

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 18/03/2024.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Desenvolvimento, síntese e caracterização de lipossomas conjugados com
análogos de sideróforos e estudo *in vitro* como estratégia terapêutica para
tuberculose**

Camila Maríngolo Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Coorientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, SP

2022



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia



Desenvolvimento, síntese e caracterização de lipossomas conjugados com análogos de sideróforos e estudo *in vitro* como estratégia terapêutica para tuberculose

Camila Maríngolo Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Coorientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Tese para obtenção do título de doutora em Ciências pelo programa de pós-graduação em Biociência e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 2022

R436d

Ribeiro, Camila Maríngolo.

Desenvolvimento, síntese e caracterização de lipossomas conjugados com análogos de sideróforos e estudo *in vitro* como estratégia terapêutica para tuberculose / Camila Maríngolo Ribeiro. – Araraquara: [S.n.], 2022.
29 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

Coorientador: Marlus Chorilli.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose. 3. Lipossomas. 4. Caracterização de nanopartículas. 5. Sideróforo. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Chorilli, Marlus, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento, síntese e caracterização de lipossomas conjugados com análogos de sideróforos e estudo in vitro como estratégia terapêutica para tuberculose

AUTORA: CAMILA MARINGOLO RIBEIRO
ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN
COORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia, Odontologia e Enfermagem / Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. KATIANY RIZZIERI CALEFFI FERRACIOLI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara

Araraquara, 18 de março de 2022

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”
Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pois de acordo com a minha fé nada acontece sem que Ele permita e, por isso, agradeço por permitir que em 2012 eu iniciasse minha jornada unespiana cursando farmácia-bioquímica e por me guiar no caminho da pesquisa através da iniciação científica, mestrado e doutorado.

O apoio e o acolhimento recebido em casa depois de cada dia de trabalho, depois de cada experimento que deu errado, depois das frustrações e das alegrias que o dia a dia em um laboratório de pesquisa proporcionam foi fundamental, por isso, meu agradecimento mais que especial é para meu marido Neto que sempre esteve ao meu lado! Isso também vale para meus pais Maga e Flávio, meu irmão Miguel e os dogs Sophie e Scooby que com certeza tornaram essa jornada mais leve e feliz.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, vou nomear alguns muito especiais: Paula, Léo, Miyata, Joás, Pati, Bel, Débora Leite, Mari Solcia, Ana Paula, Ana Carolina, Camila Gonçalves, Rachel, Fernanda, Karyn, mas muitos outros também tiveram suas contribuições.

Tem três pessoas que merecem um agradecimento especial: Débora Bellato, Júlia e Mel, pois com vocês eu pude descobrir o que mais gosto de fazer que é ensinar, pude compartilhar meus conhecimentos de bancada, ajudar a guiá-las em suas iniciações científicas e aprender muito com as meninas maravilhosas e especiais que são.

Foi uma honra compartilhar com vocês um período tão especial da minha vida, aprender tanto e poder ensinar um pouco, criando esse laço de colaboração e ajuda, e ainda bem que tive vocês, pois não se faz ciência sozinho e além de tudo eu sou absurdamente grata pelo laço de bem querer e amizade que construímos.

Estendo meu agradecimento aos alunos do laboratório de farmacotécnica: Marcela, Leda, Leidi e Leonardo, por me auxiliarem em alguns procedimentos e experimentos.

Agradeço ao Prof. Daniele Castagnolo do King's College com quem estabelecemos uma frutífera parceria e que gentilmente aceitou fazer parte deste projeto, juntamente com seus colaboradores, fazendo a síntese do análogo de sideróforo e seu conjugado com ácido oleico para os lipossomas.

Assim também, agradeço à Prof^a Sônia Bão e Dr^a Márcia da Universidade de Brasília, que por intermédio da Prof^a Patrícia Bento, aceitaram colaborar com nosso projeto e fizeram as imagens de microscopia eletrônica mais belas que já vi.

Agradeço também ao Prof. Marlus, meu coorientador, que abriu as portas de seu laboratório e se abriu às minhas ideias para este projeto.

