



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

RACHEL TEMPERANI AMARAL MACHADO

**“Estudo de caracterização do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II)
incorporado ao sistema lípidico nanoestruturado e sua atividade anti-
Mycobacterium tuberculosis”**

Araraquara, SP

2021

RACHEL TEMPERANI AMARAL MACHADO

“Estudo de caracterização do complexo *tris*-(1,10-fenantrolina)ferro(II) incorporado ao sistema lípidico nanoestruturado e sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de Biotecnologia, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Coorientadora: Dr^a. Patricia Bento da Silva

Araraquara, SP

2021

M149e Machado, Rachel Temperani Amaral.
Estudo de caracterização do complexo tris-(1,10-fenantrolina) ferro (II) incorporado ao sistema lipídico nanoestruturado e sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* / Rachel Temperani Amaral Machado. – Araraquara: [S.n.], 2021.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Fernando Rogério Pavan.
Coorientadora: Patricia Bento da Silva.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Fenantrolina. 3. Tris1. 4. 10-fenantrolina ferro(II). 5. Sistema lipídico nanoestruturado. 6. Novos antibióticos. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Silva, Patricia Bento da, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo de caracterização do complexo tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) incorporado ao sistema lipídico nanoestruturado e sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

AUTORA: RACHEL TEMPERANI AMARAL MACHADO

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

COORIENTADORA: PATRÍCIA BENTO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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. ROBERTO SANTANA DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 25 de outubro de 2021

Agradecimentos

Aos meus pais, Flavio e Rosangela e a minha irmã Larissa que nunca mediram esforços para me apoiar e me fazer feliz.

A Camila, minha noiva. Obrigada por todo o amor, paciência, cooperação, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório e da pós-graduação, pelo apoio, suporte e ensinamento. Agradeço por todos os nossos momentos compartilhados, sendo estes difíceis ou alegres.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, por toda sua dedicação e pela confiança e liberdade a mim concebidos para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora, Dr^a Patrícia Bento da Silva, por ser durante todos esses anos o meu “porto seguro científico”, com toda sua paciência, seu companheirismo, sua dedicação e conhecimento.

Ao CNPQ (processo: 130612/2019-7) e à FAPESP (processo: 2019/10326-7) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho, sem o qual para mim este sonho não seria possível.

Ao programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia de UNESP-AQA e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP de Araraquara, o local que com muito orgulho e honra considero minha casa.

“O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma.” - Albert Einstein

Resumo

A tuberculose (TB), apresenta cerca de 10 milhões de casos por ano em todo o mundo. Além disso, as elevadas taxas de resistência às principais classes de antimicrobianos contribuem para que a TB se encontre entre os maiores causadores de morte por um agente infeccioso. Sendo assim, faz-se evidente a necessidade de controle e combate dessa doença que representa uma séria ameaça à saúde pública global. Para tanto, é preciso enfrentar o desafio do desenvolvimento de novos agentes ativos contra a TB. Nesse trabalho, o complexo metálico tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), foi selecionado para o estudo, visto que trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que este complexo é um bom candidato contra TB. Além disso, quando incorporado a um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) demonstrou boa biodisponibilidade oral. Diante desses fatos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o complexo incorporado ao SLN e verificar sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*. A frequência de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é menor do que a de outros fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose, como a rifampicina. Ele se mostrou específico na inibição de micobactérias. Foi possível obter sistemas lipídicos nanoestruturados constituídos de colesterol como fase oleosa, fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e Eumulgin® HRE 40 [óleo de rícino de polioxil 40 hidrogenado]; na proporção de 3: 6: 8, como tensoativo e tampão-fosfato pH 7,4 como fase aquosa (SLN) e incorporar com sucesso o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ao mesmo (SLN+ $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$). A formulação de SLN+ $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ revelou-se estável por até 90 dias a 5°C e também se apresentam estáveis após 24h em soluções de pHs que remetem os encontrados no estômago e no sangue, e em contato com meios de cultura utilizados em outras metodologias *in vitro*, comprovando a integridade das partículas durante estes ensaios. O SLN mostrou uma taxa de eficiência de encapsulamento próxima a 60% de $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. Partículas de SLN+ $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ mostraram-se homogêneas (Pdl = 0,17), apresentando carga superficial negativa de -34,7mV e tamanho médio de 163nm, definido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e confirmado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que também revelou sua morfologia esférica. $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ apresentou um valor de CIM₉₀ de 4,17 µM na sua forma livre e 23,39 µM quando incorporado no SLN. Estudos futuros devem analisar o perfil de liberação *in vitro*, a atividade *in vivo* e segurança do SLN+ $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ para entender se esta combinação tem potencial para prosseguir como candidato a contra a tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, fenantrolina, tris1,10-fenantrolina ferro (II), sistema lipídico nanoestruturado, novos antibióticos.

