST in saliva buffer pH 6.8.

4. DISCUSSION

Isoniazid is a molecule presenting high aqueous solubility and it is easily absorbed from the gastrointestinal tract. Although the oral route is the most traditionally used for its administration, a significant first-pass effect is observed [25]. Approximately 10-20% of adult

patients receiving INH show elevations in serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) to about 1-3 times the upper limit of physiological levels [26]. These hepatotoxic events have led to treatment discontinuation by many patients.

Alternatively, drug transport through skin and mucosa could be exploited as administration routes once they avoid first-pass hepatic metabolism. As a consequence, both therapeutic dose and adverse effects may be reduced or even avoided. In a previous study, our research team developed a skin permeation study using porcine ear skin. The results suggested the achievement of plasma concentrations for topically applied INH [8]. The buccal mucosa, in turn, is highly vascularized, allowing a rapid absorption of drugs [27]. Once high transbuccal permeability of INH was expected by considering the physicochemical characteristics of this molecule (log P, molar mass), *ex vivo* assays were performed.

As already mentioned, the permeability flux and coefficient values of INH increased 11-fold after the SDS treatment compared to control (isoniazid solution). In addition, SDS provided 2.85-fold higher INH retention in the buccal mucosa. In a previous study using caffeine as a hydrophilic drug model, its flux rate through buccal mucosa was enhanced by a factor of 1.81 after pretreatment with 35 mM SDS, which had not been shown for the estradiol [13]. The authors justified these differences based on physicochemical characteristics of these molecules, which would lead to different chemical interaction with SDS micelles. Hydrophobic molecules are incorporated into the hydrophobic micelle cores whereas hydrophilic molecules interact preferentially with the micelle surface. An increased permeability profile was also found when 5-fluoracil was treated with different SDS concentrations (0.5, 1 e 1.5%) [22]. A concentration-dependent effect of SDS on the permeability rate was observed for this molecule. The ability of SDS micelles to extract membrane or intercellular lipids has already been suggested as an action mechanism to explain the enhancer effect of this surfactante [13,28], particularly when it is used in concentrations above the CMC. Although the CMC has not been determined experimentally, 1% SDS (~35 mM) is well above of the CMC of this surfactant in water, which is close to 8.0 mM [29]. The SDS micelles formation in saliva buffer was confirmed by dynamic light scattering technique (Table 2).

The intercellular lipids represent the major permeability barrier in the buccal mucosa for hydrophilic compounds [30]. Once the intercellular lipids from mucosa are removed by the surfactant, the intercellular transport route becomes more hydrophilic, facilitating the transport of the hydrophilic compounds such as the INH.

Given that high drug retention was found after SDS treatment, high interaction of SDS with buccal tissue is suggested. When anionic surfactants come into contact with biological membranes, monomers are able to penetrate them, bind to proteins, increasing the charge on the protein network. As a consequence, surfactant molecules can achieve deeper layers of tissue, leading to enhanced swelling and penetration. After the monomer penetration inside the membrane, the surface is damaged and micelles and/or smaller surfactant aggregates could access to deeper layers, increasing the drug permeability [31]. The formation of micelle-like aggregates among surfactants and proteins have already been reported by elsewhere [32]. A cascading process is observed, which depend on the exposure period to the surfactante [31]. Although the monomer concentration in the solution was not evaluated experimentally, literature studies have suggested a micelle/monomer ratio of 80/20 at 1% SDS [33].

Interactions between drug and micelles also may affect the permeability rate of drugs through the mucosa. Therefore, zeta potential and UV absorption spectra analysis were performed at two pH values (pH 2 and 6.8) to confirm this assumption. Once the INH is found in a protonated form at pH 2.0, this pH was used to confirm the existence of attractive interactions between INH and SDS. The pH of 6.8 was selected to predict the behavior of the solution containing these agents during the permeability assays. Indeed, the results at pH 2.0 indicated electrostatic interactions between the positively charged drug and the negatively charged SDS. Atta and co-workers (2011) investigated interactions of different types of surfactants with INH in Britton-Robinson buffer pH 2.0 by UV–VIS spectroscopy [34]. The effect of successive additions of SDS surfactant on the absorption spectrum of INH at 2 mM confirmed that the anionic character of SDS contributes to electrostatic forces with the drug, leading to the formation of aggregates.

Chemical interaction between these agents also appears to occur at pH 6.8. Although no interaction between INH and SDS has been demonstrated by zeta potential analysis, UV spectral changes indicated the existence of molecular interactions at pH 6.8. Clear and significant spectral changes were observed for both monomer and micelles when the drug was included in saliva buffer pH 6.8. Non-ionized INH is found at pH 6.8, and the interactions with monomers and micelles of SDS should be weaker in this pH than at pH 2.0. These findings suggest that other types of chemical interaction would be more likely than ionic interactions at pH 6.8 (eg. hydrogen bonds).

Hydrophilic drugs, such as INH, are preferably adsorbed on the surface of the micelle by interacting with the polar head groups [35]. On the other hand, physical properties of the

micelles, such as micro-viscosity, polarity and hydration degree are not uniform along the structure. Therefore, the binding of INH to SDS can occur in different regions of solubilization in the micelle [36]. Additional techniques such as Fourier transformed infrared spectroscopy and spectroscopy of nuclear magnetic resonance are required to confirm physical and/or chemical interactions between INH and SDS at physiological pH of the saliva and identify the exact point of this interaction.

Unlike the SDS, the sodium taurocholate did not increase the permeability flux and retention of INH through the buccal mucosa. In studies of buccal transport with lidocaine hydrochloride and thiocolchicoside, both hydrophilic drugs, the permeability also was not increased in the presence of sodium taurocholate [30,37]. For the thiocolchicoside, permeability assays were performed by using two different concentrations of sodium taurocholate (10 and 100 mM). The drug transport was almost completely suppressed in the presence of 100 mM of ST. Interaction between bile salts and thiocolchicoside was suggested by the authors to explain these findings, which was supported by DSC analyses [30]. For the sotalol, another hydrophilic compound, its transport rate through buccal mucosa was significantly decreased by the addition of sodium glycocholate. A mechanism of ion-pairing between the protonated amine group of sotalol and the anion of sodium glycocholate was proposed. This ionic pairing would increase the molecular size of the surfactant, preventing its interaction with the mucosa [38]. Although the INH presents chemical groups that can be protonated, it is found in a neutral form at pH 6.8. Thus, this mechanism of ion pair formation is not expected for the INH.

Similar to SDS, size, zeta potential and UV spectra analysis were also performed for the ST in order to understand the interaction degree between drug and micelle. The particle size analysis performed by dynamic scattering was inconclusive (data not shown). Large dispersion of particle size was found for the ST solution, containing micelle structures as well as aggregates, which may be observed by the analysis of high relative standard deviation. A study performed by Coello and co-workers (1993) support these findings [39]. They demonstrated the formation of multiple aggregation equilibriums for different concentrations of bile salts in the aqueous medium.

Given that precipitation events were identified for ST in B-R buffer pH 2.0, the investigation of molecular interactions was possible only using saliva buffer pH 6.8. No electrostatic interactions between INH (non-ionized at pH 6.8) and the bile salts were also expected in this pH. Zeta potential values did not decrease with INH addition (Table 3), indicating the absence of attractive forces between the molecules. UV spectrophotometric

analysis suggested no molecular interaction. INH absorbance probably was additive to ST absorbance. Considering that the permeability of INH in medium containing ST was rapidly close to that of control and that no molecular interactions between INH and ST were observed, a weak interaction of ST with mucosa constituents would be the most probable hypothesis to justify these findings.

Chitosan has been considered in the development step of various buccal formulations given that is able to increase the residence time of the drug at the mucosal surface, increasing the absorbed drug amount. Positively charged amino groups of chitosan interact with the negatively charged sialic acid of the mucous layer [40,41]. In the study performed with INH in the presence of chitosan, a buccal permeability rate statistically similar to the control (treatment only with INH) was observed. The long contact time of the buccal mucosa with the buffering solution during the transportation from the abattoir to the laboratory and the tissue preparation step for the permeability assays may have contributed to the partial or total removal of mucus. As a consequence, the chemical interaction with the chitosan would be reduced or even avoided, justifying a buccal permeability close to control. In a study with synthetic membranes evaluating the interaction of mucus and chitosan, the authors reported that the tendency of chitosan to form complexes with mucin and other proteins seems to surpass its ability of binding to membranes [18]. This fact sustains the hypothesis of the need for mucus to an effective membrane perturbation. The high viscosity of the chitosan solution also contributes to explaining these findings given that the INH diffusion would be reduced. The saliva solution containing INH was added after the chitosan treatment. This approach may have generated an additional diffusion layer for the drug, which would reduce the drug permeability.

5. CONCLUSION

High permeability rate and rapid diffusion of INH through the transbuccal route was found, suggesting that this route is promising for the administration of the INH. SDS was the most effective chemical permeation enhancer, which increased the permeation flux of INH by approximately 11-fold. It probably acts by extracting the intercellular lipids and by interacting with the proteins, leaving the intercellular route more attractive to the drug. Although no electrostatic interaction between INH and SDS at saliva pH has been suggested by zeta potential analysis, other types of (nonionic) interactions among these agents have been suggested by spectrophotometric analysis. The interaction probably occurs via polar groups of the surfactant head, which justifies the non-interference in the permeability rate of INH. The partial or total

removal of the mucus during the preparation of the buccal membranes as well as slow diffusion of the INH in the chitosan solution may have contributed to the low permeability coefficient obtained in samples treated with chitosan. The presence of ST did not affect INH permeability parameters, which seem to be associated with a weak interaction with mucosa. Zeta potential and spectrophotometric analysis also showed no interaction between ST and INH.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the Brazilian funding agency CNPq/MCTI (Universal 01/2016 - Grant number: 408229/2016-0) for financial support.

REFERENCES

- [1] C.L. Daley, The global fight against tuberculosis., *Thorac. Surg. Clin.* 29 (2019) 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.010>.
- [2] Global tuberculosis report 2019. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>, 2019 (accessed 12 March 2019)
- [3] Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf>, 2017 (accessed 12 March 2019)
- [4] J.R. Starke, *Mycobacterium tuberculosis*, in: S. Long, L. Pickering, C. Prober (Eds.), *Princ. Pract. Pediatr. Infect. Dis.*, Fourth, London, 2012, pp. 771–786.
- [5] A. Quemard, C. Lacave, G. Laneelle, Isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis by cell extracts of sensitive and resistant strains of *Mycobacterium aurum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 (1991) 1035–1039. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.6.1035>.
- [6] G. Ramachandran, S. Swaminathan, Tuberculosis, in: S. Padmanabhan (Ed.), *Handb. Pharmacogenomics Stratif. Med.*, 1st ed., Academic Press, San Diego, 2014, pp. 835–857.
- [7] J.J. Saukkonen, D.L. Cohn, R.M. Jasmer, S. Schenker, J.A. Jereb, C.M. Nolan, C.A. Peloquin, F.M. Gordin, D. Nunes, D.B. Strader, J. Bernardo, R. Venkataramanan, T.R. Sterling, An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 (2006) 935–952. <https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1666ST>.