E, por fim, a quem proporcionou a oportunidade para que tudo acontecesse, o meu orientador, Prof. Fernando, digo o meu mais sincero: Obrigada! Obrigada pela confiança em mim, por me aceitar para fazer estágio, iniciação científica, pelo convite para o mestrado ainda na graduação, por todo apoio nestes últimos anos e por abraçar a ideia deste projeto me incentivando em cada etapa.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao programa de pós-graduação em biociências e biotecnologia aplicadas à Farmácia, pela estrutura e suporte que me proporcionaram em incontáveis momentos e maneiras.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo nº 2018/02344-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que afeta milhões de pessoas anualmente, é necessário um longo tratamento para a cura, especialmente para os casos de resistência a antibióticos. Outra particularidade de *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico de TB, é a sua habilidade de sobreviver dentro de macrófagos, células imunológicas que são a primeira defesa no tecido pulmonar. Em uma busca de um tratamento eficaz, seguro, que promova uma entrega do antibiótico no local da infecção e, possivelmente, contribua para a adesão ao tratamento, propusemos uma abordagem nanotecnológica baseada em lipossomas funcionalizados, ou seja, com a superfície modificada com um análogo de sideróforo (Sid) para carrear moxifloxacino (Mox) para tratar TB para uma administração intrapulmonar. Os sideróforos são a principal estratégia das bactérias para captar ferro, um metal essencial para seu metabolismo. Foram desenvolvidos com fosfatidilcolina de soja, colesterol e ácido oleico, quatro lipossomas: lipossoma vazio (LipV); lipossoma contendo Mox (LipMox); lipossoma funcionalizado com Sid e sem fármaco (LipS) e lipossoma funcionalizado com Sid e contendo Mox (LipSMox). A caracterização dos lipossomas foi feita pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Por todos os métodos, observamos partículas esféricas e de aproximadamente 200 nm. O potencial zeta foi a principal diferença entre eles, e foi aproximadamente -40mV para LipV e LipMox e +15mV para LipS e LipSMox. A NTA mostrou a concentração de $\sim 10^{11}$ partículas/mL. Um método de quantificação de Mox em cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para determinar a eficiência de encapsulação (EE) e o perfil de liberação (RP). A EE foi 51,31% para LipMox e 45,76 % para LipSMox e a RP seguiu o modelo proposto por Korsmeyer-Peppas, comum para lipossomas. A concentração inibitória mínima (MIC) frente a *M. tuberculosis* foi determinada em condições padrão (pH 6,6 e [Fe] = 0,04 µg/mL), com acréscimo de ferro (múltiplos de 2x, 5x e 10x em relação ao meio comercial), pH 7,4 e acréscimo de 10% de soro fetal bovino (FBS). A alteração de pH do meio para 7,4 não afetou a MIC. A MIC de LipMox e LipSMox foram na maioria das vezes menor que 0,5%. Já LipS teve MIC próxima a 10% em todas as condições, exceto na presença de FBS (MIC >25%), em que há ferro ofertado, mas de não livre e sim complexado com ferritina. O ensaio de *time-kill* não mostrou diferença significativa entre Mox livre e encapsulada, a ação bactericida foi concentração-dependente. O ensaio de citotoxicidade foi realizado para quatro linhagens celulares: macrófagos (J774A.1), fibroblastos (MRC-5), células hepáticas (HepG-2) e células intestinais (Caco-2) e observou-se uma heterogeneidade nos resultados de índice de citotoxicidade (IC₅₀) com maior toxicidade com lipossomas contendo Sid. A atividade frente a *M. tuberculosis* intramacrofágico apresentou reduções de mais de 90% dos bacilos intracelulares (LipMox 1 e 5%; Mox 1 e 5% e LipSMox 1%). A microscopia eletrônica de varredura e transmissão confirmaram a fagocitose das vesículas lipossomais pelos macrófagos, confirmando a possibilidade de um direcionamento natural dos lipossomas para células fagocíticas. Embora a funcionalização com Sid não trouxe melhora na atividade biológica dos lipossomas, ainda houve um direcionamento natural para os macrófagos, células de extrema importância na patogênese de TB. Diante das vantagens de *drug delivery* dos lipossomas, propõe-se uma administração intrapulmonar *in vivo* deste sistema para o tratamento de TB.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose, lipossomas, caracterização de nanopartículas, sideróforo.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that affects millions of people annually and a long treatment is necessary for a cure, especially for antibiotic resistant cases. Another particularity of *Mycobacterium tuberculosis*, the main etiologic agent of TB, is the ability to survive inside macrophages, immune cells in lungs. In a search for an effective, safe treatment that promotes antibiotic delivery at the site of infection and, possibly, contributes to treatment adherence, we proposed a nanotechnological approach based on functionalized liposomes, that is, with the surface modified with an analogue of siderophore (Sid) to carry moxifloxacin (Mox) to treat TB for an intrapulmonary administration. Siderophores are the main strategy of bacteria to take up iron, an essential metal for their metabolism. Four liposomes were developed with soy phosphatidyl, cholesterol and oleic acid: empty liposome (LipV); liposome containing Mox (LipMox); drug-free and Sid-functionalized liposome (LipS) and Sid-functionalized and Mox-containing liposome (LipSMox). The characterization of these liposomes was performed by dynamic light scattering technique (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM). By all methods, we observed spherical particles and approximately 200 nm. The zeta potential was the main difference between them and was approximately -40mV for LipV and LipMox and +15mV for LipS and LipSMox. NTA showed a concentration of $\sim 10^{11}$ particles/mL. A method of quantification of Mox in high performance liquid chromatography was developed and validated to determine the encapsulation efficiency (EE) and the release profile (RP). The EE was 51.31% for LipMox and 45.76% for LipSMox and the RP followed the model proposed by Korsmeyer-Peppas, common for liposomes. The minimal inhibitory concentration (MIC) against *M. tuberculosis* was determined under standard conditions (pH 6.6 and [Fe] = 0.04 $\mu\text{g/mL}$), with addition of iron (multiples of 2x, 5x and 10x in relation to the commercial medium), pH 7.4 and with addition of 10% fetal bovine serum (FBS). Changing the pH of the medium to 7.4 did not affect the MIC. The MIC of LipMox and LipSMox were less than 0.5%. LipS had MIC close to 10% in all conditions, except in the presence of FBS (MIC >25%), in which there is iron offered, not free, but complexed with ferritin. The time-kill assay showed no significant difference between free and encapsulated Mox, the bactericidal action was concentration-dependent. The cytotoxicity assay was performed for four cell lines: macrophages (J774A.1), fibroblasts (MRC-5), liver cells (HepG-2) and intestinal cells (Caco-2). Heterogeneity was observed in the cytotoxicity index (IC₅₀) results with greater toxicity for liposomes containing Sid. The activity against intramacrophagic *M. tuberculosis* showed reductions of more than 90% of intracellular bacilli (LipMox 1 and 5%; Mox 1 and 5% and LipSMox 1%). Scanning and transmission electron microscopy confirmed the phagocytosis of liposomal vesicles by macrophages, confirming the possibility of a natural targeting of liposomes to phagocytic cells. Although functionalization with Sid did not improve the biological activity of liposomes, there was still a natural targeting of macrophages, cells of extreme importance in the pathogenesis of TB. Given the advantages of drug delivery of liposomes, an intrapulmonary *in vivo* administration of this system is proposed for the treatment of TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, liposomes, nanomedicine, siderophore.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento de tuberculose: (A) isoniazida, (B) pirazinamida, (C) rifampicina e (D) etambutol.	14
Figura 2. Evolução e projeção do mercado de produtos nanotecnológicos com aplicações médicas nos Estados Unidos.	17
Figura 3. Componentes lipídicos do lipossoma: (A) fosfatidilcolina de soja, (B) colesterol e (C) ácido oleico.	18
Figura 4. Estratégias de funcionalização e direcionamento de nanopartículas.	19
Figura 5. Ácido oleico conjugado a uma molécula capaz de complexar com o átomo de ferro mimetizando a função do sideróforo.	20
Figura 6. Estrutura molecular de moxifloxacino da classe das fluoroquinolonas.	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DLS	<i>Dynamic light scattering</i> – Espalhamento de luz dinâmica
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> – Soro fetal bovino
HD	<i>Hydrodynamic diameter</i> – Diâmetro hidrodinâmico médio
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	<i>Cytotoxicity index</i> - Índice de citotoxicidade
INH	<i>Isoniazid</i> - Isoniazida
SI / IS	<i>Selective index</i> - Índice de seletividade
LipMox	<i>Liposome containing moxifloxacin</i> - Lipossoma contendo moxifloxacino
LipS	<i>Siderophore-functionalized liposome</i> - Lipossoma funcionalizado com sideróforo vazio
LipSMox	<i>Siderophore-functionalized liposome containing moxifloxacin</i> - Lipossoma funcionalizado com sideróforo e contendo moxifloxacino
LipV	<i>Empty liposomes</i> - Lipossoma vazio
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> – Concentração inibitória mínima
Mox	<i>Moxifloxacin</i> ” - Moxifloxacino
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i> – Análise de rastreamento de nanopartículas
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> ” – Tampão salina fosfato
PDI	<i>Poly dispersivity index</i> – Índice de polidispersividade
OADC	<i>Culture medium supplement made with oleic acid, albumin, dextrose and catalase</i> - Suplemento de meio de cultura, a base de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
OLA	<i>Oleic acid</i> – ácido oleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
REMA	<i>Resazurin microtiter assay</i> – Ensaio de microdiluição para determinação da MIC em placas de 96 poços em que a resazurina é o indicador de viabilidade celular
RFP	<i>Rifampicin</i> - Rifampicina
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> – Microscopia eletrônica de varredura
Sid	<i>Siderophore analogue</i> – Análogo de sideróforo
TB	<i>Tuberculosis</i> - Tuberculose
TEM	<i>Transmission electronic microscopy</i> – Microscopia eletrônica de transmissão
ZP	<i>Zeta potential</i> – Potencial Zeta

