UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

GIULIA POLINÁRIO

Desenvolvimento do composto 5d como um novo candidato a fármaco para o tratamento da tuberculose: caracterização pré-clínica e sistema de liberação baseado em nanoesponjas de β-ciclodextrina.

Araraquara
2026

GIULIA POLINÁRIO

Desenvolvimento do composto 5d como um novo candidato a fármaco para o tratamento da tuberculose: caracterização pré-clínica e sistema de liberação baseado em nanoesponjas de β-ciclodextrina.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Área de concentração: Análises Clínicas

Araraquara

2026

P768d

Polinário, Giulia
Desenvolvimento do composto 5d como um novo candidato a fármaco para o tratamento da tuberculose : caracterização pré-clínica e sistema de liberação baseado em nanoesponjas de -ciclodextrina. / Giulia Polinário. -- Araraquara, 2026
30 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara
Orientador: Fernando Rogério Pavan

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. tuberculose resitente. 3. -ciclodextrina. 4. nanoesponja. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento do composto 5d como um novo candidato a fármaco para o tratamento da tuberculose: caracterização pré-clínica e sistema de liberação baseado em nanoesponjas de β-ciclodextrina

AUTORA: GIULIA POLINÁRIO
ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área de conhecimento: Bacteriologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Dr. SERGIO ENRIQUE MOYA (Participaçao Virtual)
Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales

Prof. Dr. ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmácia / Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA (Participaçao Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Araraquara, 24 de julho de 2026.

Dedico este trabalho ao meu filho, Matheus.
Esta tese representa a conquista do título de doutora, fruto de anos de estudo, dedicação e perseverança. Mas ela também marca o período em que recebi outro título que mudou a minha vida para sempre: o de mãe.
Enquanto esta pesquisa tomava forma, você aprendia a dar os primeiros passos. Duas conquistas que caminharam lado a lado e transformaram profundamente quem eu sou!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que escolheu abrir mão de qualquer outra profissão pra cuidar de mim e dos meus irmãos. Ela é a minha melhor amiga, a minha inspiração de ser mãe. Obrigada por TUDO, me faltam palavras pra descrever o tamanho do meu amor, gratidão, e principalmente a vontade de te carregar comigo por onde for.

Ao meu pai, o profissional no qual eu cresci me espelhando. Obrigada por tanto incentivo e apoio. Obrigada por me permitir a dedicação exclusiva aos estudos, por acreditar tanto em mim. e incentivo de hoje.
Aos dois, obrigada pelas oportunidades que me proporcionaram!

À minha irmã, e hoje comadre, pela parceria e cuidado de irmã mais velha, sendo mais nova. Obrigada por ir além do sentido literal da palavra e ser irmã de coração, além do sangue. Obrigada por confiar em mim o seu bem mais precioso, e principalmente por amar o Matheus como se fosse seu.

Ao meu irmão por me permitir sentir pela primeira vez o amor de mãe. Ser sua irmã mais velha e ajudar no seu crescimento foi o que me ensinou o maior amor do mundo.

À minha esposa por nunca ter hesitado em me apoiar, em me dar o privilégio de continuar tendo as oportunidades que sempre tive, e principalmente por ter sido a maior motivadora do meu estágio no exterior. Sem você, essa incrível experiência não teria sido possível. Obrigada por ser minha companheira, por ser a melhor pessoa pra dividir a maternidade comigo, e principalmente por ser a pessoa que eu sempre quis ter ao meu lado.

À minha família que se faz presente com todo o amor, carinho e apoio. É um privilégio ter todos vocês ao meu lado todos os dias, mesmo quando eu tomo decisões que vocês não concordam. Obrigada por escolherem amar a minha família e permanecerem sendo os meus melhores amigos.
Aos meus amigos do “Laboratório de Pesquisa em Tuberculose” por todos os ensaios juntos, todos os ensinamentos, trocas, terapias em grupo, fofocas e parcerias. Foi um

prazer dividir o ambiente de trabalho com vocês, onde eu aprendi muito mais do que fazer pesquisa.

Aos meus amigos do grupo “Soft Matter Nanotechnology” por toda a paciência em me apresentar esse mundo tão diferente de um instituto de pesquisa. Vocês fizeram dessa experiência, inesquecível! Ter profissionais tão diversificados ao meu lado me trouxe uma visão de mundo e experiências gastronômicas sensacionais.

Ao meu supervisor Sérgio Moya por não hesitar em me dar a oportunidade de parceria internacional e ao incrível pesquisador Paolo Di Gianvincenzo pelos ensinamentos e crescimento que me proporcionaram durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada CIC biomaGUNE e todos os funcionários por sempre me fazer sentir em casa.

Ao meu orientador, Fernando R. Pavan, por acreditar no meu potencial e incentivar o meu crescimento. Obrigada por me fazer enxergar além! Hoje sou mestre e doutora por você ter me dado oportunidade, orientação e apoio durante toda essa trajetória.

Aos professores parceiros deste trabalho e futuro artigo de dados científicos. Quanto orgulho do trabalho que desenvolvemos juntos!

Aos membros da banca examinadora, tanto do exame de qualificação quanto desta dissertação, por sua disposição em analisar e contribuir para a finalização deste trabalho.

À UNESP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas que já é minha segunda casa há quase 13 anos e à toda equipe de funcionários que sempre me acolheu tão bem. Que orgulho imenso dizer que sou unespiana!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processos 2022/03511-5 e 2023/16045-5.

“If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants.”