- [8]T. Caon, C.E.M. Campos, C.M.O. Simoes, M.A.S. Silva, Novel perspectives in the tuberculosis treatment: administration of isoniazid through the skin., *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.067>.
- [9]A.Z. Alkilani, M.T.C. McCrudden, R.F. Donnelly, Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum., *Pharmaceutics*. 7 (2015) 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>.
- [10]P. Chinna Reddy, K.S.C. Chaitanya, Y. Madhusudan Rao, A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods., *Daru*. 19 (2011) 385–403.
- [11]M. Franz-Montan, D. De Araujo, L. Ribeiro, N. de Melo, E. de Paula, Nanostructured systems for transbuccal drug delivery, in: *Nanostructures Oral Med.*, 2017, pp. 87–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00005-5>.
- [12]H. Junginger, Drug absorption enhancement, concepts, possibilities, limitations and trends, *J. Drug Target*. 4 (1996) 51–52. <https://doi.org/10.3109/10611869609046260>.
- [13]J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finin, Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 431–440. <https://doi.org/10.1002/jps.10559>.
- [14]S. Şenel, A.A. Hincal, Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations, *J. Control. Release*. 72 (2001) 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00269-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00269-3).
- [15]E. Moghimipour, A. Ameri, S. Handali, Absorption-enhancing effects of bile salts, *Molecules*. 20 (2015) 14451–14473. <https://doi.org/10.3390/molecules200814451>.
- [16]S.E. Hansen, E. Marxen, C. Janfelt, J. Jacobsen, Buccal delivery of small molecules – Impact of levulinic acid, oleic acid, sodium dodecyl sulfate and hypotonicity on *ex vivo* permeability and spatial distribution in mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 133 (2018) 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.016>.
- [17]E. Marxen, L. Jin, J. Jacobsen, C. Janfelt, B. Hyrup, J.A. Nicolazzo, Effect of permeation enhancers on the buccal permeability of nicotine: *ex vivo* transport studies complemented by MALDI MS imaging, *Pharm. Res.* 35 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2332-y>.
- [18]C.A. Silva, T.M. Nobre, F.J. Pavinatto, O.N. Oliveira, Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment, *J. Colloid Interface Sci.* 376 (2012) 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.03.027>.
- [19]T. Caon, C.M.O. Simões, Effect of freezing and type of mucosa on *ex vivo* drug permeability parameters., *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 587–592. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9621-2>.
- [20]M.E. de Vries, H.E. Boddé, J.C. Verhoef, M. Ponec, W.I.H.M. Craane, H.E. Junginger, Localization of the permeability barrier inside porcine buccal mucosa: a combined *in vitro*

study of drug permeability, electrical resistance and tissue morphology, *Int. J. Pharm.* 76 (1991) 25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90340-T](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90340-T).

[21]U. Kulkarni, R. Mahalingam, I. Pather, X. li, B. Jasti, Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: effect of biological and experimental variables, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1265–1277. <https://doi.org/10.1002/jps.21907>.

[22]M.K. Dhiman, A. Dhiman, K.K. Sawant, Transbuccal delivery of 5-fluorouracil: permeation enhancement and pharmacokinetic study, *AAPS PharmSciTech.* 10 (2009) 258–265. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9203-8>.

[23]N.M. Howie, T.K. Trigkas, A. Cruchley, P. Wertz, C.A. Squier, D. Williams, Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa, *Oral Dis.* 7 (2001) 349–354. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2001.00731.x>.

[24]J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin, Buccal penetration enhancers - How do they really work?, *J. Control. Release.* 105 (2005) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.024>.

[25]P. Donald, H. McIlleron, Antituberculosis drugs, in: H. Zumla, A. Schaaf, J. Grange, M. Raviglione, W. Yew, J. Starke, M. Pai, P. Donald (Eds.), *Tuberculosis*, Saunders Elsevier, 2009: pp. 608–617.

[26]M.A. Arbex, M. de C.L. Varella, H.R. de Siqueira, F.A.F. de Mello, Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs., *J. Bras. Pneumol.* 36 (2010) 641–56. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132010000500017>.

[27]D. Shinkar, A. Dhake, C. Setty, Drug delivery from the oral cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 66 (2012) 466–500. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2012.00877>.

[28]H. Sohi, A. Ahuja, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 254–282. <https://doi.org/10.3109/03639040903117348>.

[29]M. de, M. Rezende, Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia, *Quim. Nova.* 27 (2004). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500004>.

[30]M. Artusi, P. Santi, P. Colombo, H.E. Junginger, Buccal delivery of thiocolchicoside: *in vitro* and *in vivo* permeation studies., *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 203–213. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00545-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00545-8).

[31]S.A.V. Morris, R.T. Thompson, R.W. Glenn, K.P. Ananthapadmanabhan, G.B. Kasting, Mechanisms of anionic surfactant penetration into human skin: investigating monomer, micelle and submicellar aggregate penetration theories, *Int. J. Cosmet. Sci.* 41 (2019) 55–66. <https://doi.org/10.1111/ics.12511>.

- [32]A. Lips, K.P. Ananthapadmanabhan, M. Vethamuthu, X.Y. Hua, L. Yang, C. Vincent, N. Deo, P. Somasundaran, Role of surfactant micelle charge in protein denaturation and surfactant-induced skin irritation., in: L.D. Rheih, M. Schlossman, A. O'Lenick, P. Somasundaran (Eds.), *Surfactants Pers. Care Prod. Decor. Cosmet.*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 184–194.
- [33]B. Hammouda, Temperature effect on the nanostructure of SDS micelles in water, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 118 (2013) 151–167.
- [34]N.F. Atta, A. Galal, F.M. Abu-Attia, S.M. Azab, Characterization and electrochemical investigations of micellar/drug interactions, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 2510–2517. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.11.034>.
- [35]C.O. Rangel-Yagui, A.J. Pessoa, L.C. Tavares, Micellar solubilization of drugs., *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8 (2005) 147–165.
- [36]U. Sheth, S. Tiwari, A. Bahadur, Preparation and characterization of anti-tubercular drugs encapsulated in polymer micelles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 48 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.021>.
- [37]C. Padula, L. Pozzetti, V. Traversone, S. Nicoli, P. Santi, *In vitro* evaluation of mucoadhesive films for gingival administration of lidocaine, *AAPS PharmSciTech.* 14 (2013) 1279–1283. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0020-8>.
- [38]V.H.M. Deneer, G.B. Drese, P.E.H. Roemelé, J.C. Verhoef, L. Lie-A-Huen, J.H. Kingma, J.R.B.J. Brouwers, H.E. Junginger, Buccal transport of flecainide and sotalol: effect of a bile salt and ionization state, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00229-6).
- [39]A. Coello, F. Mejjide, E. Nunez, J. Vázquez Tato, Aggregation behavior of sodium cholate in aqueous solution, *J. Phys. Chem.* 97 (1993). <https://doi.org/10.1021/j100141a046>.
- [40]T. Caon, L. Jin, C.M.O. Simões, R.S. Norton, J.A. Nicolazzo, Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics, *Pharm. Res.* 32 (2015) 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1485-1>.
- [41]A. Kumar, A. Vimal, A. Kumar, Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.054>.

4 CAPÍTULO II: ARTIGO À SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO

Logo após a introdução da INH na terapia da TB, cepas resistentes a este fármaco já foram identificadas (MIDDLEBROOK, 1952). Mutações no gene KatG (catalase-peroxidase) representam o principal mecanismo de resistência microbiana, já que esta enzima é responsável pela ativação da INH (SCHROEDER *et al.*, 2002).

O PFC-INH tem sido investigado como uma alternativa promissora para casos de resistência a INH, porém, baixa biodisponibilidade oral foi observada em experimento *in vivo* em ratos. Desta forma, sua administração bucal foi também proposta. Além do PCF-INH, um complexo derivado do azul da Prússia foi preparado em caráter inédito. Estes compostos foram obtidos mediante colaboração com o doutorando Marcio Cristiano Monteiro, orientado pelo professor Dr. Bruno Szpoganicz do Programa de Pós-Graduação em Química (UFSC).

Assim, neste segundo capítulo, após o preparo e caracterização dos complexos metálicos PCF-INH e PB-INH, avaliou-se a permeabilidade transbucal dos mesmos através do sistema de difusão de Franz. Estudos de estabilidade dos complexos em diferentes meios foram considerados a fim de otimizar as condições do ensaio de permeabilidade. Análise espectroscópica foi realizada para confirmar a identidade dos produtos obtidos. A capacidade de auto-ativação dos complexos foi avaliada por voltameria cíclica, já que esta propriedade é crucial nos casos de resistência microbiana. Defeitos de estrutura do complexo Azul da Prússia foram avaliados pelo método de Job. O produto deste capítulo também será um artigo científico, que será submetido para apreciação no *Journal of Biological Inorganic Chemistry*.

**TRANSBUCCAL DELIVERY OF METAL COMPLEXES OF ISONIAZID AS AN
ALTERNATIVE TO OVERCOME ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROBLEMS**

Roselene Kroth¹, Marcio Cristiano Monteiro², Julia Conte¹, Debora Fretes Argenta¹, Beatriz
Ribeiro do Amaral¹, Bruno Szpoganicz², Thiago Caon¹

¹Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Thiago Caon
Email: thiagocaon@gmail.com

ABSTRACT

In isolated isoniazid(INH)-resistant strains, deletion or mutations in the *katG* gene have been identified, which result in loss of catalase-peroxidase activity. This enzyme plays a key role in the activation of this prodrug. As an alternative, the coordination of the INH to metal complexes has been purposed to activate it regardless of enzyme functionality. Although pentacyanido(isoniazid)ferrate(II) complexes have shown to be effective against resistant strains of *M. tuberculosis*, low oral bioavailability was found. In this context, buccal mucosa was selected as an alternative route to the metal complex delivery. Moreover, oral manifestations of TB have been observed in some patients, particularly when resistant strains are present; however, no therapeutic options may be found in the market until now. Pentacyanidoferrate (PCF-INH) and Prussian-blue (PB-INH) complexes were initially prepared and characterized, followed by buccal permeability studies in Franz-type diffusion cells. The electrochemical potential of the complexes demonstrated their ability to self-activate. Job's method suggested the presence of structural defects in PB-INH complexes, which was correlated with permeability results. In fact, PB-INH showed a higher dissociation rate in salt-rich aqueous medium and thus high transport rate through buccal mucosa. Its passage through the tissue would not be possible due to the high molecular size. PCF-INH, in turn, presented a lower dissociation rate in the salt-rich aqueous medium, justifying its slower transport rate through the tissue. Taking together, these results suggest that INH-based metal complexes may be efficiently administered through the buccal route, impacting on both oral bioavailability and microbial resistance.

Keywords: metal complexes; transbuccal delivery; isoniazid; pentacyanidoferrate.

1 INTRODUCTION

Isoniazid (INH) is a prodrug that inhibits the formation of the mycobacterial cell wall. The mechanism of action involves its conversion into various electrophilic intermediates or reactive species by the mycobacterial katG-encoded catalase-peroxidase. After the formation of an isonicotinyl-NAD⁺ adduct, this byproduct inhibits the *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) enoyl reductases, resulting in the reduction of mycolic acid synthesis [1]. Although INH has been widely used as a front-line drug in the treatment of TB; hepatotoxic events and resistant *Mt* strains have limited its clinical application [2].

The primary mechanism of multiple drug resistance in *Mt* involves the accumulation of mutations in individual drug target genes [3]. Mutations in at least five different genes (katG, inhA, ahpC, kasA, and ndh) have been found to correlate with INH resistance [4]. Mutations in the inhA gene, for example, can occur in the gene promoter region and in domains responsible for the NAD-INH adduct binding [5]. Approximately 50% of isolated isoniazid-resistant strains have either a deletion or mutations in the katG gene, showing a loss of catalase-peroxidase activity [6].