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
1.1.	Tuberculose.....	13
1.2.	Nanotecnologia	16
1.3.	Sideróforos	19
1.4.	Moxifloxacino.....	20
2.	Objetivos.....	22
2.1.	Objetivo geral	22
2.2.	Objetivos específicos	22
3.	Conclusões.....	23

1. Introdução

1.1. Tuberculose

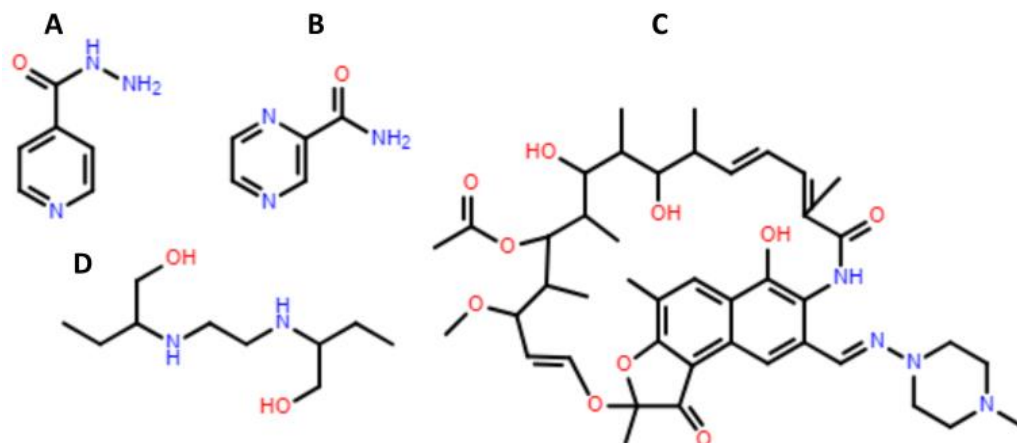
A Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou que, em 2019, houve 10 milhões de casos de tuberculose (TB) e 1,4 milhão de mortes em decorrência da doença sendo, então, uma das doenças infecciosas que levou mais pessoas a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Os dados nacionais indicam 75.717 casos novos de TB em 2018 e 4.614 mortes em decorrência da doença em 2017, um pouco mais que nos anos anteriores, pois foram diagnosticados 69.569 casos novos em 2017 e 4.426 óbitos por tuberculose em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2019). Já em 2020, o Brasil registrou 66.819 casos novos de TB e foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença no ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021).

A pandemia de SARS-COV-2, assumiu o posto de doença infecciosa que mais matou pessoas no mundo e ainda prejudicou o avanço constante que vinha acontecendo em relação a TB no mundo (número de casos e mortalidade). O número de novos casos de TB diagnosticados caiu drasticamente de 7,1 milhões (2019) para 5,8 milhões (2020), a mesma taxa de 2012 e que representa redução de 18% do estimado para 2020. Esta redução é vista como um retrocesso, pois possivelmente não representa a realidade do número de casos, mas sim uma falha nos sistemas de saúde em diagnosticar e reportar adequadamente os casos de TB devido à sobrecarga enfrentada devido pandemia de Covid-19, especialmente em países em desenvolvimento como Índia, Indonésia e Filipinas. O cenário ainda pode piorar para os anos de 2021 e os seguintes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Quando o paciente é diagnosticado com infecção por *M. tuberculosis* sensível aos fármacos chamados de 1ª linha/escolha, o esquema terapêutico básico empregado para o tratamento é composto por uma fase intensiva com 2 meses de rifampicina (RFP), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETB) seguido de uma fase de manutenção de 4 meses de RFP e INH totalizando seis meses de terapia. As estruturas moleculares destes fármacos estão na figura 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, 2016a).

Figura 1. Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento de tuberculose: (A) isoniazida, (B) pirazinamida, (C) rifampicina e (D) etambutol.



Fonte: Autora.

Esse tipo de tratamento que combina antibióticos é chamada de poliquimioterapia e foi introduzido há mais de 50 anos com o objetivo de reduzir a emergência de cepas resistentes, por minimizar a possibilidade de seleção de mutantes espontaneamente resistentes a algum fármaco, e consequentemente visando obter maiores taxas de sucesso do tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, 2016a).

No Brasil, o tratamento é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e totalmente gratuito. Na primeira etapa do tratamento os fármacos são administrados na forma de um único comprimido, no esquema de dose fixa combinada. Adultos com mais 50kg, por exemplo, devem ingerir um comprimido ao dia que contém RFP + INH + PZA + ETB (150mg + 75mg + 400mg + 275mg). Na segunda etapa do tratamento os comprimidos também são únicos, e tomados uma vez ao dia, e contém RFP + INH (300mg +150mg) (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA AO SUS, 2018).

Infelizmente nem todos os pacientes finalizam seus tratamentos da maneira correta, o desaparecimento dos sintomas da doença, possíveis efeitos adversos e até mesmo a falta de informação da importância da conclusão adequada do tratamento, resulta em uma taxa de abandono de 12% no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021).

Embora tenha havido um avanço em relação à taxa de cura com o emprego da poliquimioterapia, a falha no tratamento ainda é recorrente. As principais razões para tal falha são: o abandono da terapia e a resistência bacteriana aos antibióticos. Quando um paciente inicia seu tratamento e o abandona ou o faz de forma inadequada, se estabelece uma pressão seletiva, uma vez que os antibióticos não atingiram concentração e tempo suficiente para eliminar todos os bacilos. Esta pressão seletiva permite que bacilos resistentes sejam

selecionados e, estes por sua vez, podem vir a se multiplicar causando um novo quadro de infecção e/ou transmitidos a outros indivíduos. Deste modo, quando a terapia anti-TB não é feita corretamente pode haver prejuízo tanto para o indivíduo quanto para a comunidade (JOHNSON et al., 2009; SZUMOWSKI; ADAMS; EDELSTEIN, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

A resistência a antibiótico é uma grande crise na saúde pública e este cenário se repete no combate a TB. As definições de resistência para TB são: TB resistente a RFP (RR-TB [*rifampicin resistant TB*]), que é o principal fármaco no tratamento, TB multifármaco resistente (MDR-TB [*multidrug resistant TB*]), que além de RFP, são resistentes a INH (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Há ainda a classificação de TB pré-extensivamente resistente a fármacos (pré-XDR-TB [*pre-extensively drug-resistant TB*]), quando além de RFP e INH, verificou-se a resistência a pelo a uma fluoroquinolona (Por exemplo: moxifloxacino (Mox) ou levofloxacino) e, por fim, TB extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB [*extensively drug-resistant TB*]) quando resistente a RFP, qualquer fluoroquinolona e à bedaquilina ou linezolida, já que estas últimas são utilizadas como último recurso no tratamento e são os fármacos mais recentes na terapia contra TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A taxa de cura dos novos casos de TB no Brasil em 2020 foi de 70,1%, já a taxa de cura para casos de RR/MDR-TB é de 51,1%. Enquanto a taxa de cura global foi de 85% para novos casos e 59% para RR/MDR-TB (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Com a redução do diagnóstico de TB em decorrência da pandemia de Covid-19, a queda na detecção e tratamento dos casos de TB resistente a antibióticos é uma consequência direta e foi de 15% (~177 mil em 2019 para ~150 mil em 2020). Foram aproximadamente 130 mil casos de MDR/RR-TB e 25 mil casos de pré-XDR/XDR-TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil foram mais de 7 mil casos de TB resistente a pelo menos um fármaco (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021).