Isaac Newton 1676

RESUMO

A tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), permanece entre as principais causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo, agravada pela crescente disseminação de cepas resistentes aos fármacos disponíveis. Nesse contexto, o composto 1-[1- (4- clorofenil)- 2,5- dimetil- 1H- pirrol- 3- il]- N- (ciclohexilmetil) metanamina (5d), derivado pirrólico obtido a partir da combinação racional das estruturas de SQ109 e BM212, foi previamente identificado pelo nosso grupo como um promissor candidato antituberculose. Entretanto, sua baixa solubilidade em meio aquoso e seu perfil toxicológico limitam sua aplicação terapêutica. Dessa forma, esta tese teve como objetivo aprofundar a caracterização biológica e toxicológica do composto 5d e desenvolver sistemas farmacotécnicos inovadores baseados em nanoesponjas de β-ciclodextrina para superar suas limitações biofarmacêuticas. O composto livre demonstrou atividade antimicobacteriana contra isolados clínicos multirresistentes de *M. tuberculosis*, com concentrações inibitórias mínimas entre 2,4 e 9,0 µg/mL. Ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade demonstraram ausência de efeitos mutagênicos e clastogênicos, enquanto análises genômicas e morfológicas sugeriram interferência em vias relacionadas à integridade do envelope celular micobacteriano e possível envolvimento da proteína MmpL3 como alvo molecular. Além disso, a atividade antimicobacteriana foi confirmada em modelo *in vivo* utilizando *Galleria mellonella*. Considerando as limitações associadas ao composto livre, durante estágio de pesquisa realizado no exterior foram desenvolvidas e caracterizadas nanoesponjas de β-ciclodextrina para administração pulmonar. As formulações obtidas aumentaram significativamente a dispersibilidade do composto em meio aquoso, reduziram sua citotoxicidade, promoveram perfil de liberação adequado e apresentaram interação eficiente com macrófagos, células-alvo da infecção tuberculosa. Em conjunto, os resultados demonstram que o composto 5d possui relevante atividade antimicobacteriana, inclusive frente a cepas resistentes. Adicionalmente, demonstram que as nanoesponjas de β-ciclodextrina constituem uma estratégia promissora para aumentar a segurança e o potencial terapêutico do composto, representando uma plataforma inovadora para o desenvolvimento de sistemas de administração pulmonar voltados ao tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; N-fenil-2,5-dimetilpirrol; β-ciclodextrina; nanoesponja; tuberculose resistente.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), remains one of the leading causes of death from infectious diseases worldwide, a situation further aggravated by the increasing spread of drug-resistant strains. In this context, the pyrrole derivative 1- [1- (4-chlorophenyl)- 2,5- dimethyl- 1H- pyrrol- 3- yl]- N- (cyclohexylmethyl) methanamine (5d), obtained through the rational combination of the SQ109 and BM212 structures, was previously identified by our research group as a promising antitubercular candidate. However, its poor aqueous solubility and toxicological profile limit its therapeutic application. Therefore, the aim of this thesis was to further characterize the biological and toxicological profile of compound 5d and to develop innovative β-cyclodextrin nanosponge-based drug delivery systems to overcome its biopharmaceutical limitations. Free compound 5d showed antimycobacterial activity against multidrug-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*, with minimum inhibitory concentrations ranging from 2.4 to 9.0 μg/mL. Mutagenicity and genotoxicity assays demonstrated the absence of mutagenic and clastogenic effects, while genomic and morphological analyses suggested interference with pathways related to mycobacterial cell envelope integrity and the possible involvement of MmpL3 as a molecular target. Furthermore, the antimycobacterial activity of compound 5d was confirmed in an in vivo *Galleria mellonella* model. Considering the limitations associated with the free compound, β-cyclodextrin nanosponges for pulmonary administration were developed and characterized during a research internship abroad. The resulting formulations significantly increased the aqueous dispersibility of compound 5d, reduced its cytotoxicity, exhibited an appropriate drug release profile, and demonstrated efficient interaction with macrophages, the target cells of tuberculosis infection. Altogether, the results demonstrate that compound 5d possesses significant antimycobacterial activity, including against drug-resistant strains. In addition, they show that β-cyclodextrin nanosponges represent a promising strategy to improve the safety and therapeutic potential of the compound, providing an innovative platform for the development of pulmonary drug delivery systems for the treatment of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; N-phenyl-2,5-dimethylpyrrole; β-cyclodextrin; nanosponge; drug-resistant tuberculosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 9
1.1. Etiologia e epidemiologia da doença 9
1.2. Tratamento 12
1.3. Resistência antimicrobiana 13
1.4. Administração intrapulmonar 15
1.5. Pirróis com atividade antituberculose 16
1.6. Ciclodextrinas como sistema de vetorização 18
1.7. Nanoesponja de ciclodextrina: matrizes poliméricas hiper-reticuladas 20
2. OBJETIVO GERAL 23
2.1. Objetivos específicos: 23
2.1.1. Avaliação biológica do composto 5d livre 23
2.1.2. Investigação do mecanismo de ação 23
2.1.3. Estratégia de encapsulação (desenvolvimento e caracterização) 23
2.1.4. Interação celular 23
2.1.5. Atividade inatramacrofágica 24
3. CONCLUSÃO 25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia e epidemiologia da doença

A tuberculose (TB) acompanha a humanidade há milhares de anos e é considerada uma das doenças infecciosas mais antigas já registradas. Lesões ósseas compatíveis com a doença foram identificadas em esqueletos datados de aproximadamente 5.000 a.C., enquanto as primeiras evidências mais consistentes foram encontradas em múmias egípcias bem preservadas de indivíduos que viveram entre 3.700 e 1.000 a.C., principalmente durante a XXI Dinastia[1]. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível confirmar retrospectivamente a presença de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em restos humanos antigos, incluindo múmias sul-americanas, e, mais recentemente, estudos de paleogenômica permitiram reconstruir genomas ancestrais do patógeno. Esses achados contribuíram para ampliar o conhecimento sobre sua origem e dispersão entre diferentes populações[2,3].

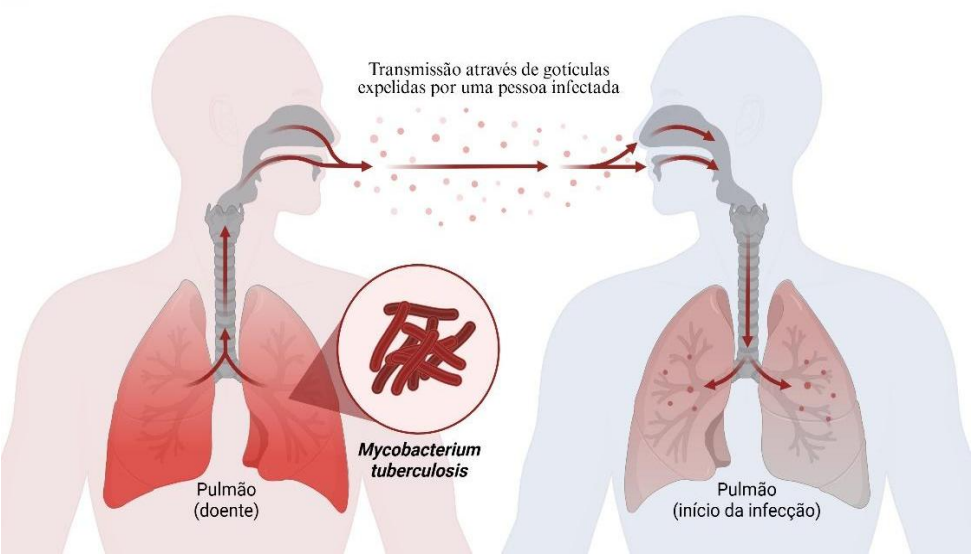
Durante muitos anos, a doença era conhecida como "tísica", termo utilizado para descrever o emagrecimento progressivo e o enfraquecimento característicos dos pacientes. Em 1839, Johann Lukas Schönlein introduziu o termo "tuberculose", derivado de "tubérculo", nome dado às lesões características da doença por Franciscus Sylvius (Sylvius de le Boë) em 1680[1].

Um dos maiores avanços na história da tuberculose ocorreu em 24 de março de 1882, quando Robert Koch identificou *M. tuberculosis* como agente etiológico da doença. Essa descoberta confirmou sua natureza infecciosa e abriu caminho para o desenvolvimento de métodos diagnósticos, estratégias de prevenção e tratamentos mais eficazes[4]. O reconhecimento da importância desse marco fez com que o dia 24 de março fosse instituído como o Dia Mundial da Tuberculose.