One of the strategies to overcome the problems found in the treatment of *Mt* resistant strains is the coordination of this prodrug to metal complexes [7]. Pentacyanido(isoniazid)ferrate(II) complex, for example, would act by a mechanism of self-activation involving an intramolecular electron transfer from the metallic center, leading to the formation of a carbonyl-centered radical without katG participation [8]. In addition to this drug activation mechanism, metal-based complexes have demonstrated an improved aqueous solubility, controlled release and optimized pharmacokinetic parameters in relation to small organic compounds [9]. In previous studies, pentacyanido(isoniazid)ferrate(II) (IQG607) was able to inhibit *in vitro* the TB target enzyme (InhA) and kill *Mt*, including INH-resistant strains [1, 10]. The enhancement of the electron density on the hydrazide group could improve the stability of the proposed radical and thus lead to improved *Mt* InhA-inhibition properties [11].

Although the IQG607 complex showed to be active against *M. tuberculosis* resistant strains, low oral bioavailability (3.7 and 3.8% in fasting and fed state) was observed in mice [12]. Factors such as low gastrointestinal permeability, significant first-pass hepatic metabolism, mucosal efflux pumps as well as a distribution and biotransformation limiting the appropriate dose in the target tissue could explain these findings [13]. In this context, alternative routes could be exploited aiming to ensure enough drug amount in the systemic level. With this in mind, the transbuccal route was alternatively considered for the metal complex delivery. This

administration route was also selected due to the fact that different studies in last decade have demonstrated an involvement of *M. tuberculosis* in persistent or atypical lesions in the oral cavity [14–16]. Although oral manifestations of TB are rare (0.1-5%) [16], they are reappearing as a consequence of the outbreak and emergence of drug-resistant TB and increased incidence of acquired immune-deficiency syndrome. The microorganism may infect all parts of the mouth, appearing mainly in the form of ulcerative lesions [14].

Once the IQG607 complex is stable at acidic pH [17], its buccal administration could be performed successfully. In addition, another innovative metal complex ferric pentacyanido(pyridine-4-carbohydrazine)ferrate(II) (PB-INH) was prepared and its transbuccal permeation was also evaluated. A complete physicochemical characterization of these metal complexes was performed by using electrochemical and spectroscopic analysis (UV and IR) as well as *in vitro* kinetic stability analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Isoniazid and isonicotinic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Both Krebs bicarbonate Ringer (KBR) and phosphate (PBS) buffers were prepared according to standardized protocols. Acetonitrile and methanol were of HPLC grade and all other chemicals and reagents were of analytical grade and used as received. Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, Massachusetts).

2.2 Synthesis of the complexes

2.2.1 Synthesis of sodium amminepentacyanidoferrate(II)

The commercially available sodium nitroprusside, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was used as a starting material to synthesize the sodium amminepentacyanidoferrate complex (PCF-ammine). Initially, 6 g of nitroprusside (20 mM) was added to 40 mL of ammonium hydroxide (280 mM) in an Erlenmeyer flask. This flask was closed, protected from light and then kept under agitation until complete solubilization of complexes. After 3h of agitation, a yellow solid was observed, which is characteristic of the complex formation. At this moment, 6 g of potassium iodide was added to precipitate the compound, followed by slow addition of 100 mL of ethanol. Finally, a vacuum filtration of the solid was performed, and the product was stored in a desiccator until a constant mass is obtained. The reaction yield was 82%. $\text{C}_5\text{H}_9\text{FeN}_6\text{Na}_3\text{O}_3$ (325.98 g mol⁻¹). Calculated: C 18.42, H 2.78, N 25.78; Experimental: C 19.45, H 2.63, N 25.64.

2.2.2 Synthesis of pentacyanido(pyridine-4-carbohydrazine)ferrate(II) complexes

Considering that the NH_3 ligand in the $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$ complex has a labile character, it was used as a precursor to prepare pentacyanidoferrate complexes with isoniazid. The pentacyanido(pyridine-4-carbohydrazine)ferrate(II) (PCF-INH) complexes were prepared by mixing INH in excess (2.9 mM) with 0.2 g of amminepentacyanidoferrate(II) in water (0.58 mM) at room temperature under light protected conditions. INH is oxidized by $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ to generate $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{inh}^*)]^{3-}$, where inh* corresponds the oxidation product such as isonicotinamide and isonicotinic acid. After the reaction, 1.0 g (0.67 mM) of potassium iodide is added, followed by slow addition of 30 mL of ethanol. The obtained precipitate was vacuum filtered, washed with ethanol and kept in a desiccator until the constant mass is obtained. The reaction yield was 80%. $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{FeN}_8\text{Na}_3\text{O}_9$ (536.16 g mol⁻¹). Calculated: C 25.50, H 4.08, N 21.62. Experimental: C 25.14, H 3.79, N 20.92.

2.2.3 Synthesis of ferric pentacyanido(pyridine-4-carbohydrazine)ferrate(II) complex

The $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (PB) and PB-INH complexes were obtained through the spontaneous coordination method, where an aqueous solution containing ferric chloride in excess (0.4 mM) was mixed with an aqueous solution of hexacyanidoferrate or PCF-INH (0.1 mM). After 15 min of agitation, isolation of PB or PB-INH insoluble particles was performed by the acetone addition. Acetone was selected in this step by considering that PB is not soluble in this solvent [18]. Finally, the resulting precipitates were collected by centrifugation and decanting, and then washed with acetone several times. Low-solubility microcrystalline powders were obtained.

2.3 Determination of composition by Job's method

Job's method was used to determine the PB-INH complex stoichiometry. Various solutions were prepared by mixing varying proportions of the PCF-INH and FeCl_3 (0 to 3 mL), keeping the ionic strength, pH and final volume (3 mL) constant. The solutions were analyzed spectrophotometrically to determine the concentration ratio that generates the highest concentration of complex ion. By plotting the absorbance of each solution against the mole fraction of ligand, the ligand concentration that corresponds to the maximum concentration of complex ion may be determined.

2.4 Spectroscopic analysis

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded using an ABB FTLA 2000 spectrometer in the wavenumber range of 4,000 to 400 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} . The solid sample and KBr were initially ground together with a mortar and pestle, followed by hydraulic compression to obtain mixture discs.

Electronic spectra were obtained at room temperature on a Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis spectrophotometer (Waltham, MA, USA), using a quartz cuvette with an optical path length of 1 cm. The wavelength range 200-1000 nm was evaluated.

2.5 Cyclic voltammetry analysis

Cyclic voltammograms were obtained at room temperature (25 ± 1 °C) using a potentiostat-galvanostat (EG&G Priceton Versastat III). Potassium chloride (0.1 mol L^{-1}) was selected as a supporting electrolyte in all measurements. A conventional three-electrode system was considered, i.e., an Ag/AgCl reference electrode (containing 3 mol L^{-1} KCl), an auxiliary electrode of platinum plate and a working electrode of glassy carbon. Solutions of ligands and complexes were tested at 5 mmol L^{-1} , degassed with nitrogen and maintained under inert atmosphere during the measurements.

2.6 *In vitro* kinetic stability of the PCF-INH complex in different media

This assay was carried out in order to understand the stability of PCF-INH complex in the medium used during permeability studies. In this step, the PB-INH complex was not considered once it is characterized by a very low aqueous solubility. The dissociation of metal complexes was monitored spectrophotometrically. The concentration of the complex was fixed at 0.5 mmol L^{-1} and different media were added (DMSO, PBS and water). The ionic strength of the solution was adjusted with 1.0 mol L^{-1} sodium chloride. For DMSO, analyses were performed at 25 °C during 1 h, collecting UV-Vis spectra every 2 min. For PBS and water, in turn, analyses were performed at 37 °C for 24 h. PBS and water were selected in order to select the most appropriate option for permeability studies and DMSO as an alternative to extracting the drug from complex, facilitating the analytical step (HPLC quantification).

2.7 Tissue preparation and transport studies

Once the porcine buccal mucosa resembles human buccal mucosa in structure and permeability [19], it was selected for the *ex vivo* transport studies. Porcine buccal tissue was

obtained from a local abattoir immediately after slaughter and transported in ice-cold Krebs-Ringer buffer (pH 7.4). Within 2 h of slaughter, the buccal mucosa was carefully separated from fat and muscles using a scalpel and surgical scissors. The separated tissue (\pm 1 mm in thickness) was kept in ice-cold KBR until being placed in Franz diffusion cells (diffusional area 1.77 cm²). These mucosae were mounted at the interface of the donor and receiver chamber with the buccal epithelium facing upwards and 10 mL of phosphate buffered saline was added to the receptor chamber. No solubilizing agents were used due to high drug solubility. In the donor phase, 1 mL of water was initially added. In the sequence, more 1 mL of INH or isonicotinic acid previously solubilized in water (final concentration equal to 2.5 mg mL⁻¹) or metal complex powder were added. An amount of metal complex powder equivalent to drug amount of control solution was considered. Therefore, all samples presented a drug concentration of 2.5 mg mL⁻¹. The system was kept at 37 °C by circulating heated water through an external water jacket and the solution in the receptor chamber was continuously stirred at 750 rpm using Teflon[®] coated magnetic stirrers. At fixed time intervals (every 1 h, for 10 h), samples (400 μ L) were withdrawn from the receptor chamber, replaced by the same volume of fresh medium and quantified by a previously validated HPLC method (see the section below). At the end of the permeation assays, the amount of INH and isonicotinic acid retained in the buccal mucosa was also investigated. Mucosae were placed into separate pre-weighed tubes to determine the amount of INH and isonicotinic acid in each tissue sample collected. The drugs were extracted from the tissues with a solution 1:2 of phosphate-buffered saline/trichloroacetic acid, followed by overnight storage to increase the extraction efficiency. In the next day, the tissues were vortexed for 10 min, sonicated for 30 min, and the supernatant was analyzed by HPLC. The steady-state permeability flux (J_{ss}) was determined from the linear slope of the cumulative amount of INH and isonicotinic acid (IA) absorbed vs. time curve. The apparent permeability coefficient (P_{app}) of INH or IA was determined by dividing J_{ss} by the initial donor chamber concentration, and P_{app} values from different treatments were compared using *t*-test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, California).

2.8 Apparatus and chromatographic conditions

The quantification of INH and isonicotinic acid were performed by high efficiency liquid chromatography (HPLC) based on a previously validated method [20]. The HPLC apparatus consisted of a PerkinElmer[®] series 200 system equipped with a binary pump,

autoinjector, vacuum degasser and a visible-ultraviolet detector. A C18 analytical column (250 × 4.6 mm, 5.0 μm internal diameter) was used preceded by a guard column of the same packing material (Thermo Fischer® scientific). The isocratic mobile phase was composed of methanol-ammonium acetate buffer, pH 6.8 (4:96 v/v) at a flow-rate of 0.7 mL min⁻¹, with volume injection of 20 μL and detection at 260 nm. The HPLC system was operated at ambient temperature. The method was specific and linear in the range of 0.6 to 100 μg mL⁻¹ (r > 0.99). No interference biological matrix in the drug peak was observed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Spectroscopic properties

3.1.1 UV-Vis spectroscopy

The pentacyanidoferrate complexes, [Fe(CN)₅L]ⁿ⁻, have characteristic charge transfer absorption in the visible light range related to σ-donor and π-acceptor capability of the sixth ligand. The complex PCF-ammine presented an absorption band close to 400 nm ($\epsilon = 4.47 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which was associated with a ligand-field transition [21]. When the ammonia ligand was replaced by isoniazid, a strong absorption band is observed in the visible region of the spectrum (Figure 1). A transition from metal to ligand [Fe(dπ) → INH(pπ*)] could explain these findings. The complex PCF-INH demonstrated a metal-to-ligand charge transfer (MLCT) at 435 nm ($\epsilon = 2.88 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which was responsible for the orange color of the solution, overlapping the d-d transition [22]. For both complexes, metal-to-ligand transitions [Fe(dπ) → CN(pπ*)] at wavelength values close to 200 nm are observed (data not shown) [21].