Diante do apresentado, é notável a necessidade de novos fármacos e de novas estratégias terapêuticas contra TB, especialmente as que visem reduzir o tempo de tratamento e aumentar a adesão do paciente à terapia (FREITAS et al., 2014; DA SILVA et al., 2016a, 2016b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

1.2. Nanotecnologia

Dentre as diversas estratégias terapêuticas, as abordagens nanotecnológicas recebem certo destaque, pois através de diferentes tipos de formulação, como por exemplo: nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas líquido-cristalinos, lipossomas e microemulsões, é possível conferir adesão, proteção frente ao sistema digestivo, redução da ligação a proteínas plasmáticas, proteção da metabolização hepática, entre outras características desejáveis no desenvolvimento de um novo tratamento anti-TB (DA SILVA et al., 2016b).

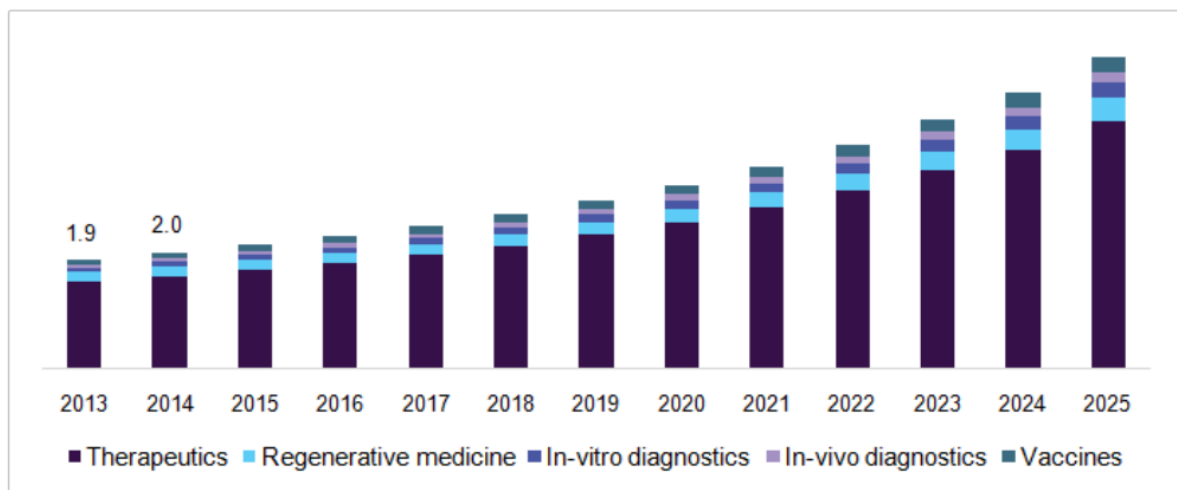
A nanotecnologia é uma ferramenta que vem sendo bastante explorada no cenário biomédico, tanto com aplicações terapêuticas, mas também aplicações em medicina regenerativa, vacinas e diagnóstico. Em 2016, o mercado global de produtos nanotecnológicos para aplicações médicas foi de 138,8 bilhões de dólares, valor que vem evoluindo nos últimos anos e que tem expectativa de continuar em evolução para os próximos, fato este que corrobora com a avaliação de novas estratégias terapêuticas pautadas em nanotecnologia. A figura 2 representa a evolução e a projeção dos próximos anos do mercado norte-americano para produtos nanotecnológicos com fins medicinais, o que evidencia a atualidade e relevância da proposta aqui relatada (GRAND VIEW RESEARCH, 2017).

Ainda nas abordagens nanotecnológicas para uma possível terapia anti-TB podemos destacar os lipossomas. Eles surgiram no início da década de 1960 e foram utilizados em estudos de modelo de membrana plasmática, pois são compostos por bicamadas lipídicas separadas por um conteúdo aquoso. Para a obtenção de lipossomas com aplicação biomédica são empregados componentes biocompatíveis como esteróis e fosfolipídeos. Estas nanoestruturas podem carrear substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, fato que as torna ainda mais versáteis (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; GREGORIADIS; RYMAN, 1971; KIMELBERG H.K., TRACY T.F., BIDDLECOME S.M., 1976; DA SILVA et al., 2016b).

Diversos estudos já empregaram lipossomas para encapsular compostos com potencial anti-*M. tuberculosis*, mas também há relatos na literatura do uso de lipossomas em aplicações diagnósticas e até preventivas da doença, como potentes adjuvantes vacinais (SOUZA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011; CUI et al., 2013; TIWARI et al., 2017; TIAN et al., 2018).

Figura 2. Evolução e projeção do mercado de produtos nanotecnológicos com aplicações médicas nos Estados Unidos.

U.S. nanomedicine market by products, 2013 - 2025 (USD Billion)

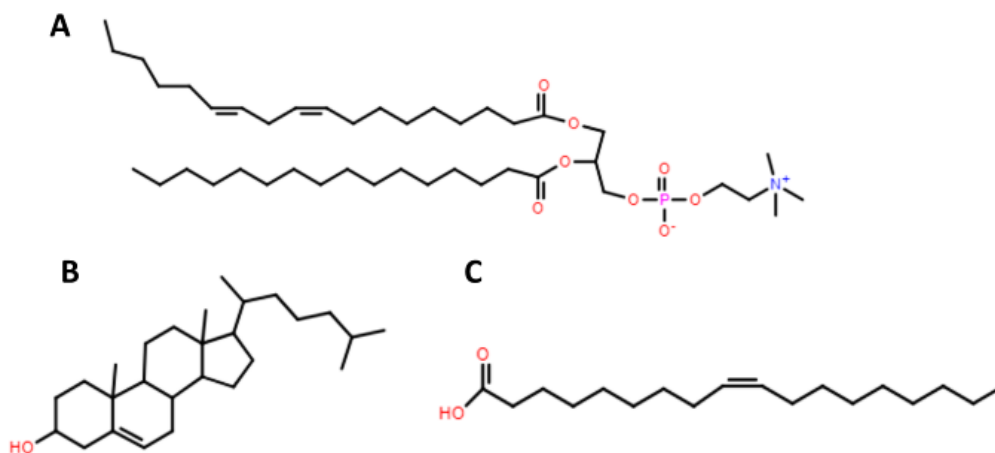


Fonte: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanomedicine-market>.