A contaminação acontece através de aerossóis contendo bacilos viáveis eliminados por indivíduos com TB pulmonar ativa, fazendo com que o trato respiratório seja o principal sítio de infecção e manutenção da cadeia de transmissão (Figura 1). O bacilo pode então ser completamente eliminado pelo sistema imunológico, ser contido em estado de latência ou dar origem a uma infecção ativa. O resultado difere para cada indivíduo, dependendo do estado imunológico do hospedeiro [5]. Os sintomas comuns são tosse com escarro e às vezes com sangue, dores no peito, fraqueza,

perda de peso, febre e suores noturnos. Muitas vezes, esses sintomas são leves por muitos meses, levando a atrasos na procura de cuidados e aumentando o risco de espalhar a infecção para outras pessoas [6].

Figura 1– Mecanismo de transmissão da tuberculose.



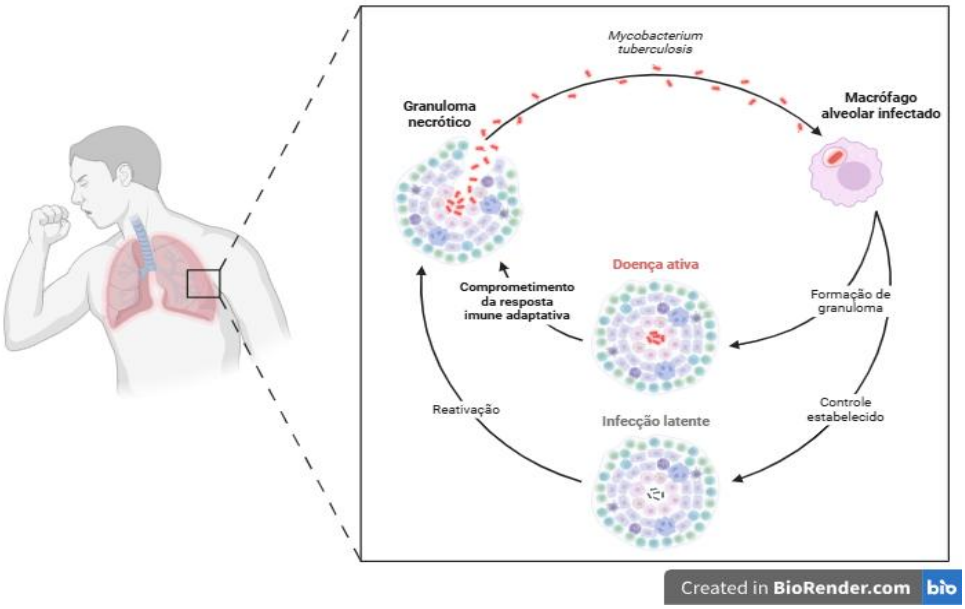
Fonte: Criado por BioRender.

A doença subsiste como uma das infecções mais persistentes da história humana, e apesar de ter sido romantizada por atingir membros das elites sociais, a maior carga da doença, ainda hoje, recai sobre a população mais vulnerável, diretamente relacionada à falta de saneamento básico adequado. Ao discutir a transformação histórica do perfil epidemiológico da doença, José Rosemberg destacou que a tuberculose “despiu-se do seu antigo manto aristocrático para tornar-se essencialmente plebéia”, evidenciando sua forte associação contemporânea com contextos de pobreza, desigualdade social e vulnerabilidade sanitária [1].

É um agente patogênico intracelular facultativo, capaz de parasitar fagócitos mononucleares humanos, desenvolver estratégias moleculares complexas e passar a maior parte do seu ciclo de vida em macrófagos alveolares, ao bloquear a maturação fagolisossômica e a modulação de vias inflamatórias [7,8]. Como consequência dessa persistência intracelular, ocorre a formação do granuloma (Figura 2), principal resposta histopatológica associada à infecção. Tradicionalmente descrito como uma estrutura de contenção do bacilo, o granuloma apresenta uma dinâmica complexa e diretamente dependente da resposta imune do hospedeiro. Em indivíduos

imunocompetentes, o granuloma pode manter o bacilo em estado de latência por longos períodos. Em contrapartida, em situações de imunossupressão ou desregulação inflamatória, pode ocorrer necrose caseosa e cavitação, favorecendo a progressão para a doença ativa e a disseminação do bacilo pelas vias aéreas [5,9].

Figura 2– Representação esquemática da patogênese da tuberculose. Após a inalação do *M. tuberculosis*, os bacilos alcançam os alvéolos pulmonares e infectam macrófagos alveolares. A resposta imune do hospedeiro promove a formação do granuloma, estrutura responsável pela contenção parcial da infecção e manutenção da latência. Em situações de comprometimento imunológico, pode ocorrer reativação da infecção, necrose granulomatosa e progressão para a doença ativa transmissível.



Fonte: Criado por BioRender.

Apesar de ser conhecida desde a Antiguidade e dos avanços obtidos no conhecimento de sua fisiopatologia, diagnóstico e tratamento, a tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública. Em 2024, a estimativa foi de 10,7 milhões de casos globais de TB, registando-se a primeira redução nos índices absolutos após três anos consecutivos de aumentos induzidos pelas interrupções sanitárias globais devido à pandemia de COVID-19 [10], enquanto o Brasil mantém-se classificado no grupo de nações de alta carga para a doença desde a criação desta classificação pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1998, e atualmente agravado a partir do período 2021-2025 com a sua inclusão concomitante na lista de nações com alta carga para a coinfecção TB/HIV. Estima-se que o país registe anualmente cerca de 100 mil casos incidentes, dos quais aproximadamente 1.000 são

caracterizados por cepas bacterianas resistentes ao tratamento convencional [10]. Entretanto, embora o Brasil esteja entre os 30 países com as maiores coberturas de tratamento do mundo [11], a persistência da doença demonstra que a ampliação da cobertura terapêutica, isoladamente, não é suficiente para controlar a infecção.

1.2. Tratamento

Antes da identificação do bacilo, o tratamento da doença era baseado em conceitos empíricos e nas diferentes interpretações sobre sua origem. Foram propostas inúmeras abordagens terapêuticas, como sangrias, banhos com pétalas de rosas vermelhas, ingestão de leite de diferentes animais, preparados à base de plantas medicinais, xaropes e óleos, além da recomendação de mudanças climáticas e permanência em sanatórios localizados em regiões montanhosas ou litorâneas [1]. Embora algumas dessas medidas proporcionassem alívio temporário dos sintomas, nenhuma apresentava eficácia no controle da doença.