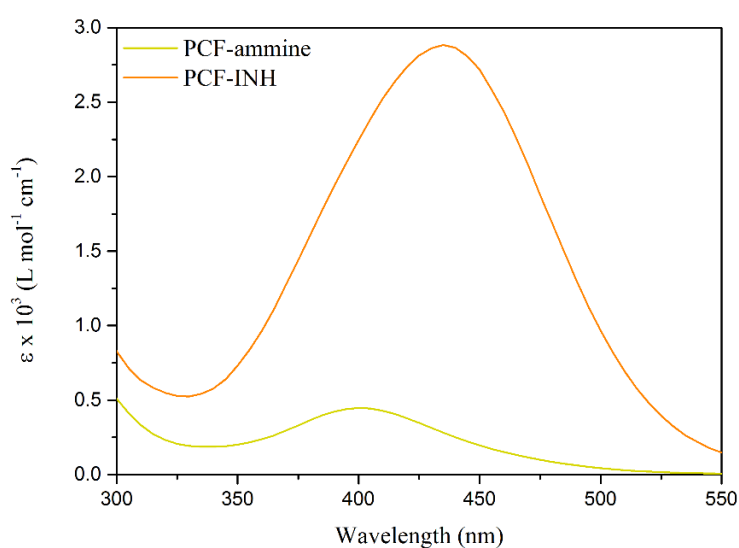


Figure 1. Electronic spectra of PCF-ammine and PCF-INH in water. (ϵ) represents the molar extinction coefficient.

Spectroscopic characterization was also performed between the Prussian blue complex and traditional Prussian blue (Figure 2). The PB-INH presented a bathochromic shift in its MLCT at 395 nm due to Fe^{3+} coordination. Moreover, PB-INH presented an electronic intervalence band at 785 nm, which may be attributed to the cyanide bond formation.

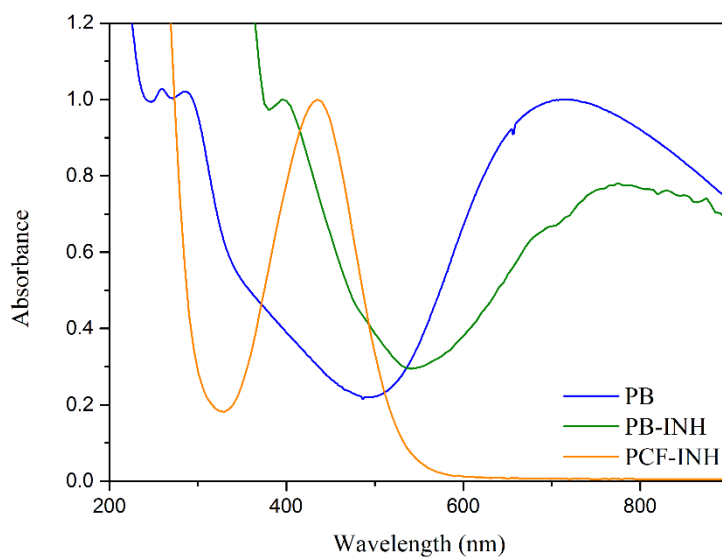


Figure 2. Electronic spectra of PB, PB-INH and PCF-INH. The absorbance values between 400 and 800 nm were normalized for the comparison purpose.

3.1.2 Infrared spectroscopy

Infrared spectra were collected in order to observe the ligand coordination effect. The infrared (IR) vibrational spectrum of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ displays bands at wavenumbers (cm^{-1}) associated with stretching frequencies of νCN groups (2044 cm^{-1}), $\delta\text{Fe-CN}$ (568 cm^{-1}), $\nu\text{C-H}$ bonds involving sp^2 -hybridized carbons of the pyridine ring (3288 cm^{-1}), and $\nu\text{C=O}$ stretching (1668 cm^{-1}) (Figure 3). The IR spectra were consistent with reduced pentacyanidoferrate(II) complexes [23]. The coordination occurs through the nitrogen atom of the pyridine ring [2].

For the PB-INH complex, the infrared (IR) vibrational spectrum showed a strong absorption at 2065 cm^{-1} , which was attributed to CN functional group as well as bands arising from interstitial water responses close to 1600 and 3400 cm^{-1} associated with O-H stretch and H-O-H bend, respectively [24]. The wide CN absorption band in PB-INH indicated a variety of cyanides in the structure. Characteristic Fe-CN-Fe bending modes of PB were found in the region between 450 and 650 cm^{-1} .

The most significant part of this investigation was based on the CN stretching mode, which generally exhibits a strong, sharp, and intense absorption peak in the range of 2200-2000 cm^{-1} [25]. The vibrational energy of νCN increased in the following order: PCF-INH < PB-INH < PB. The observation that bridging CN groups (e.g. Fe-CN-Fe) tend to present wavenumbers greater than those of the corresponding terminal groups is due, in part, to the presence of two adjacent positive charge centers [26]. Moreover, when a terminal CN group is H-bonded, there is a change in the corresponding $\nu(\text{CN})$ wavenumber. If one CN group of a $\text{metal}(\text{CN})_6$ unit is H-bonded, the associated metal-ligand stretch will be little changed [26]. The Prussian blue presents more cyanide bonds than PB-INH whereas no bridging CN groups may be found in the PCF-INH. After the Prussian blue oxidation, a definite splitting of the cyanide band may be observed [24]. As only a single cyanide band was found in the samples after the complex synthesis, it is possible to state that a stable product was obtained.

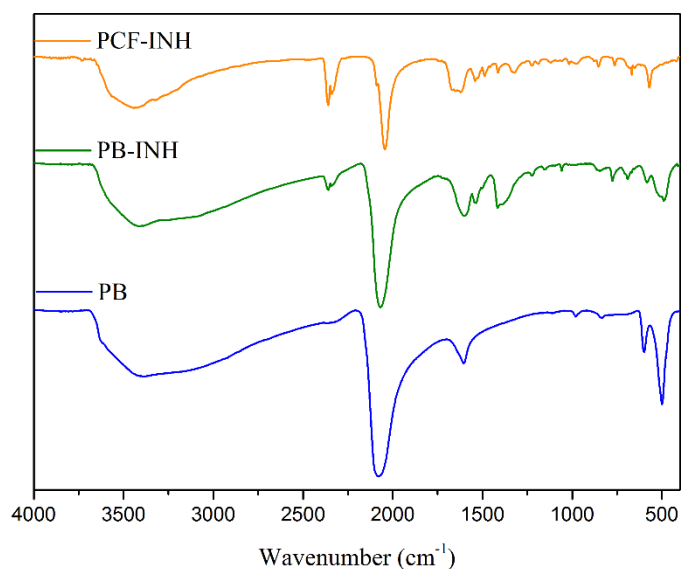


Figure 3. IR spectra of PCF-INH, PB-INH and PB.

3.2 Electrochemical data

The difference in the electrochemical potential of the metal center ($E_{1/2}$) has been the main reason for prioritizing $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ complexes. In a study comparing its InhA enzyme inhibition ability with $[\text{Ru}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ complexes, only the iron complex showed to be effective. The non-activity of the ruthenium complex regarding the iron complex was related to the difference in the electrochemical potential of the metal center [2].

Hydrazides such as isoniazid can be oxidized either chemically by a large number of reagents or electrochemically, yielding mainly acids, aldehydes and esters as oxidation products

[7]. Its oxidation may be facilitated by oxygen, hydrogen peroxide, some metal ions such as Mn^{2+} , Mn^{3+} and Fe^{3+} [27]. Cyclic voltammetry assays were performed for comparing the oxidation potentials of free and coordinated INH. The process O1 ($E_{1/2} = 880$ mV; Figure 4a) was related to irreversible oxidation of INH, which generates $\text{py}-(\text{C}=\text{O})-\text{N}\equiv\text{N}^-$. This product, in turn, interacts with water and leads to the formation of isonicotinic acid, the main product of INH degradation [28].

Pentacyanidoferrate complexes present a well-defined electrochemical process, which is affected by ligand nature. The complex PCF-ammine presented a half-wave potential of 222 mV versus Ag/AgCl, which is attributed to pair $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)]^{3-/4-}$ (Figure 4). The PCF-INH, in turn, demonstrated a half-wave potential in 320 mV versus Ag/AgCl. The presence of the heterocyclic ligand resulted in an increased half-wave potential [29], representing a greater difficulty in removing electron density from iron. A voltammogram of PCF-INH presenting a large scan window, which represents the voltage range between which the substance is neither oxidized nor reduced, was also presented (Figure 4b). An oxidative process may be observed ($E_{1/2} = 1030$ mV) in this sample, which is attributed to the drug. These results indicated effective coordination with increased oxidation of INH.

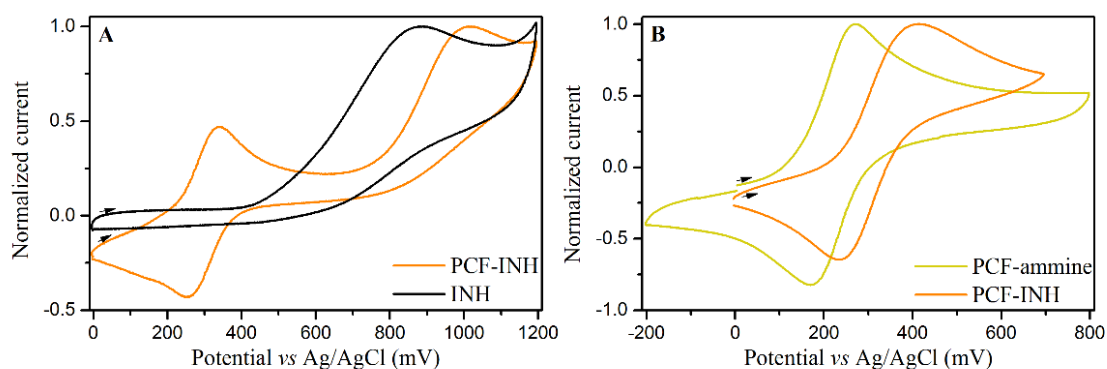
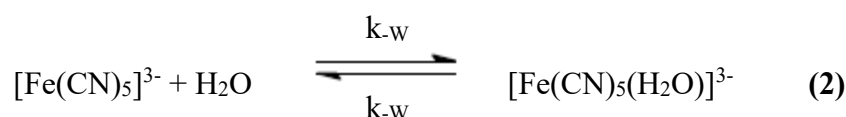
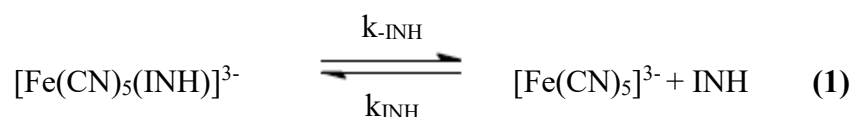


Figure 4. Voltammograms of the aqueous solutions of (A) INH and PCF-INH; (B) PCF-ammine and PCF-INH. A scan rate of 100 mVs^{-1} was considered (supporting electrolyte: $\text{KCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$).

The coordination of INH makes less positive the oxidation potential of this ligand, which could lead to the isoniazid oxidation by other biological compounds. Manganese alone, for example, can induce the aerobic oxidation of INH so as to yield the same products observed for the KatG activation [30].

3.3 *In vitro* kinetic stability of the complexes in different media

In the PCF-DMSO complex, coordination occurs via sulfur atom and the involved transitions cannot be observed in the visible region. Ligand substitution may be monitored by a reduction in the PCF-INH MLCT absorption band. The ligand substitution mechanism is described in Equations 1-3. The ligand transfer constant of the INH is independent of DMSO once the substitution rate varies for pentacyanidoferrates prepared with other ligand agents (this constant varies depending on ligand type).