A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou em 2020 a comercialização de uma formulação de amicacina lipossomal em suspensão para inalação (ALIS) para o tratamento infecções pulmonares por bactérias do complexo *Mycobacterium avium*, também chamado de MAC. O medicamento em questão é comercializado com o nome ARIKAYCE e é produzido pela Insmmed Corporation. Sabe-se que a amicacina é um fármaco que apresenta muitos efeitos adversos e farmacocinéticos, exigindo uma administração intravenosa, a administração na forma de lipossomas ainda não é capaz de mitigar completamente os eventos adversos, mas consegue promover uma administração indolor e que não requer profissionais e estrutura de saúde, possibilitando uma melhor adesão ao tratamento e, possivelmente, uma taxa de cura maior (ROSE et al., 2014; ZHANG et al., 2018; B.V., 2020; CROMMELIN; VAN HOOGEVEST; STORM, 2020; INSMED INCORPORATED, 2020; CHALMERS et al., 2021; EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), 2021; HOY, 2021).

A aprovação de um medicamento na forma lipossomal, nos encorajou nesta proposta ainda mais pela administração intrapulmonar que é visada. Os lipossomas que serão empregados neste trabalho são constituídos de fosfatidilcolina de soja, colesterol e ácido oleico (OLA) e a figura 3 apresenta as estruturas moleculares destes componentes lipídicos.

Figura 3. Componentes lipídicos do lipossoma: (A) fosfatidilcolina de soja, (B) colesterol e (C) ácido oleico.



Fonte: autora.

A fosfatidilcolina de soja foi o fosfolípídeo escolhido devido a sua biocompatibilidade e estabilidade em relação a alterações de pH e concentração de sais (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; DA SILVA et al., 2016b). Outro componente escolhido foi o colesterol que confere maior estabilidade as vesículas, mesma função que exerce nas membranas das células (GREGORIADIS; RYMAN, 1971; KIMELBERG H.K., TRACY T.F., BIDDLECOME S.M., 1976).

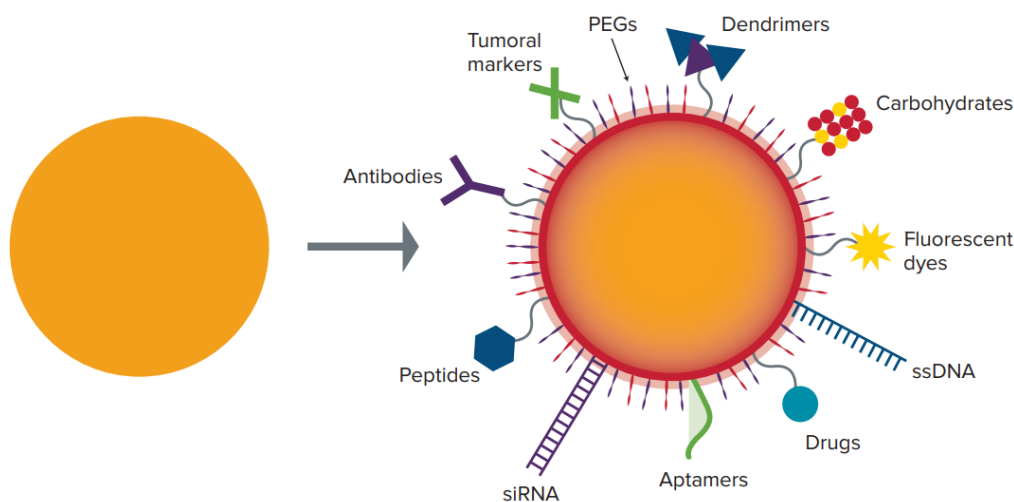
O último componente lipídico é o OLA, este por sua vez é um ácido graxo saturado, e sua ação em biológica é um pouco divergente entre os autores, mas já foi observado redução de citocinas pró-inflamatórias e produção de oxigênio reativo pelas mitocôndrias, ações estas que podem ser interessantes para o tratamento de TB (SOUZA et al., 2018).

A funcionalização de nanocarreadores, ou seja, a modificação da superfície de nanocarreadores com o objetivo de torná-los específicos a um alvo também é uma estratégia disponível para “*drug delivery*”(SUNDAR; PRAJAPATI, 2012). Esta é uma estratégia já bastante explorada na pesquisa de antitumorais, visando uma diferenciação entre células tumorais e saudáveis e com isso a redução de efeitos adversos (SUNDAR; PRAJAPATI, 2012; SALOUTI; AHANGARI, 2014; POETA et al., 2016).

Algumas moléculas utilizadas para funcionalizar nanocarreadores, ou seja, torná-los dirigidos a um alvo são, por exemplo: anticorpos monoclonais, folato, aptâmeros, peptídeos, transferrina e outras, como exemplificado na figura 4. Estas nanoestruturas com a superfície modificada podem ter diversas aplicações biomédicas, tais como: ação antitumoral, diagnóstico, ação teranóstica, tratamento de doenças infecciosas, doenças autoimunes, entre

outras (KIM E. SAPSFORD, W. RUSS ALGAR, 2013; RAMESHKUMAR; RAMARAJ, 2013; HURST et al., 2016).

Figura 4. Estratégias de funcionalização e direcionamento de nanopartículas.



Fonte: Hurst *et al*, 2016.

Para avaliar ainda se a utilização de uma modificação na superfície destes lipossomas pode trazer benefícios à sua atividade anti-*M. tuberculosis*, utilizou-se a estratégia da funcionalização com uma molécula semelhante a um sideróforo.

1.3. Sideróforos

Sideróforos são moléculas secretadas pelos microrganismos para promover o *uptake* de ferro para o citoplasma, isto porque uma molécula de sideróforos, no ambiente externo, se complexa com um átomo de ferro, através de interações eletrostáticas decorrentes da presença de átomos de oxigênio e nitrogênio com pares de elétrons livres e a nuvem eletrônica do átomo de ferro e, então, este complexo é internalizado pela bactéria, sendo que o sideróforos é reciclado e o ferro cumpre diversas funções intracelulares. Os sideróforos são específicos para cada gênero e até para espécies em alguns casos. Em *M. tuberculosis* os sideróforos encontrados são: carbomicobactina e micobactina (RATLEDGE, 2004; BARRY; BOSHOF, 2005; LUO; FADEEV; GROVES, 2005; AHMED; HOLMSTRÖM, 2014).