Em 1890, Koch isolou dos bacilos de *M. tuberculosis* uma substância que ele chamou de tuberculina, acreditando que ela poderia ser utilizada no tratamento da doença. A divulgação dessa descoberta gerou grande expectativa e atraiu milhares de pacientes de diversos países europeus em busca da nova terapia. No entanto, a tuberculina não apresentou eficácia terapêutica e, em muitos casos, agravava o estado clínico dos pacientes resultando rapidamente em mortes. Posteriormente, em 1909, Clemens von Pirquet demonstrou que a resposta imunológica desencadeada pela tuberculina poderia ser utilizada para identificar indivíduos previamente infectados, estabelecendo as bases do teste tuberculínico, que permanece como uma importante ferramenta para o diagnóstico da infecção latente[1,4].

A partir da década de 1940, o tratamento mudou radicalmente com a descoberta da estreptomicina, primeiro fármaco com atividade comprovada contra *M. tuberculosis*. Nos anos seguintes, a introdução do ácido para-aminossalicílico (PAS) e da isoniazida (INH) possibilitou a utilização da terapia combinada, reduzindo significativamente o surgimento de cepas resistentes e aumentando as taxas de cura. Posteriormente, a incorporação da rifampicina e da pirazinamida permitiu o desenvolvimento dos esquemas de curta duração, que constituem a base do tratamento da tuberculose até os dias atuais[1,4].

Tabela 1– Comparação entre o esquema terapêutico convencional de seis meses e o regime abreviado de quatro meses atualmente recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para pacientes elegíveis com tuberculose pulmonar sensível aos medicamentos.

Esquema terapêutico padrão	**Novo esquema abreviado (2025)**
2 meses HRZE	2 meses HPMZ
4 meses HR	2 meses HPM
Total: 6 meses	**Total: 4 meses**
Recomendação padrão	Recomendação condicional

H = isoniazida; R = rifampicina; Z = pirazinamida; E = etambutol; P = rifapentina; M = moxifloxacino.

Fonte: Adaptado de TB Aliance (2025) [12]

Hoje, o esquema terapêutico padrão preconizado para pacientes acometidos por TB sensível compreende uma poliquimioterapia combinada com duração mínima de seis meses (Tabela 1), composto por uma fase intensiva de dois meses com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (2HRZE), seguida por uma fase de continuação de quatro meses com rifampicina e isoniazida (4HR)[13]. Apesar da eficácia do esquema terapêutico convencional, a longa duração do tratamento e a elevada carga medicamentosa diária representam importantes obstáculos à adesão dos pacientes.

Nesse contexto, o uso irregular ou a interrupção da terapia contribuem diretamente para o surgimento de cepas multirresistentes [8], por isso nos últimos anos, importantes avanços clínicos levaram à atualização das recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, além do esquema convencional de seis meses, a OMS recomenda um regime abreviado de quatro meses para pacientes elegíveis com tuberculose pulmonar sensível aos medicamentos, composto por rifapentina, isoniazida, pirazinamida e moxifloxacino (2HPZM/2HPM)[12]. A redução da duração do tratamento representa um importante avanço para melhorar a adesão terapêutica e reduzir as taxas de abandono, mantendo eficácia clínica comparável ao esquema padrão.

1.3. Resistência antimicrobiana

A problemática da resistência começa no uso incorreto dos medicamentos e é agravada por características biológicas do bacilo, que possui uma parede celular rica em ácidos micólicos, altamente lipofílica e impermeável, o que o torna bem menos

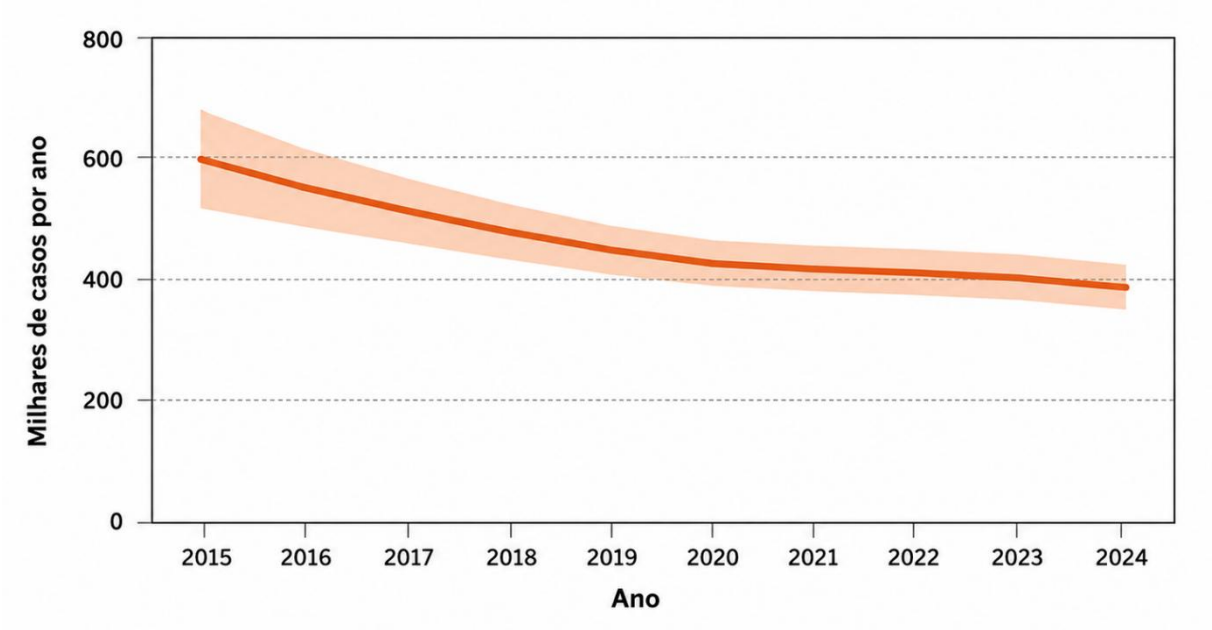
acessível e mais resistente aos agentes terapêuticos. Além dessa resistência intrínseca, a capacidade adaptativa do bacilo também pode apresentar tanto resistência adquirida, associada a mutações cromossômicas selecionadas pela pressão antimicrobiana, quanto resistência fenotípica, relacionada ao estado de baixa atividade metabólica e persistência[14]. Em conjunto, o resultado não é apenas na limitação do uso dos antibióticos disponíveis, mas também na dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos e abordagens terapêuticas.

Nos casos de resistência aos antibióticos de primeira linha, os pacientes precisam alterar o esquema de tratamento, migrando para esquemas terapêuticos de segunda escolha, historicamente associados a tratamentos prolongados, elevada carga medicamentosa, toxicidade significativa e menores taxas de sucesso terapêutico. Os antigos esquemas, frequentemente superiores a 18 meses e baseados em medicamentos injetáveis, foram progressivamente substituídos por regimes totalmente orais, mais curtos e com melhor perfil de segurança. Entre eles, destacam-se os esquemas baseados em bedaquilina, pretomanida, linezolida e outros fármacos de segunda linha, capazes de reduzir a duração do tratamento para aproximadamente seis meses em pacientes elegíveis[12].