When the transfer reaction ligands are stronger nucleophiles than water (e.g. INH and DMSO), the formed aquapentacyanidoferrate(II) (Equation 2) is present at very low concentrations and no effect on this mechanism is observed. In excess of DMSO, in turn, ligand substitution has pseudo-first order kinetic profile so that the observed rate constant (K_{obs}) is equivalent to the INH ($k_{\text{-INH}}$) ligand dissociation step (Figure 5). A K_{obs} value of $4.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ may be obtained through Equation 4.

$$K_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{-INH}}k_{\text{DMSO}}[\text{DMSO}]}{k_{\text{-INH}}[\text{INH}] + k_{\text{DMSO}}[\text{DMSO}]} \quad (4)$$

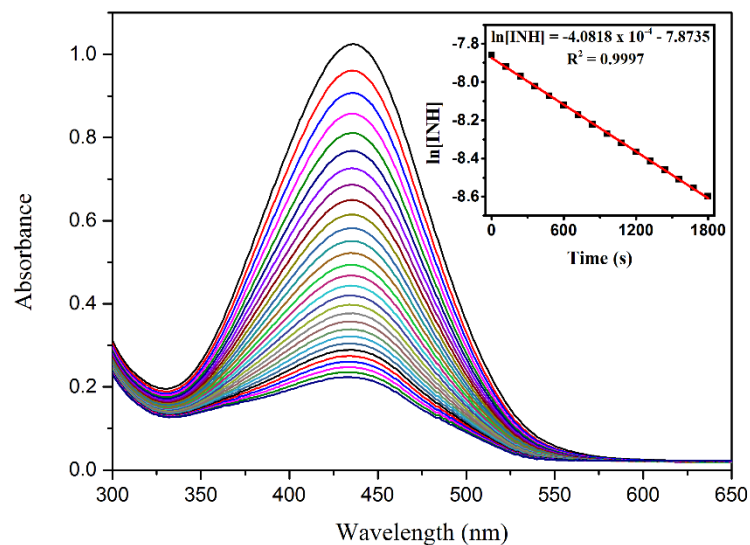


Figure 5. Electronic spectrum of PCF-INH in DMSO solution and linear relationship between $\ln [INH]$ and time.

Assays testing the PCF-INH stability in PBS buffer (pH 7.4) and in water were also performed (Figure 6). A bathochromic displacement was observed in both situations, which may be associated with INH oxidation to isonicotinic acid.

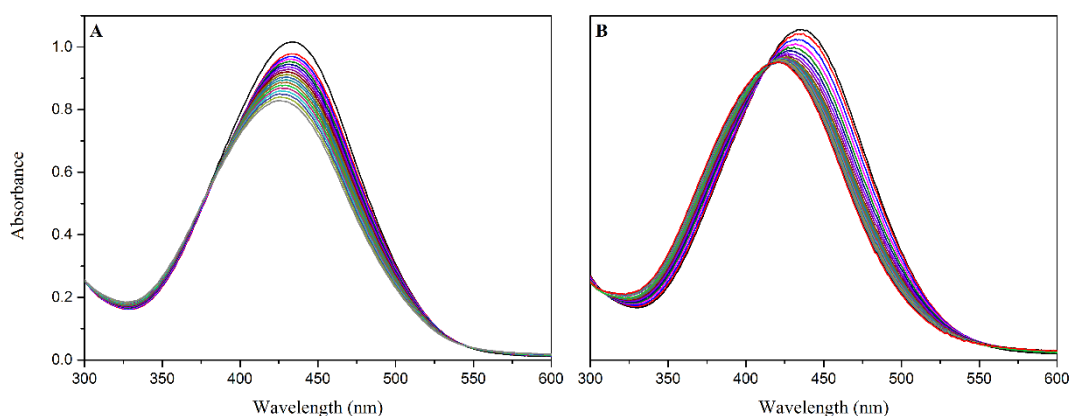


Figure 6. Electronic spectrum of PCF-INH in (A) water and PBS solution (B).

3.4 Determination of composition by Job's method

Considering the complexity to prepare single crystals from coordination polymers, structural information was obtained from Job's method. This technique was considered to evaluate the loss of crystallinity and the consequent increase of the cavities in relation to the

traditional PB. The presence of ligand agents that do not contribute to the formation of cyanide bridges results in increased defects in the structure (cavities).

In this method, as already mentioned, equimolar solutions of metal and ligand were considered (Figure 7). The electronic spectra were evaluated in the intervalence-band transitions of each compound, followed of absorption correction.

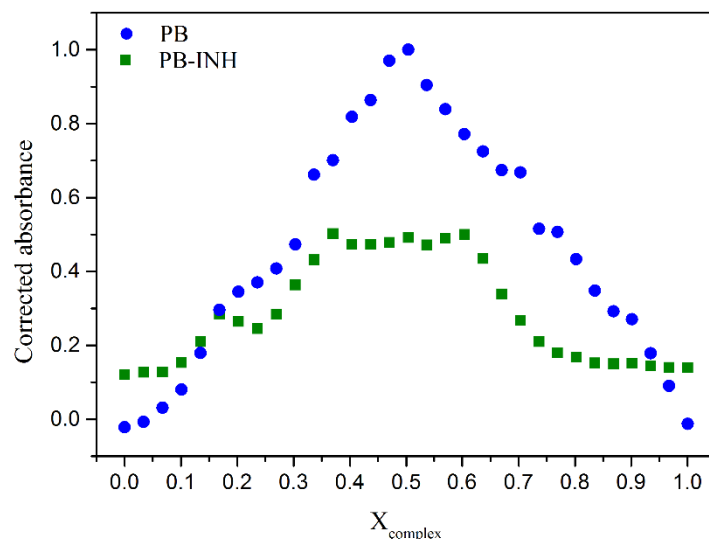
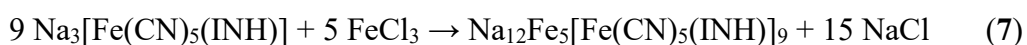
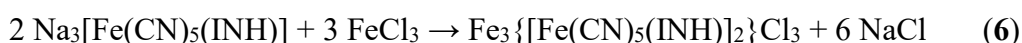
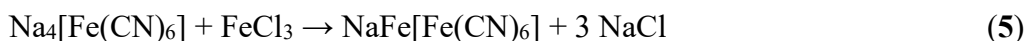


Figure 7. Job's plot obtained from intervalence transition of ferric cyanidoferrate(II) (710 nm to PB and 770 nm to PB-INH). $X_{\text{complex}} = \text{HCF}$ to PB and PCF-INH to PB-INH.

Considering the Lambert-Beer law, the maximum absorption of the curve refers to a higher concentration of the product. While PB displayed an absorbance maximum at $X_{\text{HCF}} = 0.5$, the PB-INH presented an absorbance maximum between $X_{\text{PCF-INH}} = 0.37$ and $X_{\text{PCF-INH}} = 0.63$. Therefore, a ratio of approximately 1:1 for hexacyanidoferrate (HCF):Fe(III) and 2:3 to 9:5 PCF-INH:Fe(III) would be found. The reactions resulting from the complex minimum formula are represented by the equations below (5-7).



The face-centered cubic structure of PB is no longer observed for PB-INH. According to stoichiometry, Fe(III) atoms need to complete their coordination with solvent molecules (water) and may have distinct numbers of coordinated water. The coordination sphere for the metal found at the cavity surface may be completed with water molecules, which contribute to the stabilization of additional water molecules within the cavity through hydrogen-bonding interactions [31]. The presence of INH also makes the presence of PCF-INH parallel to them difficult. In other words, INH is a bulkier ligand than the CN-group, making it difficult the interactions of PCF-INH parallel to the INH group due to steric hindrance (Figure 8c). All these facts result in an increase in cavities and loss of crystallinity in relation to the PB. A large variation in the stoichiometric ratio was observed for PB-INH, making it difficult to estimate the exact ratio of iron atoms to isoniazid molecules, which varies from 2 to 9 molecules per unit cell. In Figure 8b, a PB-INH structure containing nine INH molecules in each unit cell is presented.

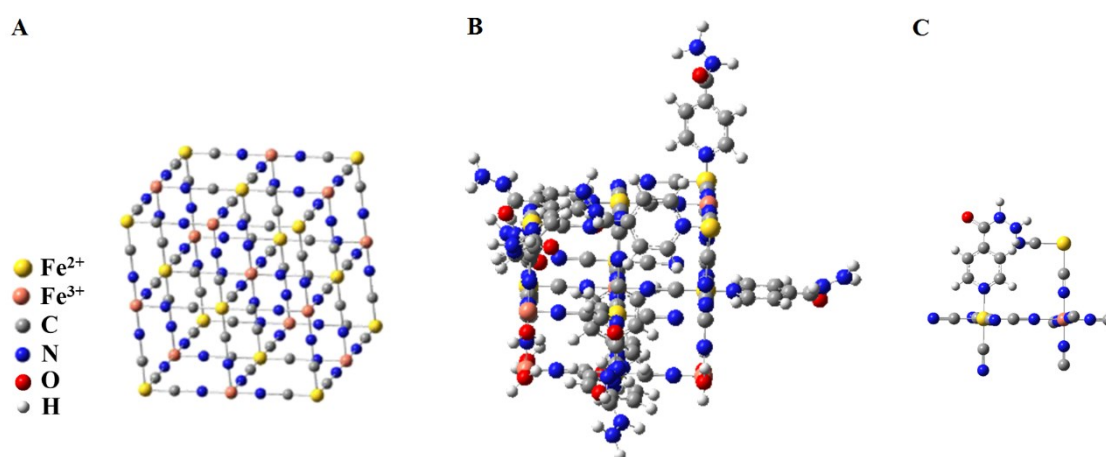


Figure 8. Proposed ferric cyanidoferrate(II) models. A) PB with 1:1 ratio. B) PB-INH with 9:5 PCF-INH ratio. C) A plane of PB-INH model.

3.5 Drug transport studies and *in vitro* dissociation studies

The difference in the electrochemical potential of the metal center ($E_{1/2}$) has been the main reason for prioritizing $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ complexes, as already mentioned. After the aquacomplex formation, INH may be easily oxidized. Consequently, the dissociation of metal complexes may lead to the formation of isonicotinic acid (IA). For this reason, the transbuccal permeability of this compound was also evaluated.

IA showed a transbuccal permeability flux 2.3 times higher than INH (Figure 9; Table 1), which may be attributed to lower molecular size (123.11 vs. 137.14 g mol⁻¹). Both drugs would be transported through the paracellular route considering the hydrophilic nature of these

molecules. Although the lag time value of IA has been slightly lower than that of INH, no statistically significant difference was found for this parameter ($p>0.05$, t -test). INH showed higher retention in the tissue than IA (Figure 10). The rapid diffusion of IA through buccal mucosa and lower affinity by the tissue could explain its higher permeability flux and lower retention in relation to INH.

Table 1. Permeability parameters of isoniazid (INH), isonicotinic acid (IA) and metallic complexes.

Parameter	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	T_L (h)	P ($\text{cm}/\text{h} \times 10^{-3}$)
INH (control)	2.57 ± 0.31	3.07 ± 0.61	1.03 ± 0.12
PCF-INH	$0.83 \pm 0.17^{***}$	$2.01 \pm 0.4^{**}$	$0.33 \pm 0.06^{***}$
PB-INH	$3.77 \pm 0.95^*$	3.10 ± 0.64	$1.5 \pm 0.38^*$
IA	$6.43 \pm 1.72^{**}$	2.94 ± 0.37	$2.57 \pm 0.72^{**}$

Data were represented as mean \pm SD ($n=5$). t -test ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) was considered to compare each tested sample with the control (INH solution). J_s = flux; T_L = lag time; P = coefficient of permeability.