Abstract

Tuberculosis (TB) presents about 10 million cases per year worldwide. In addition, the high rates of resistance to the main classes of antimicrobials contribute to TB being among the biggest killers of an infectious agent. Thus, the need to control and combat this disease, which represents a serious threat to global public health, is evident. Therefore, it is necessary to face the challenge of developing new agents active against TB. In this work, the metallic complex tris-(1,10-phenanthroline)iron(II) ($[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$) was selected for the study, as previous works by our group demonstrated that this complex is a good candidate against TB. Furthermore, when loaded into a nanostructured lipid system (NLS) it demonstrated good oral bioavailability. Given these facts, the objective of this work was to characterize the complex incorporated into NLS and verify its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. The frequency of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ is lower than that of other first-line drugs for the treatment of tuberculosis, such as rifampicin. It has been shown to be specific in inhibiting mycobacteria. It was possible to obtain NLS consisting of cholesterol as the oil phase, soy phosphatidylcholine, sodium oleate and Eumulgin® HRE 40 [polyoxyl 40 hydrogenated castor oil]; in a ratio of 3: 6: 8, as surfactant and phosphate-buffer pH 7.4 as aqueous phase, and successfully load the complex $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ to it (NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$). The NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ formulation proved to be stable for up to 90 days at 5°C and are also stable after 24 hours in solutions with pHs that match those found in the stomach and blood, and in contact with means of culture used in other in vitro methodologies, proving the integrity of the particles during these assays. NLS showed a entrapment efficiency rate close to 60% of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$. NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ particles were homogeneous (Pdl = 0.17), with a negative surface charge of -34.7mV and average size of 163nm, defined by the dynamic light scattering (DLS) technique and confirmed by transmission electron microscopy (TEM), which also revealed its spherical morphology. $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ had a MIC₉₀ value of 4.17 µM in its free form and 23.39 µM when incorporated into NLS. Future studies must analyze the in vitro release profile, and the *in vivo* activity and safety of NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ in order to fully understand whether this combination of the $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ and the NLS has the potential to proceed as a drug candidate against TB.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, phenanthroline, tris 1,10-phenanthroline iron (II), new antibiotics

Lista de Siglas e Abreviaturas

[Fe(fen) ₃] ²⁺	tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II)
[Fe(phen) ₃] ²⁺	tris-(1,10-phenantrolin)iron(II)
ATR	Attenuated total reflectance
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
bipi	Bipiridina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COVID-19	Coronavirus disease 2019
DLS	Dynamic Light Scattering
DL%	Drug loading capacity
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EE%	Entrapment efficiency
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ETB	etambutol, ethambutol
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro, Iron
fen	Fenantrolina
FTIR	Fourier Transform Infrared
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICP-Ms	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
INH	isoniazida, isoniazid
IPD	Índice de Polidispersão
LOD	Limit of detection
MIC	Minimum inhibitory concentration
NLS	Nanostructured lipid system

NLS+[Fe(phen)₃]²⁺ tris-(1,10-phenantrolin)iron(II) loaded into the Nanostructured lipid system

OADC	Suplemento de meio de cultura, a base de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase; oleic acid, albumin, dextrose and catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PdI	Polydispersity index
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PZ	Potencial Zeta
PZA	pirazinamida, pyrazinamide
REMA	Resazurin Microtiter Assay
RIF	rifampicina, rifampicin
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLN	Sistema Lipídico Nanoestruturado
TB	Tuberculose, Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TEM	Transmission electron microscope
UFC	Unidades formadoras de colônia
ZP	Zeta Potential
Z average	Mean particle size

Lista de Figuras

Capítulo I

- Figura 1.** Esquema terapêutico para TB suscetível aos fármacos..... 14
- Figura 2.** Estimativa da OMS de números de casos de tuberculose resistente aos fármacos e porcentagem de tratamento em 2019..... 16
- Figura 3.** Estrutura química da 1,10-fenantrolina..... 18
- Figura 4.** Estrutura química de tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$). 19

Capítulo II

- Figure 1.** Vibrational spectra in the infrared region of the aqueous solution and freeze-dried $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 2.** (I) DLS size distribution by intensity for NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$; (II) Zeta Potential for NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$. (III) TEM micrographs illustrating the size and morphology..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 3.** Values and 95% confidence interval of the Average particle size (Z Average), Zeta potential (ZP) and the polydispersity index (Pdl), of the NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ formulations, over 90 days stored at 5°C **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 4.** Values and 95% confidence interval (95% CI) of the Average particle size (Z Average), Zeta potential (ZP) and the polydispersity index (Pdl), of the NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ formulations, over 90 days stored at room temperature..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 5.** Values and 95% confidence interval (95% CI) of the Average particle size (Z Average), Zeta potential (ZP) and the polydispersity index (Pdl), of the NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ formulations, over 90 days stored at 37°C **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 6.** Mean particle size (Z Average), Polydispersity Index (Pdl) and Zeta Potential (ZP) values of NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, in solutions with different pHs..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 7.** Mean particle size (Z Average), Polydispersity Index (Pdl) and Zeta Potential (ZP) values of NLS and NLS+ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, in culture medium. **Erro! Indicador não definido.**

Lista de Tabelas

Capítulo II

Table 1. Vibrational frequencies in the infrared region (cm^{-1}) referring to the aqueous solution and freeze-dried $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, and their respective assignments **Erro! Indicador não definido.**

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC90) of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) against a variety of bacterial strains. **Erro! Indicador não definido.**