Embora as diretrizes mais recentes da OMS priorizem regimes totalmente orais para TB multirresistente ou resistente à rifampicina (TB-MDR/RR), muitos pacientes ainda necessitam de terapias complexas que podem se estender por 6 a 30 meses, sem garantia de cura, especialmente nos casos mais avançados de resistência [10,15].

Das pessoas que foram bacteriologicamente confirmadas para TB em 2024, 83% foram testados para resistência à rifampicina (RR-TB) ou à rifampicina e isoniazida (MDR-TB), positivando mais de 175.000 casos [10].

Figura 3– Tendência global estimada do número de casos incidentes de tuberculose multirresistente ou resistente à rifampicina (MDR/RR-TB) entre 2015 e 2024. A área sombreada representa o intervalo de incerteza de 95%.



Fonte: Adaptado de WHO (2025) [10].

Entre as formas mais graves de resistência, estão a TB-pré-extensivamente-resistente (pré-XDR-TB) e a extensivamente-resistente (XDR-TB). Segundo a OMS, a pré-XDR-TB corresponde às cepas classificadas como TB multirresistente ou resistente à rifampicina (TB-MDR/RR) que apresentam resistência adicional a qualquer fluoroquinolona. Já a XDR-TB compreende os isolados que, além das características de pré-XDR-TB, também apresentam resistência a pelo menos um fármaco do Grupo A utilizado no tratamento de resgate, como a bedaquilina e/ou a linezolida. Dentre essas 2 classificações, em 2024 foram confirmados dezenas de milhares de casos em diferentes regiões do mundo [10].

Esse cenário reforça a urgência no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e compostos com maior eficácia frente aos diferentes tipos de resistências do bacilo.

1.4. Administração intrapulmonar

Como a tuberculose pulmonar é adquirida por inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis* e tem os alvéolos pulmonares como principal sítio inicial da infecção, a administração de fármacos por via intrapulmonar surge como uma estratégia racional

para aumentar a concentração local do medicamento diretamente no microambiente onde o bacilo se estabelece. A administração de medicamentos pela via intrapulmonar permite ação local com uma extensa superfície de contato, além de apresentar alta versatilidade permitindo maiores concentrações de fármaco com alta, baixa ou nenhuma absorção sistêmica, dependendo das características do fármaco e da formulação[16,17]. Considerando que a tuberculose tem como principal sítio de infecção o pulmão, a administração intrapulmonar representa uma estratégia particularmente atrativa para aumentar a concentração local do fármaco e potencializar sua eficácia.

A deposição pulmonar ocorre por três mecanismos físicos principais. Partículas com Dae de aproximadamente 1–5 μm têm maior potencial de serem depositadas no pulmão, especificamente na região alveolar. Partículas maiores que 5 μm de diâmetro geralmente estão sujeitas a impactação inercial na região orofaríngea ou sedimentação na região brônquica; no outro extremo, partículas com diâmetros substancialmente menores que 1 μm, embora capazes de atingir a região alveolar, não conseguem se depositar e são exaladas em seguida [18].

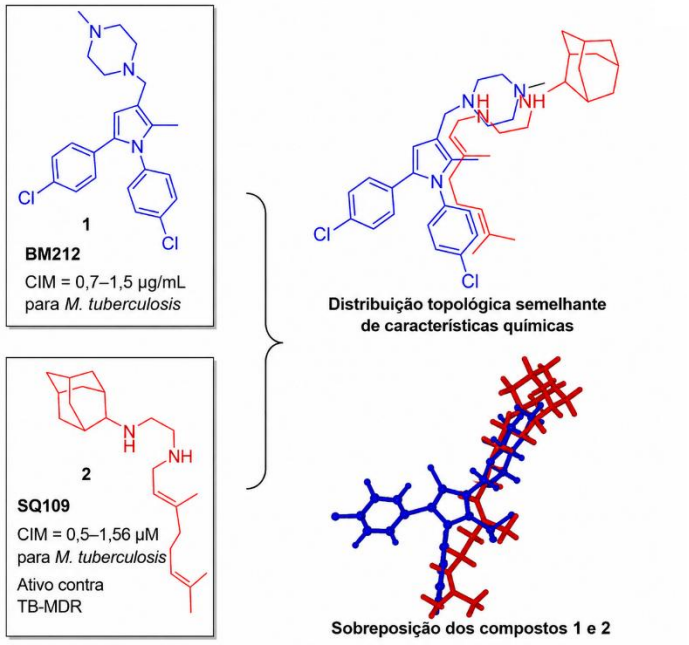
Dessa forma, sistemas inaláveis destinados ao tratamento da tuberculose, devem apresentar propriedades aerodinâmicas compatíveis com a deposição na região mais profunda do pulmão, pois são nos macrófagos alveolares que a micobactéria se instala e se multiplica. Além disso, micropartículas com Dae entre 1,5–3 μm são mais suscetíveis ao reconhecimento e à fagocitose por macrófagos alveolares, sendo especialmente relevante para favorecer a entrega do fármaco intracelularmente [19,20].

1.5. Pirróis com atividade antituberculose

A demanda por fármacos com mecanismos de ação inovadores, capazes de combater cepas resistentes de *M. tuberculosis*, impulsionou, em 2006, o início de um projeto de pesquisa voltado ao desenvolvimento de análogos derivados do BM212, um pirrol previamente descrito na literatura por sua potente atividade antimicobacteriana[21]. A estratégia baseou-se na combinação de porções moleculares entre o BM212 e o SQ109 (Figura 4), um derivado adamantano-diamina, que, na época, emergia como um composto promissor para o tratamento da tuberculose. Estudos já demonstravam que ambos compartilhavam o mesmo alvo farmacológico, atuando sobre a MmpL3 (*Mycobacterial membrane protein Large 3*), uma proteína de

membrana micobacteriana, que é fundamental para a biossíntese e manutenção do envelope celular [22].

Figura 4– Representação gráfica (esquerda) de BM212 (1) e SQ109 (2), uma comparação aproximada da distribuição topológica de suas características químicas (superior direita) e a superposição de seus conformeros tridimensionais, mostrando que a estrutura flexível de 2 (vermelho) é bem sobreponível ao esqueleto de 1 (azul).

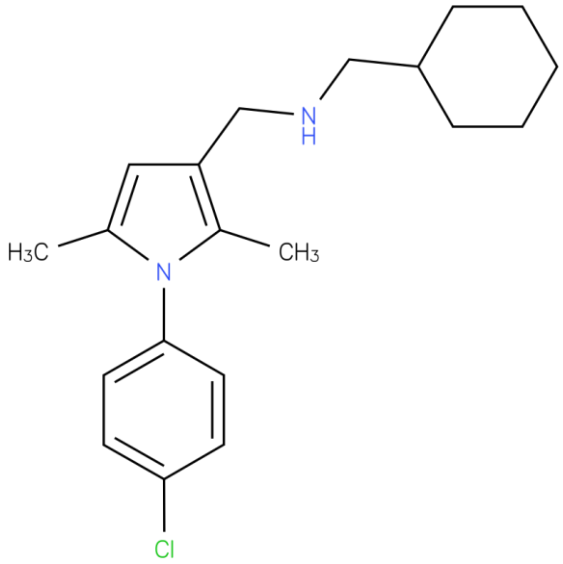


Fonte: Adaptado de Bhakta et al 2016 [22].