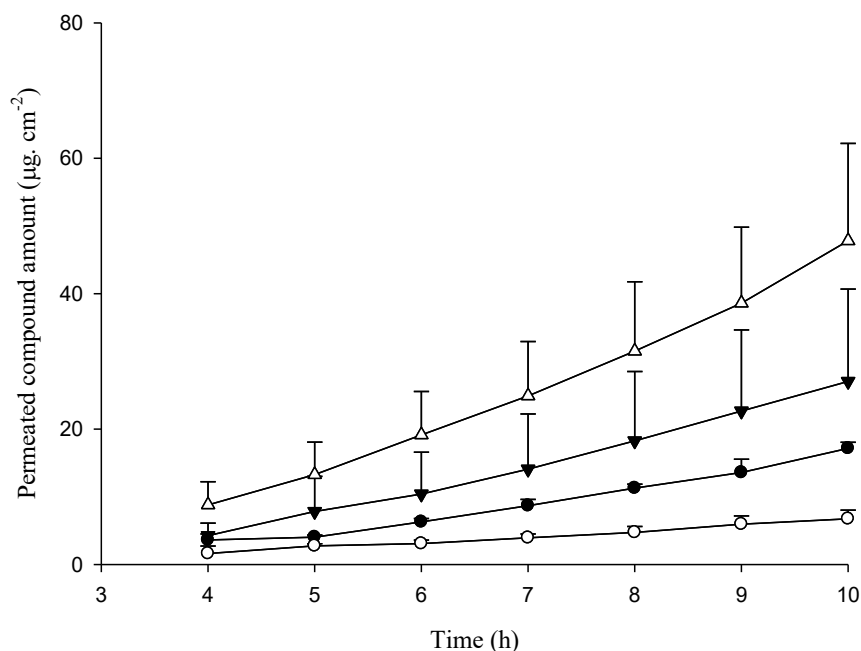


Figure 9. Permeation profile of INH (●), isonicotinic acid (Δ), (○) PCF-INH and (▼) PB-INH AI. Data are presented as mean \pm SD ($n=5$).

PCF-INH and PB-INH, in turn, presented a lower and higher transbuccal permeability rate when compared to the control, respectively. The lag time value for PB-INH was similar to the control whereas a significant reduction in this parameter was observed after treatment with PCF-INH ($p < 0.05$; t -test). Both metal complexes provided a significant reduction of drug amount retained in the buccal mucosa when compared to control (INH), particularly the PCF-INH complex (Figure 10). On the other hand, PB-INH and IA presented similar drug retention ($p > 0.05$, t -test). Therefore, a relationship between retention and permeability results may be established. PCF-INH complex resulted in the lowest drug retention and permeability flux.

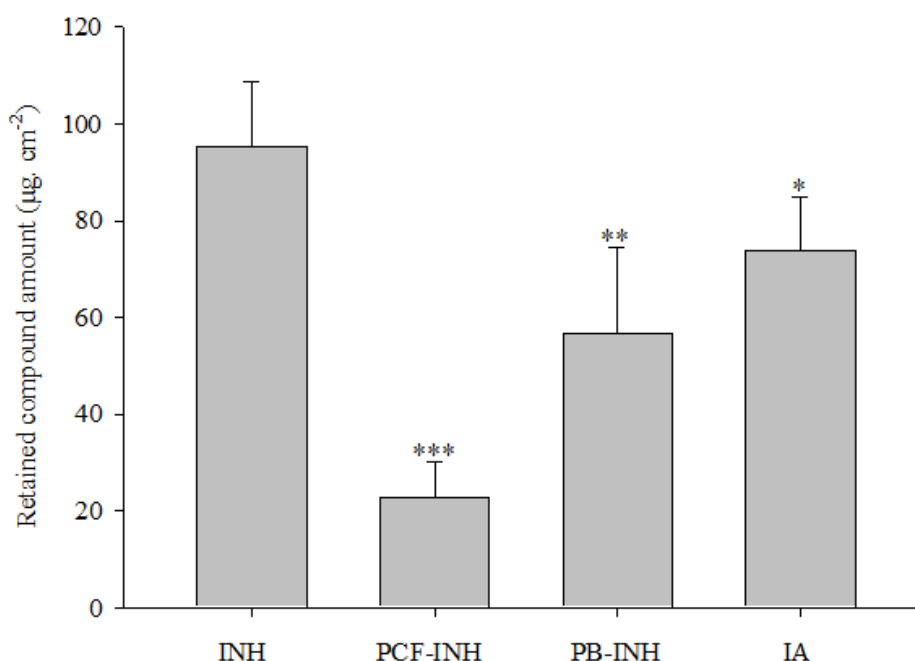


Figure 10. Amount of drug retained in the buccal mucosa after treatment with INH, AI and metallic complexes. Data are represented as mean \pm SD ($n=5$). t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) was considered to compare each tested sample with the control (INH solution).

As a result of complex dissociation, IA was the main product for both metal complexes (Figure 11) due to the rapid oxidation of INH in a metals-rich aqueous medium. PCF-INH provided a rapid IA formation at the initial time period in PBS buffer-based medium, which could explain its shorter lag time value; however, it presented a lower global release rate of IA than PB-INH (slope from cumulative concentration versus time curve; Figure 12). The slower dissociation of PCF may be explained due to its high structural organization. The strongly bonded cyanide forcing the iron(II) to adopt the low spin t_{2g}^6 electronic configuration, with maximum crystal field stabilization [22]. In a stability study performed with the complex

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{INH})]$ in 2 mM of hydrogen peroxide (an oxidizing agent) in phosphate buffer, a high conversion rate of INH to IA was observed [8].

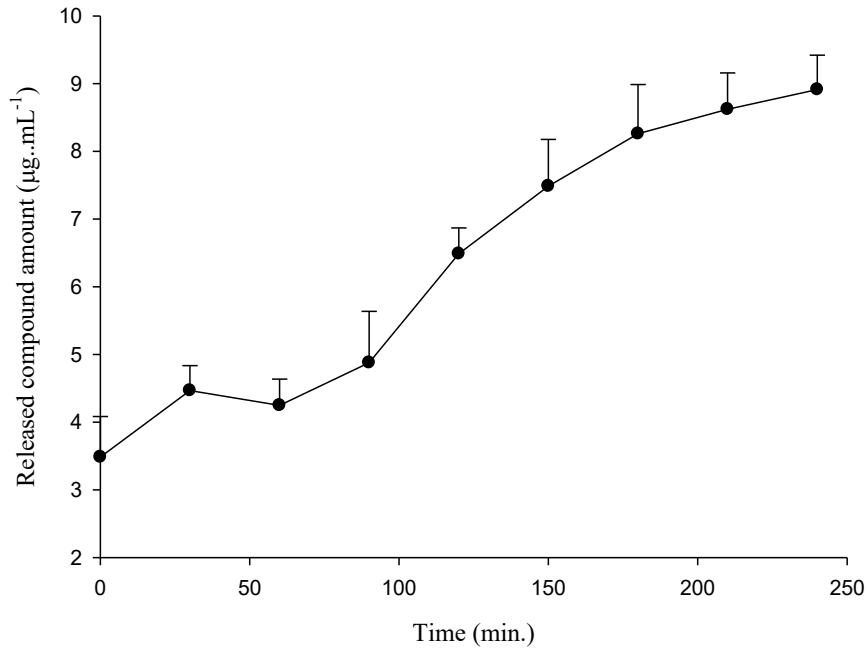


Figure 11. Dissociation profile of the PCF-INH in PBS buffer. (●) Isonicotinic acid

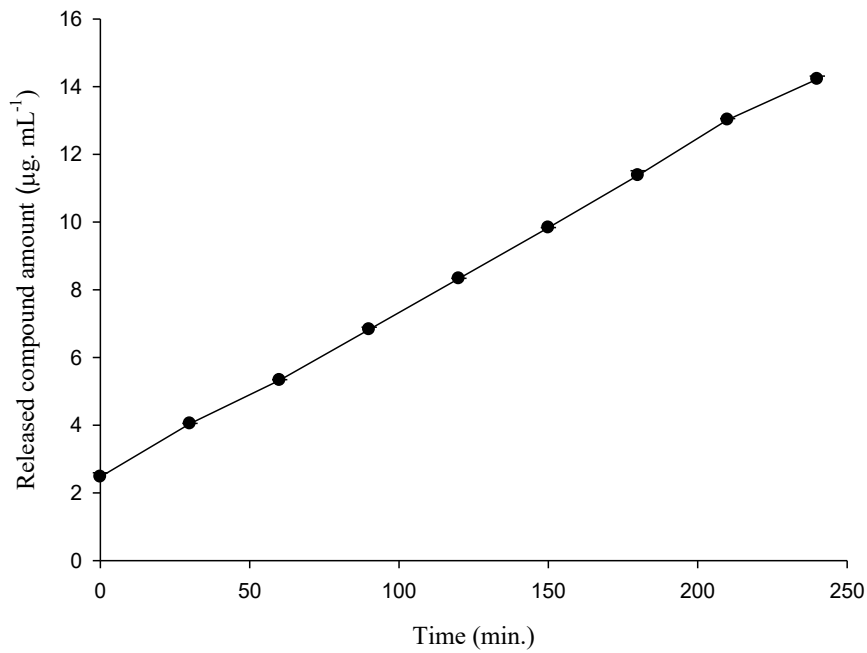


Figure 12. Dissociation profile of the PB-INH in PBS buffer. (●) Isonicotinic acid

The presence of PBS buffer salts had a greater impact on PB-INH than PCF-INH dissociation. Although the donor phase had included only water and metal complexes, an influx of salts from the receptor phase to the donor chamber could occur during the transport studies. Consequently, PB-INH would present a faster dissociation rate, which was also observed in *in vitro* kinetic studies (slope from cumulative concentration versus time curve), explaining its higher buccal permeability when compare to PCF-INH. According to Job's method, PB-INH presents larger a number of structural defects than PB, and thus iron(III) atoms coordinated with water are able to react with phosphate ions, facilitating structure disruption [32]. In this situation, the amount of iron(III) available is higher due to the breakdown of the structure of the PB-INH and thus the oxidation of INH is more pronounced.

Once the PB-INH is characterized by a high molecular size, its passage through the buccal mucosa would make difficult. Therefore, the complex dissociation rate would be responsible to control the drug permeability rate.

In addition, porous PB analogs are highly hydrated solids with both coordinated and weakly bonded water molecules [31] and present a less crystalline structure when compared to traditional PB. Consequently, water access to this structure would be easier, contributing to the rapid release of IA.

A preferential formation of IA from the metal complexes was observed, which seems to play a relevant biological role since it has been suggested that the acyl radical is the "preactive" form of isoniazid *in vivo* [33]. Despite debates on INH activation mechanisms, several studies have suggested that an acyl radical (isonicotinic acyl) is the actual active INH intermediate [34, 35]. As a consequence, high concentration or a longer lifetime for this radical could improve the performance of INH on *Mycobacterium* due to a greater chemical reactivity [2].