Table 3. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC90) of tris-(1,10-phenanthroline) iron (II) complex against the sensitive strain Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Erro! Indicador não definido.**

Sumário

<i>Capítulo I</i>	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Tuberculose: Dados gerais, epidemiologia e tratamento	12
1.2 Complexos Metálicos e <i>tris</i> -(1-10-fenantrolina)ferro(II)	17
1.3 Nanotecnologia Farmacêutica e os Sistema Lipídicos Nanoestruturados....	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos específicos:	23
3. REFERÊNCIAS	24
<i>Capítulo II</i>	Erro! Indicador não definido.
Abstract.....	Erro! Indicador não definido.
Introduction.....	Erro! Indicador não definido.
Materials and Methods	Erro! Indicador não definido.
1. Compounds and anti-TB drugs.....	Erro! Indicador não definido.
2. Bacterial culture.....	Erro! Indicador não definido.
3. Fourier Transform Infrared (FTIR)	Erro! Indicador não definido.
4. Biological Assays.....	Erro! Indicador não definido.
a. Evaluation of activity spectrum.....	Erro! Indicador não definido.
b. Resistance frequencies	Erro! Indicador não definido.
c. Anti-Mycobacterium tuberculosis analysis.....	Erro! Indicador não definido.
5. NLS obtaining and [Fe(phen) ₃] ²⁺ incorporation ...	Erro! Indicador não definido.
6. NLS Characterization	Erro! Indicador não definido.
a. Microscopy	Erro! Indicador não definido.
b. Dynamic Light Scattering (DLS)	Erro! Indicador não definido.
c. Storage Stability	Erro! Indicador não definido.
d. Stability in culture media and solutions with different pHs.....	Erro! Indicador não definido.
e. Entrapment efficiency and Drug loading capacity	Erro! Indicador não definido.
f. Quantification by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)	Erro! Indicador não definido.
Results	Erro! Indicador não definido.

1. Fourier Transform Infrared (FTIR)	Erro! Indicador não definido.
2. Biological Assays.....	Erro! Indicador não definido.
a. Evaluation of activity spectrum.....	Erro! Indicador não definido.
b. Resistance frequencies	Erro! Indicador não definido.
c. Anti-Mycobacterium tuberculosis analysis.....	Erro! Indicador não definido.
3. NLS and NLS+[Fe(phen) ₃] ²⁺ Characterization	Erro! Indicador não definido.
a. DLS data and TEM images	Erro! Indicador não definido.
b. Storage Stability	Erro! Indicador não definido.
c. Stability in culture media and solutions with different pHs.....	Erro! Indicador não definido.
d. Entrapment efficiency.....	Erro! Indicador não definido.
Discussion	Erro! Indicador não definido.
References	Erro! Indicador não definido.

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: Dados gerais, epidemiologia e tratamento

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas do mundo. Evidências encontradas em múmias egípcias datadas de 2400 a.C. revelaram deformidades esqueléticas típicas da tuberculose (BARBERIS et al., 2017). Apesar de sua origem antiga, ainda hoje ela representa um grande desafio para a saúde pública mundial. É uma doença infectocontagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium canettii*) (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). Sendo o *M. tuberculosis* sua principal espécie causadora, identificada pelo alemão Robert Koch, em 1882. Embora afete comumente os pulmões, também pode afetar outros órgãos sendo então denominada TB extrapulmonar (PAI et al., 2016).

Em geral, a transmissão da doença ocorre quando indivíduos saudáveis entram em contato com gotículas (aerossóis) expelidas por indivíduos infectados pelo bacilo em sua forma ativa, através da tosse, espirros ou fala, por exemplo. Somente uma pequena taxa de indivíduos que foram expostos, cerca de 5 a 10 %, desenvolverão a doença. No entanto, a probabilidade de desenvolver TB é muito maior entre aqueles coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), também é maior entre as pessoas afetadas por fatores de risco como desnutrição, diabetes, tabagismo e consumo de álcool (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

Os indivíduos expostos ao bacilo que não desenvolvem a doença apresentam resposta imune celular eficaz para conter a infecção, e então o *M. tuberculosis* pode assumir o estado de latência (WARD; HOYE; TALAAT, 2008). O processo de TB latente ocorre quando nos pulmões, macrófagos fagocitam os bacilos, esse processo induz uma resposta pró-inflamatória com o recrutamento de mais macrófagos, linfócitos T, plasmócitos e fibroblastos, iniciando a formação do granuloma. Nesse complexo a bactéria permanece em um estado não-replicante (dormente), considerado não infeccioso e que pode permanecer assim por anos. No entanto, à medida que a imunidade diminui, através do envelhecimento ou da imunossupressão, os bacilos dormentes podem ser reativados, o que resulta no desenvolvimento da