Alinhado a essa linha de investigação, um estudo conduzido em colaboração entre nosso grupo de pesquisa e os pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento do BM212 resultou, em 2020, na identificação de um derivado *N*-fenil-2,5-dimetilpirrol, desenvolvido como híbrido dos agentes antituberculosos BM212 e SQ109, com atividade promissora. O composto apresentou atividade bacteriostática expressiva e atividade intramacrofágica em concentrações comparáveis às observadas para fármacos de referência, como a moxifloxacina e da isoniazida, bem como potencial contra cepas resistentes de *M. tuberculosis*. Denominado “composto 5d” neste trabalho e identificado pelo nome IUPAC 1- [1- (4- clorofenil)- 2,5- dimetilpirrol- 3- il]- *N*- (ciclohexilmetil) metanamina, destacou-se dentre uma série de derivados sintetizados com o objetivo de conferir lipofilicidade suficiente para penetrar a parede celular de micobactérias e macrófagos. O composto 5d (Figura 5) apresenta uma cadeia lateral de ciclohexilmetileno, e a análise de relação estrutura-atividade (REA) indicou que a presença de substituintes volumosos, alifáticos e lipofílicos na cadeia

lateral metilamina ligada ao carbono 3 (C3) do núcleo pirrólico é essencial para otimizar a atividade antimicobacteriana [23].

Figura 5– Estrutura química do composto 5d [1- [1- (4- clorofenil)- 2,5- dimetilpirrol- 3- il]- N- (ciclohexilmetil) metanamina], derivado N-fenil-2,5-dimetilpirrol desenvolvido a partir da estratégia de otimização estrutural baseada nos compostos BM212 e SQ109.



Fonte: Adaptado de Touitou et al (2020) [23].

Em ensaios microbiológicos, o composto 5d apresentou concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,06 – 0,3 µg/mL contra a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, e manteve atividade similar frente à cepa clínica CCM 11.1, pertencente à linhagem Beijing e caracterizada pela resistência à isoniazida, rifampicina, etambutol e etionamida, apresentando CIM de 0,12 µg/mL. Além disso, ensaios preliminares utilizando o modelo alternativo de *Galleria mellonella*, não evidenciaram toxicidade significativa na dose de 12mg/kg, sendo considerado seguro para continuidade em estudos biológicos [23].

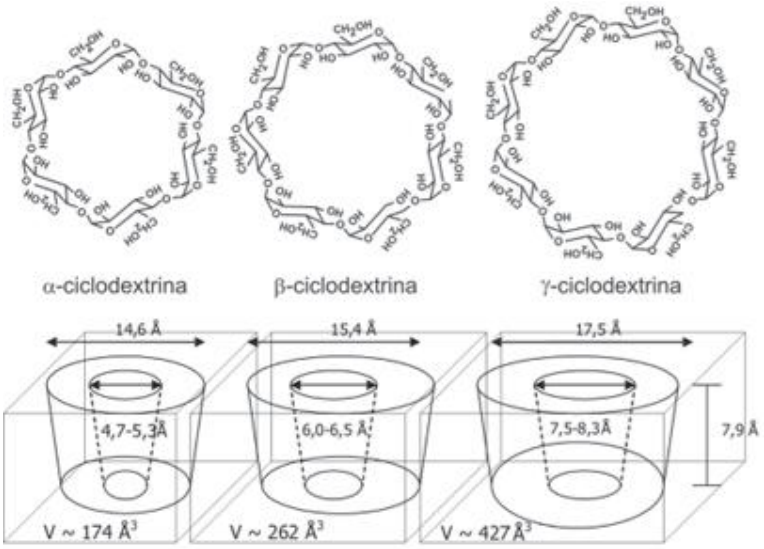
Entretanto, apesar do composto 5d apresentar elevada atividade antimicobacteriana, sua baixa solubilidade em sistema aquoso e seu perfil de citotoxicidade representam limitações para sua aplicação terapêutica.

1.6. Ciclodextrinas como sistema de vetorização

As ciclodextrinas (CDs) constituem uma das estratégias mais utilizadas para melhorar as propriedades de fármacos com baixa solubilidade em água. São

oligossacarídeos cíclicos obtidos pela degradação enzimática do amido, formados por unidades de glicose organizadas em uma estrutura tridimensional semelhante a um cone truncado, com uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, geralmente com baixa capacidade de atravessar membranas biológicas. Os subtipos de CD mais utilizados são α-CD, β-CD e γ-CD, que consistem em 6, 7 e 8 unidades de D-glicose, respectivamente (Figura 4). Os grupos hidroxila das CD estão localizados na superfície externa da molécula, o que torna as CD solúveis em água, mas simultaneamente gera uma cavidade hidrofóbica interna com diâmetro de 1,37 a 1,69 nm, o que permite a formação de complexos de inclusão com diferentes moléculas lipofílicas [24,25].

Figura 6– Estrutura e propriedades de α, β e γ-ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de Venturini et al. (2008) [26].

O aumento da solubilidade em água, melhora da estabilidade química e da biodisponibilidade do composto encapsulado, faz com que as CDs sejam particularmente interessantes para compostos hidrofóbicos e potencialmente citotóxicos.

Dentre os diferentes tipos de CDs, o β-CD é o mais utilizado no desenvolvimento farmacêutico, principalmente por ser mais seguro, versátil e econômico [27]. Recentemente, um grupo de pesquisa estudou a complexação de delamanida, um novo fármaco contra TB, com diferentes CDs. Eles demonstraram que o hidroxipropil-β-CD (HP-β-CD) resultou em um complexo solúvel, estável, com boa deposição nas