4. CONCLUSIONS

INH-based metal complexes may be efficiently administered through the buccal route as an alternative to improve oral bioavailability and microbial resistance problems. PB-INH presents a higher dissociation rate in the salt-rich aqueous medium, leading to the formation of isonicotinic acid, which is rapidly transported through the buccal mucosa. As the metal complex presents a high molecular size, its passage through the tissue would not be possible. PCF-INH, in turn, presents a lower dissociation rate in salt-rich aqueous medium and

a more organized structure, justifying its slower transport rate through the tissue. These metal complexes could be stabilized in a solid dosage form for later delivery to the buccal mucosa. The application of these complexes for the treatment of rare oral disorders caused by *Mycobacterium* could also be considered, specifically those metals that suffer dissociation prior to absorption. Additional *in vivo* studies are needed to confirm these benefits/advantages.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the Brazilian governmental agencies CNPq/MCTI (Universal 01/2016 - Grant number: 408229/2016-0) and CAPES for financial support and student scholarships, respectively. The authors would also like to thank Analytical Centre from the Chemistry Department/UFSC for technical support.

REFERENCES

1. Oliveira JS, Sousa EHS, Basso LA, et al (2004) An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun* 4:312–313. <https://doi.org/10.1039/b313592f>
2. Rodrigues-Junior VS, Dos Santos Junior A, Dos Santos AJ, et al (2012) Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Antimicrob Agents* 40:182–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.019>
3. Blanchard JS (1996) Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 65:215–239. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001243>
4. Schroeder EK, de Souza N, Santos DS, et al (2002) Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol* 3:197–225. <https://doi.org/10.2174/1389201023378328>
5. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST (2002) Effect of katG mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 70:4955–4960. <https://doi.org/10.1128/iai.70.9.4955-4960.2002>
6. Ramaswamy S V, Reich R, Dou S-J, et al (2003) Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1241–1250. <https://doi.org/10.1128/aac.47.4.1241-1250.2003>

7. Aguiar I de, Tavares A, Roveda ACJ, et al (2015) Antitubercular activity of Ru (II) isoniazid complexes. *Eur J Pharm Sci* 70:45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.008>
8. Sousa EHS, De Mesquita Vieira FG, Butler JS, et al (2014) $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]_3^-$: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. *J Inorg Biochem* 140:236–244. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.002>
9. Teo RD, Termini J, Gray HB (2016) Lanthanides: applications in cancer diagnosis and therapy. *J Med Chem* 59:6012–6024. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01975>
10. Basso LA, Schneider CZ, Dos Santos AJAB, et al (2010) 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* 21:1384–1389. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700026>
11. Gazzì TP, Rotta M, Villela AD, et al (2017) Synthesis, inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and antimycobacterial activity of novel pentacyanoferrate(II)-isonicotinoylhydrazones. *J Braz Chem Soc* 28:2028–2037
12. Abbadi BL, Rodrigues-Junior V da S, Dadda A da S, et al (2018) Is IQG-607 a potential metallo-drug or metallo-pro-drug with a defined molecular target in *Mycobacterium tuberculosis*? *Front Microbiol* 9:1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00880>
13. Abbadi BL, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, et al (2018) Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:. <https://doi.org/10.1128/AAC.02222-17>
14. Kakisi OK, Kechagia AS, Kakisis IK, et al (2010) Tuberculosis of the oral cavity: A systematic review. *Eur J Oral Sci* 118:103–109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00725.x>
15. Arora KS, Garg S, Kaur P, Mohapatra S (2018) Primary oral tuberculosis on the tongue mimicking squamous cell carcinoma. *Indian J Tuberc* 65:84–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2016.09.019>
16. Tandon D, Bhandari D, Lamba D, et al (2019) Literature review of oral tuberculosis and report of a case with unique histological presentation. *Indian J Tuberc*. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2019.02.019>
17. Oliveira J, de Sousa E, de Souza O, et al (2006) Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Curr Pharm Des* 12:2409–2424. <https://doi.org/10.2174/138161206777698927>
18. Hirose S, Yasutomi M, Murai N, et al (1970) A modified method of the prussian blue reaction for the histochemical demonstration of iron, and its application to the colloidal iron reaction of acid mucopolysaccharides. *Acta Histochem Cytochem* 3:18–27. <https://doi.org/10.1267/ahc.3.18>

19. de Vries ME, Boddé HE, Verhoef JC, et al (1991) Localization of the permeability barrier inside porcine buccal mucosa: a combined *in vitro* study of drug permeability, electrical resistance and tissue morphology. *Int J Pharm* 76:25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90340-T](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90340-T)
20. Caon T, Campos CEM, Simoes CMO, Silva MAS (2015) Novel perspectives in the tuberculosis treatment: administration of isoniazid through the skin. *Int J Pharm* 494:463–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.067>
21. Formiga ALB, Vancoillie S, Pierloot K (2013) Electronic spectra of N-heterocyclic pentacyanoferrate(II) complexes in different solvents, studied by multiconfigurational perturbation theory. *Inorg Chem* 52:10653–10663. <https://doi.org/10.1021/ic401704r>
22. Naik R, Prasad S, Yadav S, et al (2012) The formation of an antitubercular complex [Fe(CN)₅(INH)]³⁻ through mercury(II)-catalyzed ligand substitution reaction: a kinetic and mechanistic study. *Int J Chem Kinet* 44:398–406. <https://doi.org/10.1002/kin.20581>
23. Moreira I, Franco D (1994) Ruthenium(II) and iron(II) complexes of 4,4-dithiodipyridine. Synthesis, characterization and reactivity studies. *Inorg Chem* 33:. <https://doi.org/10.1021/ic00086a009>
24. Kulesza P, Malik M, Denca A, Strojek J (1996) In situ FT-IR/ATR spectroelectrochemistry of Prussian blue in the solid state. *Anal Chem* 68:2442–2446. <https://doi.org/10.1021/ac950380k>
25. Dehnicke K (1976) The chemistry of cyano complexes of the transition metals. *Organometallic chemistry - A series of monographs*. Von A. G. Sharpe. Academic Press, London-New York-San Francisco 1976. 1. Aufl., XI, 302 S., geb. £ 10.40. *Angew Chemie* 88:774. <https://doi.org/10.1002/ange.19760882225>
26. Kettle S, Diana E, Marchese E, et al (2011) The vibrational spectra of the cyanide ligand revisited: the $\nu(\text{CN})$ infrared and Raman spectroscopy of Prussian blue and its analogues. *J Raman Spectrosc* 42:2006–2014. <https://doi.org/10.1002/jrs.2944>
27. Dong J, Ren Y, Sun S, et al (2017) Kinetics and mechanism of oxidation of the anti-tubercular prodrug isoniazid and its analog by iridium(IV) as models for biological redox systems. *Dalton Trans* 46:8377–8386. <https://doi.org/10.1039/c7dt00885f>
28. Majidi M, Jouyban A, Asadpour-Zeynali K (2006) Voltammetric behavior and determination of isoniazid in pharmaceutical by using overoxidized polypyrrole glassy carbon modified electrode. *J Electroanal Chem* 589:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.01.016>
29. Toma HE, Malin JM (1973) Kinetics of formation and stability constants of some pentacyanoferrate(II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles. *Inorg Chem* 12:2080–2083. <https://doi.org/10.1021/ic50127a026>
30. Magliozzo RS, Marcinkeviciene JA (1997) The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of the antibiotic isoniazid. *J Biol Chem*

272:8867–8870. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.8867>

31. Krap C, Balmaseda J, del Castillo L, et al (2010) Hydrogen storage in Prussian blue analogues: H₂ interaction with the metal found at the cavity surface. *Energy fuels* 581–589. <https://doi.org/10.1021/ef900823s>

32. Monteiro M, Toledo KC, Pires B, et al (2017) Improvement of efficiency of electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide by Prussian blue produced from [Fe(CN)₅(mpz)]²⁻ complex. *Eur J Inorg Chem* 2017:.. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601540>

33. Zhang Y (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:529–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120>

34. Bodiguel J, Nagy JM, Brown KA, Jamart-Gregoire B (2001) Oxidation of isoniazid by manganese and *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase yields a new mechanism of activation. *J Am Chem Soc* 123:3832–3833. <https://doi.org/10.1021/ja002674f>

35. Amos RIJ, Gourlay BS, Schiesser CH, et al (2008) A mechanistic study on the oxidation of hydrazides: application to the tuberculosis drug isoniazid. *Chem Commun (Camb)* 1695–1697. <https://doi.org/10.1039/b719570b>

5 DISCUSSÃO GERAL

Embora a INH tenha sido utilizada como fármaco de primeira escolha no tratamento da TB desde 1952, efeitos hepatotóxicos podem limitar sua aplicação clínica e levar ao abandono do tratamento. Desta forma, avaliar a absorção da INH por rotas alternativas, evitando o metabolismo de primeira passagem e, conseqüentemente, os danos hepáticos, parece ser uma estratégia promissora. O grupo de pesquisa a que estou inserida já avaliou a absorção cutânea da INH em um estudo prévio (CAON *et al.*, 2015). Neste trabalho, considerou-se o impacto de três diferentes promotores de absorção (limoneno, mentol e Transcutol[®]); utilizando-se pele de orelha suína como modelo de membrana. Limoneno, o terpeno mais lipofílico, promoveu uma maior desestruturação da pele, o que contribuiu para uma maior permeação. Ainda que os resultados tenham sido promissores com relação ao grau de absorção encontrado, há de se considerar que a pele de porco tem maior número de folículos comparativamente a humana. Como consequência, a INH apresentaria maior grau de absorção na pele de porco. A INH é transportada pela pele através dos folículos pilosos tendo em vista sua natureza hidrofílica. Outro aspecto que merece ser mencionado é a variação da permeação de moléculas hidrofílicas em função do sexo. Em geral, mulheres apresentam menor número de folículos pilosos que os homens.

Considerando que estas variações poderiam ser observadas clinicamente com a administração transdérmica da INH, trazendo impactos diretos sobre a eficácia, estudos com a mucosa bucal poderiam ser alternativamente considerados. Além de possibilitar a entrega do fármaco na circulação sistêmica via veia jugular interna, evita a metabolização de primeira passagem. Com uma maior absorção, a dose administrada poderia ser reduzida e, conseqüentemente, os efeitos adversos. Em geral, a mucosa bucal também se mostra mais permeável que a pele (BOBADE *et al.*, 2013), o que seria uma vantagem extremamente relevante. Embora raros, casos de tuberculose extrapulmonar na cavidade oral podem também ser observados e ainda não existem alternativas para o tratamento local desta patologia.

A isoniazida é uma molécula hidrofílica ($\log P=0,7$), de baixo peso molecular (137,14 g/mol), que seria preferencialmente transportada através da rota intercelular da mucosa bucal. Nos espaços intercelulares desta rota, há lipídeos que formam uma barreira à permeabilidade de fármacos, particularmente aos hidrofílicos. Por esta razão, foram selecionados diferentes promotores de absorção com base em estudos já realizados com fármacos hidrossolúveis. Dentre os promotores de absorção com ação já bem conhecidos, selecionaram-se dois

tensoativos com características físico-químicas distintas, o SDS e o ST, e um polímero, a quitosana. Esta última interage com o muco via interações eletrostáticas (a quitosana é carregada positivamente enquanto o muco tem carga total negativa), prolongando o tempo de contato/residência do fármaco na mucosa. Além de avaliar os parâmetros de permeabilidade com o modelo da câmara de Franz, estudos espectroscópicos e de espalhamento de luz foram realizados para um maior entendimento da interação química da INH com os promotores químicos e caracterização físico-química dos sistemas micelares (potencial zeta, tamanho). Estas técnicas também foram cruciais para a identificação de estruturas micelares.