forma ativa da TB no indivíduo, que muitas vezes ocorre décadas após a infecção inicial (RUSSELL, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que houve cerca de 10 milhões de casos de TB no mundo em 2019. Deste total 1,4 milhão vieram a óbito em decorrência da doença, dos quais 208.000 mortes correspondem a coinfeções TB-HIV. As coinfeções de TB e HIV recebem grande atenção pois a interação entre as duas doenças apresenta altas taxas de morbidade e de mortalidade, chegando a ser nomeada como “dueto maldito”. Nos dias atuais outra infecção que é capaz de recordar esse dueto, junto com a TB, é a da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) causadora da COVID-19 (coronavirus disease 2019) (VISCA et al., 2021). Mais evidências são necessárias para compreender o potencial da COVID-19 em impactar na reativação de bacilos em estado de latência, por exemplo. Mas alguns autores já trazem a discussão de que a imunossupressão causada pela própria doença ou pelo uso de medicamentos durante o tratamento da COVID-19 poderão impactar futuramente neste quesito (CRISAN-DABIJA et al., 2020; SILVA et al., 2021; YANG; LU, 2020). A pandemia de COVID-19 poderá afetar drasticamente a carga global tuberculose nos próximos anos, aumentando o número de mortes em decorrência da doença já que em muitos locais os serviços de saúde apresentam-se sobrecarregados diminuindo os números de detecção e tratamentos de TB. A estimativa da OMS é de que houveram 1,8 milhões de mortes por TB em 2020 no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

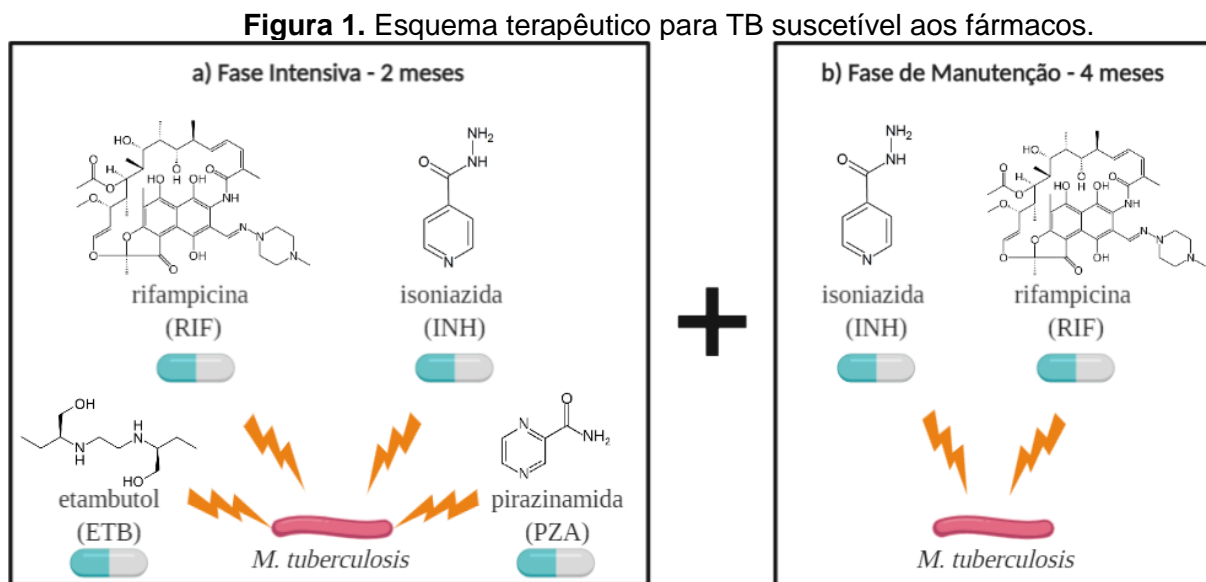
O Brasil encontra-se entre os 30 países que juntos, concentram 87% dos casos da doença no mundo. Nos últimos anos o país encontra-se em uma tendência de alta no número de incidência de casos. No ano de 2019, foram notificados 96mil novos casos e 4,9 mil mortes por esta patologia, além de mais 1,8 mil mortes entre os portadores de HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). No país, geralmente a doença está relacionada com as más condições de moradia, nutrição e saneamento básico, ao uso e abuso de álcool, drogas ilícitas e às doenças imunossupressoras, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) afetando, principalmente, as periferias urbanas, como as favelas e as áreas degradadas dos grandes centros (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2017).

A única vacina licenciada para prevenção da tuberculose é a BCG ou bacilo Calmette-Guérin. A BCG foi desenvolvida há quase 100 anos e previne formas graves de TB em crianças, sendo amplamente utilizada. Atualmente, não existe uma vacina

eficaz na prevenção da doença em adultos, embora os resultados de um estudo de fase II do candidato M72/AS01E sejam promissores (VAN DER MEEREN et al., 2018).

O tratamento de novos casos de TB suscetível no Brasil conta com um esquema terapêutico de duas fases (Figura 1), fase intensiva (Fig 1a) e fase de manutenção (Fig 1b). Segundo o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), na fase intensiva, que corresponde a um período de dois meses, são administrados por via oral a combinação de quatro fármacos de primeira-linha, rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZA). Após este período, inicia-se a fase de manutenção, em que se utiliza apenas RIF e INH por mais quatro meses de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A Fase de manutenção pode se estender por mais 3 meses, totalizando 7 meses, em casos em que o paciente possui um maior risco de recidiva como, por exemplo, no caso de HIV positivos, imunossupressão, diabéticos insulino-dependentes, fumantes etc. Os quatro fármacos utilizados no esquema terapêutico padrão desde o ano de 2009, possuem mecanismos de ação diferentes, fator que contribuiu para uma grande diminuição no tempo de tratamento, que até a década de 60 era de 18 meses de duração (RABAHI et al., 2017).