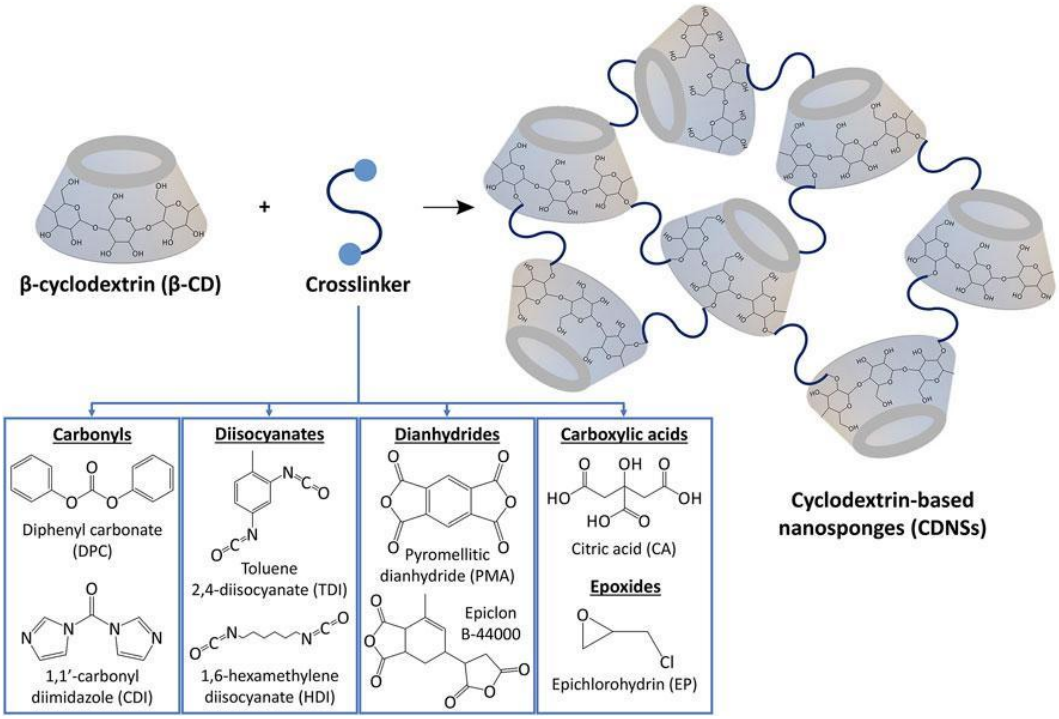
vias aéreas e com menor concentração inibitória mínima quando comparado ao fármaco livre em estudos in vitro [28]. Guan et al (2020) também estudaram o HP-β-CD e prepararam uma inclusão de naringenina-HP-β-CD para administração por via pulmonar no tratamento da tosse, obtendo resposta rápida com alta concentração local [29]. Há também estudos explorando formulações para sistemas inalatórios com sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBE-β-CD) complexado com bedaquilina, outro fármaco recentemente aprovado contra TB. Parvathaneni et al (2021) estudaram o reposicionamento de fármacos e complexaram bedaquilina com SBE-β-CD contra câncer de pulmão, obtendo deposição pulmonar eficiente, com diâmetro aerodinâmico de 2,9 μm [30], demonstrando a eficácia na administração inalatória de fármacos destinados à doenças pulmonares.

1.7. Nanoesponja de ciclodextrina: matrizes poliméricas hiper-reticuladas

Como uma evolução dos sistemas baseados em CDs, as nanoesponjas de ciclodextrinas (NCs) consistem em redes poliméricas tridimensionais hiper-reticuladas capazes de aumentar a capacidade de encapsulações de moléculas (Figura 8). Essas estruturas podem ser preparadas usando diferentes métodos sintéticos, como modificação química, polimerização de anéis CD ou modificação de grupos funcionais, resultando em nanoestruturas porosas com elevada área superficial e múltiplos sítios de interação[27].

As NCs possuem alta eficiência para acomodar moléculas pouco solúveis por meio de complexação por inclusão, no interior das cavidades hidrofóbicas das CDs, e também por não inclusão, nos interstícios e canais formados pela rede polimérica reticulada[31]. Consequentemente, essas nanoestruturas apresentam capacidade de carga superior às CDs livres, além de maior controle sobre a estabilidade e liberação do fármaco encapsulado.

Figura 7– Representação esquemática da síntese de nanoesponjas de ciclodextrina (CDs) por reticulação de moléculas de β-ciclodextrina utilizando diferentes classes de agentes reticuladores.



Fonte: Adaptado de Utzeri e colaboradores (2022)[32].

A natureza do reticulador e a proporção de CD com reticulador são parâmetros que podem ser modulados para obter nanopartículas com diferentes propriedades físico-químicas, como porosidade, diâmetro aerodinâmico, capacidade de encapsulação e perfil de liberação[32]. Os reticuladores podem reagir facilmente com grupos hidroxila capazes de sofrer substituição ou eliminação, sendo os mais utilizados a epicloridrina (EP) e o ácido cítrico (AC) (Figura 5)[32,33]. Enquanto a reticulação com epicloridrina gera predominantemente ligações do tipo éter, a utilização de ácido cítrico promove a formação de ligações éster em condições compatíveis com os princípios da química verde. Além da elevada biocompatibilidade, as nanoesponjas obtidas a partir de ácido cítrico apresentam grupos funcionais capazes de participar de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, favorecendo a encapsulação de diferentes classes de compostos[32,34].

Considerando que a tuberculose pulmonar tem como principal sítio de infecção os alvéolos e que *Mycobacterium tuberculosis* sobrevive predominantemente em macrófagos alveolares, a administração pulmonar constitui uma estratégia promissora para aumentar a concentração local do fármaco no sítio da infecção, favorecer sua

interação com as células-alvo e reduzir a exposição sistêmica. A incorporação do composto em sistemas carreadores baseados em nanoesponjas de β-ciclodextrina busca ainda superar suas limitações biofarmacêuticas, aumentando sua dispersibilidade em meio aquoso, modulando sua liberação e reduzindo sua citotoxicidade.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar, em estudos pré-clínicos, o potencial terapêutico do derivado pirrólico 5d para o tratamento da tuberculose, aprofundando a caracterização do seu perfil antimicobacteriano, mecanismo de ação e segurança biológica na forma livre, bem como desenvolver e caracterizar um sistema inalatório de liberação baseado em micropartículas de nanoesponjas de ciclodextrina (NCs) para administração intrapulmonar, visando aumentar sua estabilidade e direcionamento ao sítio de infecção, reduzir a toxicidade celular e favorecer a entrega intramacrofágica do fármaco.

2.1. Objetivos específicos:

2.1.1. Avaliação biológica do composto 5d livre

- Avaliar a atividade antimicobacteriana do composto 5d frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*, com perfil de resistência;
- Avaliar o perfil citotóxico do 5d em diferentes linhagens celulares;
- Investigar o potencial mutagênico do 5d por meio dos ensaios de micronúcleo e teste de Ames;
- Avaliar a toxicidade e eficácia do composto em *Galleria mellonella*;
- Avaliar a toxicidade e eficácia do composto em camundongos BALB/c através de infecção intranasal com *M. tuberculosis*.

2.1.2. Investigação do mecanismo de ação

- Analisar alterações morfológicas induzidas pelo composto 5d em *M. tuberculosis* através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Investigar possíveis mecanismos associados à resistência através do sequenciamento genômico completo (SGC).

2.1.3. Estratégia de encapsulação (desenvolvimento e caracterização)

- Encapsular o composto 5d em nanopartículas de CNs;
- Desenvolver micropartículas de CNs contendo o composto 5d;
- Caracterizar os sistemas quanto às propriedades físico-químicas e estruturais;
- Avaliar o perfil de liberação do composto a partir dos sistemas desenvolvidos;
- Comparar o perfil citotóxico do composto 5d livre e encapsulado.