Na literatura podemos encontrar diversos trabalhos que exploram a conjugação de sideróforos ou moléculas análogas a sideróforos com fármacos como estratégia de direcionamento, uma analogia usada para esta estratégia é conhecida como “cavalo de troia” (WENCEWICZ et al., 2009; JI; JUÁREZ-HERNÁNDEZ; MILLER, 2012; JUÁREZ-

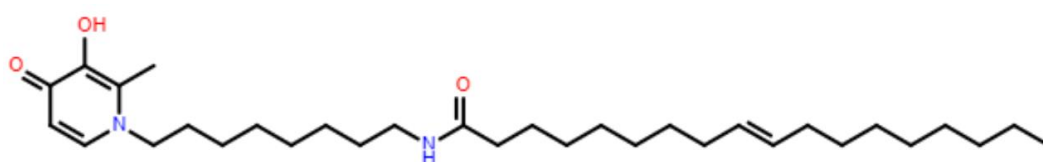
HERNÁNDEZ; FRANZBLAU; MILLER, 2012; JUÁREZ-HERNÁNDEZ; MILLER; MILLER, 2012; MCMAHON; ZIJL; GILAD, 2015); no entanto, o ineditismo de nossa proposta é a utilização do sideróforo como um direcionador de um lipossoma que carrega um potente antibiótico.

Outra possível vantagem de utilizar um nanocarreador é a fagocitose deste pelos macrófagos, fato já relatado na literatura, visto que este tipo celular é naturalmente responsável pela fagocitose de corpos estranhos e está intimamente relacionado com a patogênese de TB (GREF et al., 1994; PROSPERI et al., 2017).

Esta estratégia é chamada de **Natural targeting**, ou seja, os macrófagos são as células naturalmente responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos, e por este motivo, as nanopartículas são fagocitadas por estas células, no entanto, como o *M. tuberculosis* é um microrganismo capaz de sobreviver dentro dos macrófagos, é possível se aproveitar de um mecanismo imunológico de defesa para direcionar um tratamento para os bacilos intracelulares (GREF et al., 1994; PROSPERI et al., 2017).

A figura 5 ilustra a molécula usada para a síntese dos lipossomas funcionalizados análoga aos sideróforos (Sid).

Figura 5. Ácido oleico conjugado a uma molécula capaz de complexar com o átomo de ferro mimetizando a função do sideróforo.

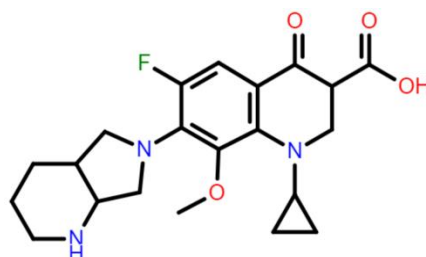


Fonte: autora.

1.4. Moxifloxacino

Sabendo a nanoestrutura que será empregada no desenvolvimento deste trabalho, que são os lipossomas, é o momento de dar destaque ao fármaco que será encapsulado: a Mox, cuja estrutura molecular está apresentada a figura 6, uma 8-metoxi quinolona.

Figura 6. Estrutura molecular de moxifloxacino da classe das fluoroquinolonas.



Fonte: autora.

A Mox é um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, que vem ganhando destaque nos últimos anos no tratamento anti-TB, embora sua ação não seja seletiva contra as bactérias do gênero *Mycobacterium sp.*, Mox sempre está presente em ensaios clínicos tanto em protocolos para tratamento de MDR-TB quanto em propostas de regimes mais breves de tratamento de cepas sensíveis e os resultados vem demonstrando seu grande potencial para o tratamento de TB (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2014, 2015a, 2015b). Possivelmente, daqui a alguns anos, tornando-se um fármaco de primeira escolha para o tratamento de TB.

Além disso, a resistência a Mox faz parte das classificações de pré-XDR e XDR-TB, dada sua importância no tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021)

O mecanismo de ação da Mox é a inibição da enzima DNA gyrase (codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*) e envolvida na replicação do DNA, conseqüentemente, inibindo a divisão celular (BRYSKIER, 1993; COLE et al., 1998; DRLICA; MALIK, 2003; MALIK et al., 2012).

Sabe-se que a Mox tem bons parâmetros farmacocinéticos, ou seja, baixa metabolização, alta biodisponibilidade, e conhecer a sua segurança é uma boa vantagem em estudar uma nova estratégia de “*drug delivery*” (STASS; KUBITZA, 1999; DESHPANDE et al., 2010; GILLESPIE, 2016).

Diante do apresentado, espera-se avaliar se a estratégia de usar um nanocarreador (lipossoma) contendo Mox traz alguma vantagem terapêutica com potencial para utilização contra TB e ainda avaliar se a funcionalização destes lipossomas com análogos de sideróforos são relevantes para a atividade biológica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver lipossomas funcionalizados com sideróforos e contendo moxifloxacino, caracterizá-los e avaliar o potencial *in vitro* contra *M. tuberculosis*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver os lipossomas: LipV (lipossoma vazio), LipMox (lipossoma contendo Mox), LipS (lipossoma vazio e funcionalizado com Sid) e LipSMox (lipossoma funcionalizado com Sid e contendo Mox);
- Determinar o diâmetro hidrodinâmico médio (HD), o índice de polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta (ZP) dos lipossomas pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS);
- Avaliar a estabilidade dos lipossomas armazenado em geladeira por 85 dias via DLS;
- Avaliar a estabilidade dos lipossomas na presença dos meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos e de citotoxicidade via DLS;
- Avaliar a estabilidade dos lipossomas em pH ácido (pH = 1,5) e pH neutro (pH = 7,4) mimetizando condições do trato gastrointestinal via DLS;
- Avaliar a estabilidade dos lipossomas após exposição de 15min a luz ultravioleta (UV) via DLS;
- Determinar o número de nanopartículas por mililitro e a distribuição de tamanho das nanopartículas pela análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificar Mox;
- Determinar a eficiência de encapsulação;
- Determinar o perfil de liberação;
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos lipossomas frente a *M. tuberculosis* sob diferentes condições (maiores concentrações de ferro (2x, 5x e 10x em relação a concentração tradicional), pH 7,4 e com a adição de 10% de soro fetal bovino (FBS);
- Determinar a curva de morte bacteriana (*time-kill*) frente ao antibiótico Mox, LipV, LipMox, LipS, LipSMox e Sid;

- Determinar a citotoxicidade dos lipossomas frente a macrófagos murinos (linhagem J774A.1), fibroblastos pulmonares (linhagem MRC-5) hepatócitos (linhagem HepG-2) e células intestinais (Caco-2);
- Determinar o índice de seletividade (IS) dos lipossomas frente as quatro linhagens celulares;
- Avaliar a genotoxicidade em células hepáticas (HepG-2) pela técnica de detecção de micronúcleos;
- Determinar a atividade anti-*M. tuberculosis* intramacrofágico dos lipossomas;
- Avaliar a interação de macrófagos (J774A.1) com os lipossomas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e varredura (SEM).