Fonte: Autora

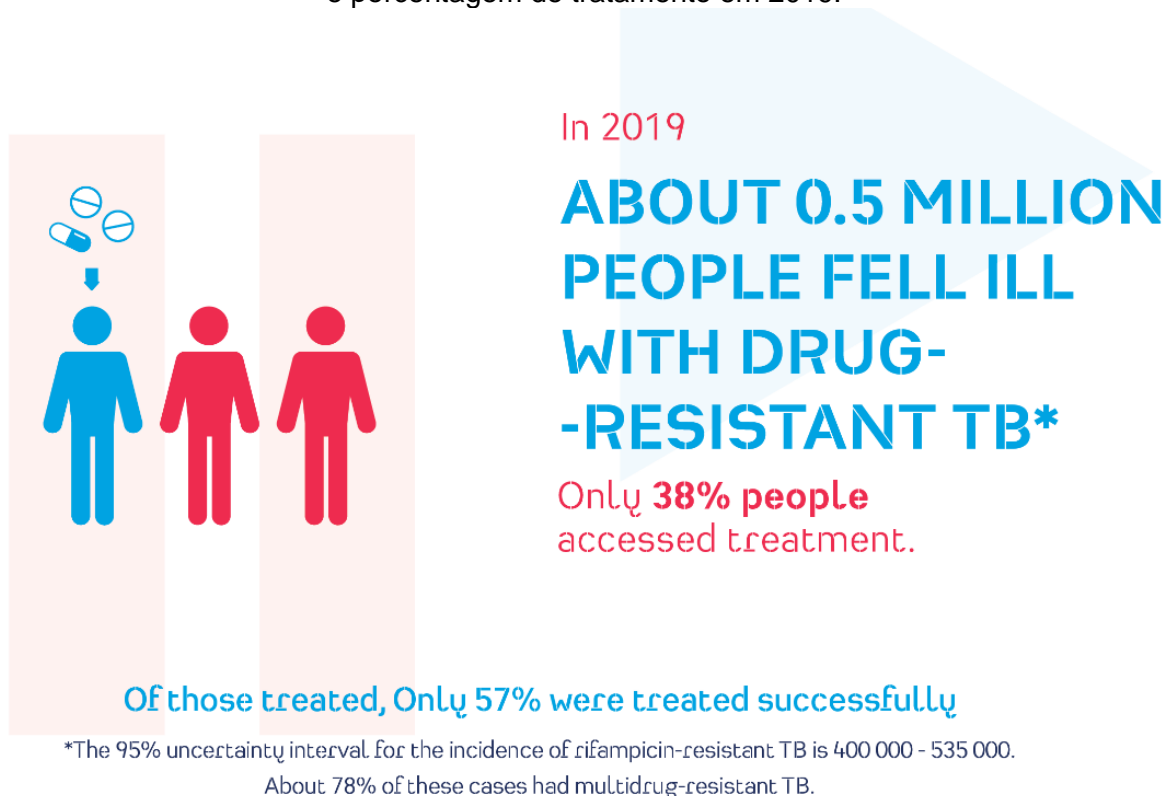
A RIF age inibindo a elongação do RNA durante o processo de transcrição impedindo a síntese de proteínas das células da micobactéria. A PZA ainda não possui seu mecanismo de ação completamente desvendado, mas sabe-se que seu

metábolo ativo, o ácido propiônico reduz o pH intramacrofágico impedindo o crescimento dos bacilos. Os fármacos INH e ETB inibem a formação da parede celular das células das micobacterias impedindo a formação de dois dos principais constituintes da mesma, que são os ácidos micólicos e arabinogalactanos, respectivamente. A INH, fármaco específico em inibir micobacterias, é um profármaco que quando ativado pela enzima KatG gera espécies reativas de oxigênio que impedem a formação dos ácidos micólicos. Enquanto o ETB possui como alvo a arabinosil transferase interrompendo a formação da camada de arabinogalactano (SHETYE; FRANZBLAU; CHO, 2020).

Quando o tratamento de primeira-linha se mostra ineficaz devido à resistência do bacilo aos fármacos, realiza-se o tratamento com fármacos de segunda-linha por exemplo, pertencentes ao grupo de aminoglicosídeos injetáveis e ao grupo de fluoroquinolonas.

A TB multidroga resistente (TB-MDR) é definida como a resistência do bacilo aos dois principais fármacos de primeira-linha, INH e RIF. Uma nova definição da Organização Mundial da Saúde, é a forma de pré resistência estendida (Pré-TB-XDR) que se caracteriza pela resistência a INH e RIF somada a qualquer uma das fluoroquinolonas. Já a forma de resistência estendida (TB-XDR) atende a definição de Pré-TB-XDR além de também ser resistente a um dos fármacos de segunda-linha, bedaquilina ou linezolida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Somente no ano de 2019 a estimativa foi de 465.000 casos com apenas 38% destes casos recebendo o tratamento adequado (figura 2), 182.000 mortes causadas por TB-MDR e o relato de TB-XDR em 128 países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Figura 2. Estimativa da OMS de números de casos de tuberculose resistente aos fármacos e porcentagem de tratamento em 2019.