2.1.4. Interação celular

- Investigar a internalização celular das micropartículas por citometria de fluxo;

- Avaliar a distribuição intracelular por microscopia confocal

2.1.5. Atividade inatramacrofágica

- Avaliar a atividade antimicobacteriana do composto 5d livre e encapsulado em macrófagos infectados por *M. tuberculosis*.

3. CONCLUSÃO

A presente tese ampliou o conhecimento sobre o derivado pirrólico 5d como potencial candidato para o tratamento da tuberculose, integrando estudos biológicos, toxicológicos e farmacotécnicos voltados à sua aplicação terapêutica.

Os resultados demonstraram que o composto apresenta elevada atividade antimicobacteriana frente a cepas sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis*. Além disso, os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade indicaram um perfil de segurança favorável, enquanto as análises morfológicas e o sequenciamento de mutantes resistentes forneceram evidências consistentes do envolvimento de mecanismos associados à integridade do envelope celular micobacteriano em sua atividade biológica, que já era previsto.

Embora os ensaios em modelos alternativos tenham demonstrado eficácia promissora e baixa toxicidade, a avaliação em modelo murino revelou importantes limitações relacionadas à toxicidade sistêmica do composto livre, evidenciando a necessidade de estratégias capazes de melhorar sua segurança e aplicabilidade terapêutica. Nesse contexto, foram desenvolvidos sistemas de entrega pulmonar baseados em nanoesponjas de ciclodextrina capazes de aumentar a dispersibilidade aquosa do composto, modular sua liberação e reduzir sua citotoxicidade. Entre as formulações avaliadas, a nanoesponja reticulada com epicloridrina e revestida com quitosana apresentou características particularmente promissoras para administração pulmonar, incluindo perfil de liberação pH-responsivo.

Em conjunto, os resultados demonstram que o composto 5d constitui um promissor candidato antituberculose e que sua associação a sistemas de liberação baseados em nanoesponjas de ciclodextrina representa uma estratégia eficaz para superar limitações críticas observadas durante sua avaliação pré-clínica. Dessa forma, esta tese contribui tanto para o entendimento dos mecanismos biológicos associados ao composto quanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas ao tratamento da tuberculose.

Por fim, os dados obtidos fornecem bases sólidas para futuros estudos de eficácia utilizando as formulações encapsuladas em modelos de infecção, bem como para o aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade antimicobacteriana do composto 5d.

1. Rosemberg, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanitária* **7**, (1999).
2. Ankrah, A. O. *et al.* Tuberculosis. *Semin. Nucl. Med.* **48**, 108–130 (2018).
3. WHO. *WHO Report 2020*. (2020).
4. Gordon, S. V. & Parish, T. Microbe profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology (United Kingdom)* **164**, 437–439 (2018).
5. Vasava, M. S. *et al.* Drug development against tuberculosis: Past, present and future. *Indian Journal of Tuberculosis* **64**, 252–275 (2017).
6. Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 352–366 (2012).
7. WHO. *Global Tuberculosis Report 2025*. (2025).
8. Franco, J. V. *et al.* Undernutrition as a risk factor for tuberculosis disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2025**, (2024).
9. Brasil. *Manual de Para o Controle Da Tuberculose*. *Ministério da Saúde* (2019).
10. Ministério da Saúde. *MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL*. www.saude.gov.br/ (2019).
11. Nguyen, L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. *Arch. Toxicol.* **90**, 1585–1604 (2016).
12. TB Alliance. Inadequate treatment. *https://www.tballiance.org/why-new-tb-drugs-inadequate-treatment/* (2025).
13. Biava, M. *et al.* Antimycobacterial agents. Novel diarylpyrrole derivatives of BM212 endowed with high activity toward Mycobacterium tuberculosis and low cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **49**, 4946–4952 (2006).
14. Bhakta, S. *et al.* Design and Synthesis of 1-((1,5-Bis(4-chlorophenyl)-2-methyl-1H-pyrrol-3-yl)methyl)-4-methylpiperazine (BM212) and N-Adamantan-2-yl-N′-((E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) Pyrrole Hybrid Derivatives: Discovery of Potent Antitubercul. *J. Med. Chem.* **59**, 2780–2793 (2016).
15. Touitou, M. *et al.* Improving the Potency of N-Aryl-2,5-dimethylpyrroles against Multidrug-Resistant and Intracellular Mycobacteria. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 638–644 (2020).

16. Labiris, N. R. & Dolovich, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 588–599 (2003).
17. Dolovich, M. B. & Newhouse, M. T. Aerosols. Generation, methods of administration, and therapeutic applications in asthma. in *Allergy: Principles and practice* (eds. Middleton, E. Jr. et al.) 712–739 (St Louis: Mosby Year Book, Inc., 1993).
18. Borghardt, J. M., Kloft, C. & Sharma, A. Inhaled Therapy in Respiratory Disease: The Complex Interplay of Pulmonary Kinetic Processes. *Can. Respir. J.* **2018**, 1–11 (2018).
19. El-Sherbiny, I. M., Villanueva, D. G., Herrera, D. & Smyth, H. D. C. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* (New York, NY, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-9745-6.
20. Guo, Q. & Qian, Z.-M. Macrophage based drug delivery: Key challenges and strategies. *Bioact. Mater.* **38**, 55–72 (2024).
21. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1754 (1998).
22. Arun Rasheed. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Sci. Pharm.* **76**, 567–598 (2008).
23. Venturini, C. de G., Nicolini, J., Machado, C. & Machado, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova* **31**, 360–368 (2008).
24. Haimhoffer, Á. *et al.* Cyclodextrins in Drug Delivery Systems and Their Effects on Biological Barriers. *Sci. Pharm.* **87**, 33 (2019).
25. Patil, S. M. *et al.* Solubility Enhancement and Inhalation Delivery of Cyclodextrin-Based Inclusion Complex of Delamanid for Pulmonary Tuberculosis Treatment. *AAPS PharmSciTech* **24**, 49 (2023).
26. Guan, M. *et al.* Characterization, in Vitro and in Vivo Evaluation of Naringenin-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Inclusion for Pulmonary Delivery. *Molecules* **25**, 554 (2020).
27. Parvathaneni, V. *et al.* Repurposing Bedaquiline for Effective Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Therapy as Inhalable Cyclodextrin-Based Molecular Inclusion Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4783 (2021).
28. Trotta, F. & Cavalli, R. Characterization and Applications of New Hyper-Cross-Linked Cyclodextrins. *Compos. Interfaces* **16**, 39–48 (2009).

29. Utzeri, G., Matias, P. M. C., Murtinho, D. & Valente, A. J. M. Cyclodextrin-Based Nanosponges: Overview and Opportunities. *Front. Chem.* **10**, (2022).
30. Morin-Crini, N. *et al.* Water-insoluble β-cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms. *Prog. Polym. Sci.* **78**, 1–23 (2018).
31. Varan, C. *et al.* Preparation and characterization of cyclodextrin nanosponges for organic toxic molecule removal. *Int. J. Pharm.* **585**, 119485 (2020).