3. Conclusões

A presença do Sid nos lipossomas funcionalizados (LipS e LipSMox) resultou em um perfil físico-químico e biológico diferente dos lipossomas não funcionalizados (LipV e LipMox), como por exemplo: a carga superficial (ZP), positivo para LipS e LipSMox e negativo para LipV e LipMox, e a citotoxicidade (IC₅₀), em que se notou maior citotoxicidade para aqueles com o Sid na superfície dos lipossomas.

Em relação a atividade contra *M. tuberculosis in vitro* não houve diferença significativa entre LipMox, LipSMox e Mox livre em concentrações equivalentes como observado nos ensaios de determinação de MIC em condições padrão, *time-kill* e atividade intramacrofágica, concluindo que a funcionalização não teve relevância para o potencial anti-TB dos lipossomas desenvolvidos.

Entretanto, vale ressaltar que tanto a Mox livre quanto a Mox encapsulada (LipMox e LipSMox) apresentaram excelente atividade contra os bacilos de *M. tuberculosis* e até mesmo contra os bacilos intracelulares, como MIC < 1 µg/mL (Mox) e MIX < 1% (LipSMox e LipMox), atividade bactericida (redução de 99,9% do inóculo bacteriano inicial) em algumas concentração e redução de mais de 90% dos bacilos intramacrofágicos.

Outro achado deste trabalho de extrema relevância é a fagocitose dos lipossomas desenvolvidos pelos macrófagos vista nas imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e estas células têm uma grande importância na patogênese de TB, portanto, possibilitando uma entrega de fármaco no interior destas células.

Quando analisamos o direcionamento natural (*natural targeting*) através da ação fagocítica dos macrófagos, fica evidente a relevância de uma abordagem nanotecnológica contra *M. tuberculosis*, uma vez que o bacilo é capaz de sobreviver dentro dos macrófagos.

Propomos uma aplicação intrapulmonar destas nanopartículas para o tratamento de TB *in vivo*, pois supomos que uma administração intrapulmonar combinada a uma liberação controlada de Mox e capacidade de atingir aqueles bacilos intracelulares (através da fagocitose) é uma estratégia passível de bons resultados.

O fato de já existir no mercado um tratamento baseado no mesmo sistema nanotecnológico (lipossomas) e para um tratamento similar (infecção pulmonar por micobactérias), nos encoraja ainda mais a propor uma administração intrapulmonar e exemplifica que há espaço no mercado para produtos como este.

Além disso, a utilização de lipossomas por via intrapulmonar pode trazer até uma redução de efeitos adversos, melhoria de questões farmacocinéticas como a concentração dos antibióticos nas células alveolares, redução do efeito sobre a microbiota do paciente e até mesmo possibilita um aumento na adesão ao tratamento. O aumento na adesão pode diretamente influenciar em tratamentos mais eficazes e com menos casos recidivos e de resistência aos antibióticos disponíveis.

Referências Bibliográficas

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

B.V., I. N. ARIKAYCE Annex I: Summary of Product Characteristics. **European Medicines Agency (EMA)**, p. 116–130, 2020.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. IN26–IN27, 1965. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)>.

BARRY, C. E.; BOSHOF, H. Getting the iron out. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 3, p. 127–128, 2005.

BRYSKIER, A. Fluoroquinolones: mechanisms of action and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 3, p. 151–183, 1993.

CHALMERS, J. D.; VAN INGEN, J.; VAN DER LAAN, R.; HERRMANN, J. L. Liposomal drug delivery to manage nontuberculous mycobacterial pulmonary disease and other chronic lung infections. **European Respiratory Review**, v. 30, n. 161, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0010-2021>>.

COLE, S. T.; BROSC, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.;

GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/31159>>.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA AO SUS.

Rifampicina + Isoniazida utilizada para tratamento da tuberculose em comprimidos único Relatório de Recomendação. [s.l.: s.n.].

CROMMELIN, D. J. A.; VAN HOOGEVEST, P.; STORM, G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? **Journal of Controlled Release**, v. 318, p. 256–263, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>>.

CUI, H.; BOJ, B.; MA, U.; TANG, Y.; ZHAO, J.; XIAO, H. Target-responsive liposome activated by catalytic hairpin assembly enables highly sensitive detection of tuberculosis-related cytokine. **ChemComm**, p. 1–4, 2013.

DA SILVA, P. B.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, C. M.; DA SILVA, I. C.; PAVAN, F. R. New antimycobacterial agents in the pre-clinical phase or beyond: recent advances in patent literature (2001–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2016a. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2017.1253681>>.

DA SILVA, P. B.; DE FREITAS, E. S.; BERNEGOSI, J.; GONÇALEZ, M. L.; SATO, M. R.; LEITE, C. Q. F.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of tuberculosis-a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 2, p. 241–260, 2016b.

DESHPANDE, D.; SRIVASTAVA, S.; MEEK, C.; LEFF, R.; HALL, G. S.; GUMBO, T. Moxifloxacin pharmacokinetics/pharmacodynamics and optimal dose and susceptibility breakpoint identification for treatment of disseminated mycobacterium avium infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2534–2539, 2010.

DRLICA, K.; MALIK, M. Fluoroquinolones : Action and Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. February, p. 249–282, 2003.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). An overview of Libtayo and why it is authorised in the EU What is Libtayo and what is it used for ? v. 44, n. 0, p. 1–2, 2021. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mylotarg-epar-summary-public_en.pdf>.

FREITAS, E. S. De; BENTO DA SILVA, P.; CHORILLI, M.; BATISTA, A. A.; LOPES, É. D. O.; MARTINS, M.; LEITE, C. F. Q.; PAVAN, F. R. Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the *in vitro* Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds. **Molecules**, v. 19, p. 5999–6008, 2014.

GILLESPIE, S. H. The role of moxifloxacin in tuberculosis therapy. **European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society**, v. 25, n. 139, p. 19–28, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0085-2015>>.

GRAND VIEW RESEARCH. **Nanomedicine market analysis by products, by application,**

by nanomolecule and segment forecast. Disponível em:

<<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanomedicine-market>>.

GREF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. **Science**, v. 263, p. 1600–1605, 1994.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **Cell**, n. July, p. 8–10, 1971.

HOY, S. M. Amikacin Liposome Inhalation Suspension in Refractory Mycobacterium avium Complex Lung Disease: A Profile of Its Use. **Clinical Drug Investigation**, v. 41, n. 4, p. 405–412, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40261-021-01010-z>>.

HURST, M. N.; DELONG, R. K.; INNOVATION, N.; STATE, K. Spectral signature analysis of surface functionalized nanoparticles. **Molecular Divesces**, 2016.

INSMED INCORPORATED. **Medication Guide - Arikayce**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.arikayce.com/pdf/medication-guide.pdf?v=2.19>>.