Fonte: <https://www.who.int/campaigns/world-tb-day/world-tb-day-2021/campaign-materials>

O regime de tratamento para TB-MDR é mais longo e requer fármacos mais caros e mais tóxicos. Para a maioria dos pacientes com TB-MDR, as taxas de sucesso do tratamento são muito menores do que aqueles para a TB suscetível a fármacos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Em 2013, dois novos fármacos (bedaquilina e delamanida) foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para uso na terapia anti-TB (MAHAJAN, 2013; RYAN; LO, 2014). No entanto, eles receberam apenas uma aprovação regulatória condicional, sendo reservados para os casos de TB-MDR e utilizados na terceira linha de tratamento.

Uma das maiores dificuldades encontradas na cura da TB é a baixa adesão ao tratamento, que por ser muito longo, com muitos fármacos e efeitos adversos, acaba gerando uma desistência de aproximadamente 17% das pessoas. Outro problema enfrentado é a alta resistência aos fármacos já existentes para TB. O fato de pessoas

não concluírem o tratamento, contribui ainda mais para o aumento da resistência bacteriana (COUTO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Em 2017 a OMS destacou, em seu relatório anual, o *M. tuberculosis* como um patógeno prioritário para a pesquisa e desenvolvimento contínuo de novos antibióticos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Já que as tecnologias empregadas para prevenir, diagnosticar e tratar a TB foram desenvolvidas no século XX, e o patógeno continua a evoluir e desenvolver padrões de resistência complexos para os fármacos disponíveis na terapia, torna-se evidente a necessidade de desenvolver agentes contra a tuberculose mais novos, potentes e seguros que possuam um novo mecanismo de ação sendo capazes de inibir bacilos resistentes aos fármacos e que sejam potencialmente efetivos em bactérias intracelulares e não replicantes, otimizando o atual tratamento da TB (VASAVA et al., 2017; WELLINGTON; HUNG, 2018).

1.2 tris-(1-10-fenantrolina)ferro(II)

O uso de metais e complexos metálicos como fármacos em terapias vem crescendo e se tornando cada vez mais importante ao longo das últimas décadas, além do notável sucesso de fármacos anticâncer, como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, os complexos metálicos também mostraram resultados promissores no tratamento de uma variedade de doenças como: diabetes, úlcera, artrite reumatoide, doenças inflamatórias, infecciosas, cardiovasculares etc. (BHARTI; SINGH, 2009).

O ferro (Fe) está entre os elementos de transição mais abundantes na Terra e é um dos micronutrientes essenciais amplamente utilizado por quase todos os organismos vivos para realizar uma grande quantidade de processos bioquímicos. É considerado como um elemento-traço, levando esse nome por estar presente no organismo em pequenas concentrações, porém realizando um papel indispensável nos processos fisiológicos e metabólicos nos seres vivos (WADA, 2004). Esse metal possui a capacidade de formar complexos de grande estabilidade nos estados bi e trivalente (ZHANG; SEN; GIEDROC, 2020).

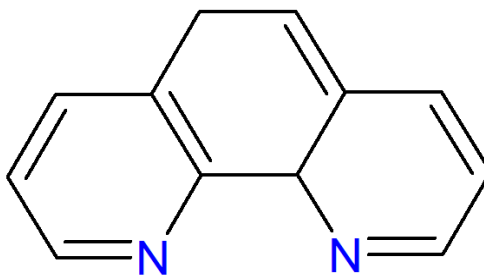
O nitroprussiato de sódio, é um exemplo de fármaco que contém ferro, bem conhecido e estabelecido na terapia. É um sal de sódio com um complexo de Fe^{2+} e óxido nítrico que vem sendo utilizado como um vasodilatador e regulador de pressão arterial por mais de 40 anos (HOTTINGER et al., 2014).

Como demonstrado em estudos anteriores, diferentes complexos com o íon Fe apresentam atividade antimicrobacteriana. Em um desses estudos, complexos de Fe (II) e Fe (III) com 3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila e dióxido como ligantes, foram sintetizados por Tarallo e colaboradores. Estes complexos foram mais ativos frente ao *M. tuberculosis* do que os ligantes sozinhos, apresentando valor de MIC₉₀ de 0,78 µg/mL (TARALLO et al., 2010). Outro estudo, realizado por Campos e colaboradores, evidenciou a potencialização da atividade antimicrobacteriana de um sal de piridina quando complexado ao Fe (III) passando de 7,20 µM para 1,07 µM, e inclusive inibindo cepas clínicas de TB-MDR e XDR (CAMPOS et al., 2020).

Exibindo uma combinação de ótimas propriedades estruturais e químicas, ligantes como a fenantrolina (fen) e a bipyridina (bipi) tem sido extensivamente estudados por serem quimicamente versáteis. Diversas aplicações terapêuticas foram obtidas através do emprego destes tipos de ligantes em combinação com diferentes metais de transição (GAO et al., 2016). A 1,10-fenantrolina (1,10-fen), a 2,2'-bipyridina (2,2'-bipi) e seus derivados, tanto em coordenação com metais como no seu estado livre, desestruturam o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos (MCCANN et al., 2004).