O SDS aprimorou a permeabilidade da INH uma vez que aumentou o seu coeficiente de permeabilidade em aproximadamente 11 vezes em comparação ao controle (solução de INH). Além disso, o SDS aumentou a retenção da INH na mucosa em 2,85 vezes em relação ao controle. O transporte aumentado de fármacos hidrofílicos pela presença de SDS também foi observada em outros estudos (DHIMAN; DHIMAN; SAWANT, 2009; HANSEN *et al.*, 2018; NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2004; RAMBHAROSE *et al.*, 2014). Um dos mecanismos atribuídos ao SDS é a formação de micelas capazes de extraírem os lipídeos intercelulares, que exercem uma função de barreira, tornando a via paracelular ainda mais hidrofílica (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2004).

A concentração de SDS utilizada no estudo resultou na formação de estruturas micelares, o que foi confirmado pelas análises de tamanho. A análise do potencial zeta das micelas não sofreu alteração em presença da INH, sugerindo a inexistência de interações eletrostáticas entre o fármaco e a micela do SDS. De fato, o fármaco não se encontra na forma ionizada no valor de pH em que o estudo foi realizado (pH=6,8). Por outro lado, análises espectroscópicas sugeriram a ocorrência de interações entre o fármaco e o SDS, pela redução gradativa da absorvância da INH com o aumento da concentração de SDS. Interações não eletrostáticas seriam observadas entre estes constituintes. Mesmo assim, o SDS apresentou interação com a mucosa, já que aumentou tanto a permeabilidade quanto a retenção da INH na mucosa bucal. A cabeça polar do tensoativo é a região mais provável de interação com a INH enquanto sua porção hidrofóbica estaria disponível para interação com as membranas lipídicas, que tem natureza reconhecidamente hidrofóbica.

Para o ST, considerou-se uma concentração de 10 mM (próxima da CMC) nos ensaios de permeabilidade. O tensoativo não foi efetivo na melhora da permeabilidade da INH. Apesar de ter ocorrido a formação de micelas, análises do potencial zeta e espectroscópicas sugeriram a não existência de interações com a INH. Isto explicaria o fato do tratamento com ST ter

resultado em um coeficiente de permeabilidade similar ao controle. No estudo realizado por Poelma e colaboradores (1990), sugeriu-se que o ST interage preferencialmente com fármacos lipofílicos, o que não seria o caso deste ativo. Em outros estudos, os autores sugerem que o ST é efetivo como promotor de absorção apenas para concentrações de 2 até 10 vezes acima da sua CMC (MAHALINGAM *et al.*, 2007; NIELSEN; RASSING, 1999).

Já no caso da quitosana, acredita-se que a não interferência na permeabilidade possa ter ocorrido pela remoção do muco durante o transporte e/ou preparo das mucosas e alta viscosidade da solução de quitosana. Como a solução de INH foi adicionada posteriormente a solução de quitosana, uma camada difusional adicional pode ter sido formada, explicando a redução da permeabilidade do fármaco.

Dentre os promotores testados, o SDS foi o mais efetivo e, desta forma, poderia ser posteriormente incluído em uma formulação bioadesiva com o propósito de otimizar a absorção da INH. Embora sua utilização seja condenada por alguns pesquisadores devido a possibilidade de lise celular, cabe ressaltar que este estudo foi realizado considerando baixa concentração deste agente e que a mucosa bucal apresenta rápida capacidade de recuperação. Além disto, este agente é ingrediente de diversos cosméticos utilizados na higiene bucal.

A resistência microbiana ocorre em cerca de 10,7% dos casos novos de TB, sendo ainda mais comum nos casos de retratamento (29,0%). Foram identificadas 15 diferentes regiões onde podem ocorrer mutações genéticas que conferem resistência à INH, no entanto, a mutação mais frequente (50 a 95%) é a que ocorre com a enzima *KatG*. Como a INH é um pró-fármaco, problemas de resistência geralmente envolvem mutações em genes de enzimas envolvidas na sua ativação. Frente a isto, o preparo de complexos metálicos de fármacos tem se mostrado uma estratégia promissora, já que os mecanismos de ativação são simplificados, ou seja, observa-se uma auto-ativação. O PCF-INH, por exemplo, vem sendo investigado por vários grupos de pesquisa (LABORDE *et al.*, 2018; NAIK *et al.*, 2013; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014), já incluindo confirmação de atividade frente a cepas resistentes (BASSO *et al.*, 2010). Por apresentar baixa biodisponibilidade oral, despertou o interesse quanto a busca de uma rota alternativa para aumentar sua absorção e, por esta razão, a mucosa transbucal foi explorada. Além disso, um segundo complexo metálico, inédito, obtido a partir do azul da Prússia foi incluído no estudo.

Após a formação do aquapentacianidoferrato(II) (aqua complexo), a INH pode ser facilmente oxidada e, conseqüentemente, a dissociação dos complexos metálicos pode levar à formação de ácido isonicotínico. Desta forma, foi necessário também avaliar o perfil de

permeabilidade deste composto que, por sua vez, apresentou um fluxo de permeabilidade transbucal 2,3 vezes maior que o da INH, o que pode ser atribuído ao menor tamanho molecular (123,11 vs. 137,14 g mol⁻¹).

Para o PCF-INH, os valores de fluxo, coeficiente de permeabilidade e a retenção na mucosa bucal, foram significativamente inferiores ao controle (INH). O PCF apresenta alta organização estrutural e devido ao cianeto estar fortemente ligado, força o ferro (II) a adotar uma configuração eletrônica de baixo spin t_{2g}^6 , com estabilização máxima do campo cristalino (NAIK *et al.*, 2012). Já no caso do PB-INH, obteve-se uma taxa de permeabilidade maior que o controle (solução de INH). Por outro lado, este complexo proporcionou menor retenção do fármaco na mucosa que o controle (INH), porém, não se observou diferença estatística em relação ao ácido nicotínico (AI).

Para uma maior compreensão a respeito dos resultados de permeabilidade, estudos de dissociação dos complexos em meio tamponado (tampão fosfato-salino) foram realizados. AI foi o principal produto para ambos os complexos, provavelmente pela rápida oxidação da INH em um meio rico em sais. O PCF-INH apresentou uma rápida formação de AI em tampão PBS nos intervalos iniciais, no entanto, apresentou uma taxa de liberação global (inclinação da reta que relaciona a quantidade de AI dissociada ao longo do tempo) mais baixa que o PB-INH. A dissociação mais lenta do PCF-INH pode ser explicada devido à sua alta organização estrutural. Já no caso do PB-INH, a presença dos sais do tampão PBS teve maior impacto na dissociação deste complexo. Isto ocorre porque o PB-INH apresenta defeitos estruturais e os átomos de ferro (III) coordenados com água são capazes de reagir com os íons fosfato, facilitando a ruptura da estrutura. Com a presença de maior quantidade de ferro (III) livre devido à quebra da estrutura do PB-INH, ocorre uma oxidação ainda mais acentuada da INH.

Observou-se uma formação preferencial de IA a partir dos complexos metálicos, que parece desempenhar um papel biológico relevante, uma vez que as espécies ativas do radical acila isonicotínicas reagem com NAD, formando um aduto INH-NAD, que inibe a enzima Inha (ZHANG, 2005). Como consequência, a alta concentração ou uma vida útil mais longa para esse radical podem melhorar o desempenho da INH no *Mycobacterium tuberculosis* devido a uma maior reatividade química (SOUSA *et al.*, 2012). Ao contrário da INH, estes complexos metálicos não necessitam de ativação via katG, o que os torna muito mais atrativos para tratar casos de resistência microbiana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Alta taxa de permeabilidade e rápida difusão da INH através da via transbucal foi encontrada, sugerindo que esta rota é promissora para a sua administração.
- O SDS foi o promotor de permeabilidade mais efetivo, aumentando o valor de fluxo de permeabilidade em 11 vezes em relação ao controle (solução de INH). Não se observou interação eletrostática entre o tensoativo e o fármaco, porém, outro tipo de interação química ocorre entre estes constituintes, como sinalizado nas análises de espectroscopia UV.
- A INH, por ser de natureza hidrofílica, provavelmente interage com a extremidade polar das micelas de SDS. Já a parte hidrofóbica interage com a mucosa, extraíndo os lipídeos intercelulares, deixando esta via ainda mais atrativa para o fármaco.
- Taurocolato de sódio (ST) não foi efetivo como promotor de absorção e interações químicas INH-ST ou do tensoativo com a mucosa não foram observadas. Testes de permeabilidade adicionais variando-se a concentração de ST deveriam ser realizados.
- A quitosana não alterou os parâmetros de permeabilidade da INH, o que pode ser justificado pela maior viscosidade da solução (fármaco se difunde lentamente na solução) e remoção do muco durante preparo dos tecidos.
- O complexo PB-INH mostrou uma maior taxa de transporte bucal, o que pode ser atribuído a alta taxa de dissociação em meio aquoso rico em sais e a presença de defeitos estruturais.
- O PCF-INH é estruturalmente altamente organizado, o que contribuiria para uma menor taxa de dissociação em meio aquoso e, conseqüentemente, menor taxa de transporte transbucal.
- Análises de voltametria cíclica sugerem que os complexos PB-INH e PCF-INH são ativados em meio rico em sais, dispensando a ação da enzima catalase-peroxidase.
- PCF-INH e PB-INH podem ser administrados pela via transbucal como alternativa para driblar tanto problemas de resistência microbiana quanto hepatotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- BASSO, Luiz 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 1384–1389, 2010.
- BOBADE, Nishan N. *et al.* A review on buccal drug delivery system. **International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 35–40, 2013.
- CAON, Thiago *et al.* Novel perspectives in the tuberculosis treatment: Administration of isoniazid through the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 494, n. 1, p. 463–470, 2015.
- DHIMAN, Munish Kumar; DHIMAN, Anupama; SAWANT, Krutika K. Transbuccal delivery of 5-fluorouracil: permeation enhancement and pharmacokinetic study. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 258–265, 2009.
- HANSEN, Stine Egebro *et al.* Buccal delivery of small molecules – Impact of levulinic acid, oleic acid, sodium dodecyl sulfate and hypotonicity on *ex vivo* permeability and spatial distribution in mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 133, n. August, p. 250–257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.016>
- LABORDE, Julie *et al.* Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 179, n. November 2017, p. 71–81, 2018.
- MAHALINGAM, Ravichandran *et al.* Transbuccal delivery of 5-aza-2 -deoxycytidine: effects of drug concentration, buffer solution, and bile salts on permeation. **AAPS PharmSciTech**, United States, v. 8, n. 3, p. E55, 2007.
- NAIK, Radhey *et al.* The formation of an antitubercular complex [Fe(CN)5(INH)]³⁻ through mercury(II)-catalyzed ligand substitution reaction: a kinetic and mechanistic study. **International Journal of Chemical Kinetics**, [S. l.], v. 44, 2012.
- NICOLAZZO, Joseph A.; REED, Barry L.; FINNIN, Barrie C. Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 431–440, 2004.
- NIELSEN, H. M.; RASSING, M. R. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: III. Permeability enhancement by different pH values, different osmolality values, and bile salts. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 185, n. 2, p. 215–225, 1999.
- POELMA, Fred G. J.; BREÄS, Ria; TUKKER, Josef J. Intestinal absorption of drugs. III. The influence of taurocholate on the disappearance kinetics of hydrophilic and lipophilic drugs from the small Intestine of the rat. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 392–397, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1015827624296>

RAMBHAROSE, Sanjeev *et al.* High-energy ball milling of saquinavir increases permeability across the buccal mucosa. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, England, v. 40, n. 5, p. 639–648, 2014.

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. *et al.* IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 82–85, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021>

SOUSA, Eduardo Henrique Silva *et al.* Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 275–283, 2012.

SOUSA, Eduardo Henrique Silva *et al.* [Fe(CN)₅(isoniazid)]₃ -: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 140, p. 236–244, 2014.

ZHANG, Ying. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, United States, v. 45, p. 529–564, 2005.