JI, C.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, R. E.; MILLER, M. J. Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 297–313, 2012. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.11.191>>.

JOHNSON, J. L.; HADAD, D. J.; DIETZE, R.; LEONOR, E.; MACIEL, N.; SEWALI, B.; GITTA, P.; OKWERA, A.; MUGERWA, R. D.; ALCANESES, M. R.; QUELAPIO, M. I.; TUPASI, T. E.; HORTER, L.; DEBANNE, S. M.; EISENACH, K. D.; BOOM, W. H. Shortening Treatment in Adults with Noncavitary Tuberculosis and 2-Month Culture Conversion. n. 8, p. 1–6, 2009.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, R. E.; FRANZBLAU, S. G.; MILLER, M. J. Syntheses of mycobactin analogs as potent and selective inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 37, p. 7584, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ob26077h>>.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, R. E.; MILLER, P. A.; MILLER, M. J. Syntheses of siderophore-drug conjugates using a convergent thiol-maleimide system. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n.10, p. 799–803. <https://doi.org/10.1021/ml300150y> 2012.

KIM E. SAPSFORD, W. RUSS ALGAR, L. B. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. **Chemical reviews**, v. 113, n. 3, p. 1904–2074, 2013.

KIMELBERG H.K., TRACY T.F., BIDDLECOME S.M., B. R. S. The effect of entrapment in liposomes on the *in vivo* distribution of [3H]methotrexate in a primate. **Cancer Research**, v. 36, n. August, p. 2949 – 2957, 1976.

LUO, M.; FADEEV, E. A.; GROVES, J. T. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 3, p. 149–153, 2005.

MALIK, S.; WILLBY, M.; SIKES, D.; TSODIKOV, O. V.; POSEY, J. E. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

MCMAHON, T.; ZIJL, P. C. M. Van; GILAD, A. A. NIH Public Access. v. 27, n. 3, p. 320–331, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Tuberculose**. Acessado em 24/04/2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Panorama da tuberculose no Brasil**: indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 72 p.

<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/panorama-da-tuberculose-no-brasil-indicadores-epidemiologicos-e-operacionais>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Tuberculose 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 3, n. 1, p. 44, 2021. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03#:~:text=Em 2020%2C o Brasil registrou,óbitos por 100 mil habitantes.](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03#:~:text=Em%2020%2C%20o%20Brasil%20registrou%20%C3%B3bitos%20por%20100%20mil%20habitantes.)>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Brief Bactericidal Activity of Anti-Tuberculosis Drugs (BBA)**. Disponível em:

<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236078?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=4.>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Pragmatic Clinical Trial for a More Effective Concise and Less Toxic MDR-TB Treatment Regimen(s)**. Disponível em:

<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02589782?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=7.>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of High-Dose Rifapentine and Moxifloxacin for Treatment of Tuberculosis (S31PK/PD)**. Disponível em:

<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02563327?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=1.>>.

PINHEIRO, M.; LÚCIO, M.; LIMA, J. L.; REIS, S. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. **Nanomedicine**, v. 6, n. 8, p. 1413–1428, 2011.

POETA, P.; DJAFAR, J.; MARINHO, C.; SANTOS, T.; L, C. J.; FERNANDEZ-LODEIRO, J.; TORRES, C.; SANTOS, H. M.; LOFEIRO, C. Antibacterial properties of functionalized nanoparticles (AgNPs-AB and AuNPs-AB) against antibiotic resistant bacteria with public health concerning. **6th Clinical Microbiology Conference**, v. 5, n. 5, p. 5073, 2016.

PROSPERI, D.; COLOMBO, M.; ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases. **Seminars in Immunology**, n. August, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.010>>.

RAMESHKUMAR, P.; RAMARAJ, R. Gold nanoparticles deposited on amine functionalized silica sphere and its modified electrode for hydrogen peroxide sensing. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1005–1010, 2013.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1–2, p. 110–130, 2004.

ROSE, S. J.; NEVILLE, M. E.; GUPTA, R.; BERMUDEZ, L. E. Delivery of aerosolized liposomal amikacin as a novel approach for the treatment of nontuberculous mycobacteria in an experimental model of pulmonary infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–7, 2014.

SALOUTI, M.; AHANGARI, A. Nanoparticle based Drug Delivery Systems for Treatment of Infectious Diseases. In: **Intech Open Science Open Minds**. [s.l: s.n.]p. 155–192.

SOUZA, A. O. de; SILVA, C. L.; DURÁN, N.; ANDRADE-SANTANA, M. H. Antimycobacterial and Cytotoxicity activities of free and liposome-encapsulated 3-(4'-Bromo[1,1'-Biphenyl-4-YL])-3-(4-Bromo-Phenyl)-N,N-Dimethyl-2-Propen-1-Amine. **Quim. Nova**, v. 33, n. 4, p. 871–874, 2010.

SOUZA, C. O. De; VALENZUELA, C. A.; BAKER, E. J.; MILES, E. A.; NETO, C. R.; CALDER, P. C. Palmitoleic Acid has Stronger Anti-Inflammatory Potential in Human Endothelial Cells Compared to Oleic and Palmitic Acids. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 1800322, p. 1–12, 2018.

STASS, H.; KUBITZA, D. Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 43, Suppl B, p. 83–90, 1999.

SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 19, p. 3196–202, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SZUMOWSKI, J. D.; ADAMS, K. N.; EDELSTEIN, P. H. Antimicrobial Efflux Pumps and *Mycobacterium tuberculosis* Drug Tolerance : Evolutionary Considerations. n. December 2012, p. 81–108, 2013.

TIAN, M.; ZHOU, Z.; TAN, S.; FAN, X.; LI, L.; ULLAH, N. Formulation in DDa-MPla-TDB liposome enhances the immunogenicity and Protective efficacy of a Dna Vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. February, 2018.

TIWARI, D.; HAQUE, S.; TIWARI, R. P.; JAWED, A.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G. Fast and efficient detection of tuberculosis antigens using liposome encapsulated secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 2, p. 189–198, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.05.014>.

WENCEWICZ, T. A.; MÖLLMANN, U.; LONG, T. E.; MILLER, M. J. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine- antibiotic conjugates. **BioMetals**, v. 22, n. 4, p. 633–648, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). **Global Report on Surveillance response**. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). **Burden, Global Treatment, Enrollment O N Mdr-tb Outcomes, Treatment**, Geneva, 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2016**. Cdc 2016, n. Global TB Report 2016, p. 214, 2016b. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+title#0>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.

ZHANG, J.; LEIFER, F.; ROSE, S.; CHUN, D. Y.; THAISZ, J.; HERR, T.; NASHED, M.; JOSEPH, J.; PERKINS, W. R.; DIPETRILLO, K. Amikacin liposome inhalation suspension

(ALIS) penetrates non-tuberculous mycobacterial biofilms and enhances amikacin uptake into macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.