A molécula de 1,10-fen (Figura 3), amplamente utilizada como um ligante em química analítica e de coordenação (IDRISS et al., 1980; KOCH; ACKERMANN, 1992; LORENZO et al., 1998), é planar, rígida, hidrofóbica e heterocíclica e seus átomos de nitrogênio possuem propriedades favoráveis à ligação de cátions. Essas características estruturais determinam sua capacidade de coordenação em relação a íons metálicos (BENCINI; LIPPOLIS, 2010).

Figura 3. Estrutura química da 1,10-fenantrolina.



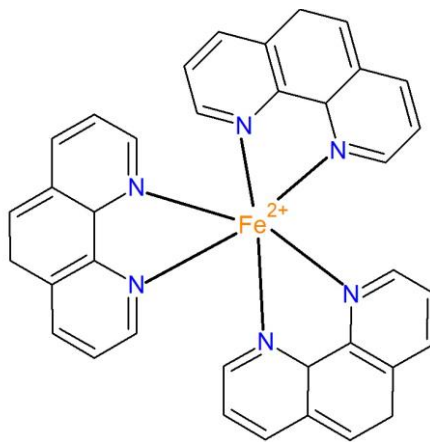
Fonte: autora

Complexos de fen com íons metálicos foram apontados como bactericidas para diferentes gêneros de bactérias e alguns fungos (MCCANN et al., 2004). Em estudos

prévios realizados pelo Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da UNESP, a atividade anti-*M. tuberculosis* de diferentes complexos metálicos foi investigada, em especial, complexos de rutênio (II) e fen, que demonstraram atividade promissora contra o *M. tuberculosis in vitro*, sendo observado nesses casos que o complexo como um todo mostrou-se diversas vezes mais ativo que seus ligantes livres (PAVAN et al., 2010, 2011).

A formação do complexo metálico tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ mostrado na figura 4, se dá pela complexação do íon de ferro (II) com moléculas de 1-10-fenantrolina. Sua esfera de coordenação é comprovada por estudo de cristalografia (UÇAR et al., 2005). O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ tem sido amplamente utilizado como precursor de outras reações químicas já que exibe grande potencial redox. Em relação a sua atividade biológica descrita em literatura, existem relatos de atividade antifúngica (BOTTEGA et al., 2016).

Figura 4. Estrutura química de tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$.



Fonte: autora

1.3 Nanotecnologia Farmacêutica e os Sistema Lipídicos

Nanoestruturados

A nanotecnologia pode ser definida como a utilização da tecnologia em moléculas ou estruturas de escala nanométricas para aplicações práticas. O conceito dessa tecnologia foi introduzido em 1959 pelo físico Richard Feynman que descreveu sua ideia de utilizar as máquinas disponíveis para construir máquinas cada vez menores

até a nível molecular (FEYNMAN, 1992). A nanotecnologia é elencada como uma das tecnologias mais promissoras do século 21 (BAYDA et al., 2020).

Abrangendo várias áreas do conhecimento, a nanotecnologia, é uma ciência multidisciplinar que depende da comunhão do conhecimento de áreas como a física, química, biologia e engenharia para sua eficiência (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). A nanobiotecnologia, surgiu da integração de conhecimentos da biologia, engenharia e da nanociência, e é utilizada para o desenvolvimento de instrumentos e aplicações em sistemas biológicos como diagnósticos, entrega de fármacos (*drug delivery*) e imageamento molecular (KHAN et al., 2015). Essa sub-área do conhecimento tem se intensificado e mostrado excelentes resultados (WEISSIG; PETTINGER; MURDOCK, 2014).

A utilização de nanoestruturas como veículo de moléculas bioativas, vetorização e carregamento de fármacos representa um dos principais objetos de interesse da nanobiotecnologia e da nanotecnologia farmacêutica, e é considerada uma ótima alternativa para contornar propriedades indesejadas de fármacos ou substâncias candidatas, por vezes permitindo o aprimoramento dos mesmos para que possam ser lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES et al., 2006).

Dentro das sub-área destacada os sistemas nanoestruturados apresentam partículas com dimensões que variam de 10 a 1000 nm, realizando o carreamento de ativos ou fármacos (FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015). Dentre os sistemas nanoestruturados estão os sistemas lipídicos nanoestruturados, que possuem em sua composição lipídios estabilizados por agentes tensoativos. São biocompatíveis e biodegradáveis apresentando estruturas altamente organizadas (OCHEKPE; OLORUNFEMI; NGWULUKA, 2009).

Estes sistemas possuem elevada estabilidade, melhoria da biodisponibilidade do fármaco, e também, podem incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas (PENTENERO, 2017). Além disso, possuem a capacidade de poupar tecidos e células saudáveis, direcionando a molécula ativa ao alvo terapêutico, ofertando a proteção do fármaco contra degradação prematura gerada pelas particularidades inerentes as diferentes vias de administração, e possibilitando a redução nas frequências de dosagem (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). Todas essas características podem proporcionar uma melhora na qualidade de vida do paciente e contribuem para a resolução de um importante obstáculo no controle da epidemia de TB que é a baixa adesão ao tratamento (NASIRUDDIN; NEYAZ; DAS, 2017).

Diferentes tipos de sistemas nanocarreadores são promissores para várias vias de administração, abrangendo a administração oral, ocular, parenteral, transdérmica, vaginal e retal (GUPTA; MOULIK, 2008)

A via de administração mais conveniente e amplamente utilizada é a via oral devido à facilidade e aceitação dessa via por parte dos pacientes. No entanto, muitos fármacos possuem baixa dissolução no trato gastrointestinal fator que pode levar a uma redução da biodisponibilidade do mesmo. As ações das enzimas e as variações de pH no trato gastrointestinal também podem afetar o fármaco e sua biodisponibilidade (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019).

Os sistemas do tipo microemulsionado consistem na combinação de dois líquidos imiscíveis, comumente óleo e água, que são estabilizados por tensoativos formando um filme interfacial entre os dois (ABOOFAZELI; LAWRENCE, 1993; CONSTANTINIDES et al., 1994). São sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos com partículas de escala nanométrica que possuem a capacidade de solubilização e proteção dos ativos, melhorando potencialmente a biodisponibilidade oral destes (TENJARLA, 1999).

Os sistemas baseados em nanotecnologia mostraram resultados promissores no tratamento de doenças infecciosas, inclusive TB. O sistema lipídico nanosetruado (SLN) do tipo microemulsionado utilizado neste trabalho foi desenvolvido e caracterizado em estudos anteriores, com a incorporação de complexos contendo N-óxido e complexos metálicos de rutênio e de cobre, onde resultados promissores foram encontrados no âmbito de atividade contra *M. tuberculosis*, diminuição de citotoxicidade dos complexos e aumento da biodisponibilidade dos mesmos. (DA SILVA et al., 2016, 2018; DE FREITAS et al., 2014; DOS SANTOS FERNANDES et al., 2017).

Além disso, este mesmo sistema foi utilizado em estudo prévio realizado por Solcia et al., em projeto de mestrado realizado no nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Pesquisa em tuberculose da UNESP, onde o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ mostrou-se como um promissor candidato a fármaco para o tratamento de TB, apresentando eficaz atividade contra micobactérias e quando foi incorporado ao sistema demonstrou estar biodisponível nos plasmas dos animais tratados por via oral após 2h da aplicação e apresentou pico máximo na concentração plasmática em 6h (SOLCIA et al., 2021).

Dos resultados promissores deste último trabalho citado, surgiu a necessidade de estudos mais detalhados sobre o sistema formado com a incorporação do complexo

de ferro ao sistema lipídico em questão (SLN+[Fe(fen)₃]²⁺), na intenção de que este possa ser aplicado de forma oral na terapia, atendendo à necessidade de adesão do paciente no tratamento da tuberculose (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016b).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo avaliar o complexo tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) quando incorporado ao sistema lipídico nanoestruturado e os possíveis efeitos do complexo de ferro frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar a frequência de resistência da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* em relação ao complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$;
- Avaliar o espectro de ação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a outras espécies bacterianas
- Obter o sistema lipídico nanoestruturado (SLN) e incorporar o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ao mesmo;
- Caracterizar o sistema formado via dispersão de luz dinâmica e Potencial Zeta;
- Avaliar a morfologia do sistema formado utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão
- Avaliar a eficiência de encapsulação do sistema lipídico nanoestruturado;
- Avaliar o complexo incorporado ao sistema SLN+ $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

3. REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; LAWRENCE, M. J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 93, n. 1–3, p. 161–175, Maio 1993.
- BARBERIS, I. et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9–E12, Mar. 2017.
- BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.
- BENCINI, A.; LIPPOLIS, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17–18, p. 2096–2180, Set. 2010.
- BOTTEGA, F.C.; OLIVEIRA, M.R.L.; RUBINGER, M.M.M.; BELLATO, C.R.; ARDISSON, J.D.; ZAMBOLIM, L. Sais de tetrafenilfosfônio e *tris*(1,10-fenantrolina)ferro(II) de complexos aniônicos de dibutilenstanho(IV) com ditiocarbimatos: síntese, caracterização e atividade antifúngica. **Química Nova**. v. 39, n. 5, p. 554-560, 2016.
- BHARTI, S. K.; SINGH, S. K. Metal Based Drugs : Current Use and Future Potential. **Der Pharmacia Lettre**, v. 1, p. 39–51, Jan. 2009.
- CAMPOS, D. L. et al. Bactericidal effect of pyridine-2-thiol 1-oxide sodium salt and its complex with iron against resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 2, p. 120–124, 2020.
- CONSTANTINIDES, P. P. et al. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 10, p. 1385–1390, Out. 1994.
- COUTO, D. S. DE et al. Fatores determinantes para o abandono do tratamento da tuberculose: representações dos usuários de um hospital público. **Saúde em Debate**, v. 38, n. 102, p. 572–581, 2014.
- CRISAN-DABIJA, R. et al. Tuberculosis and COVID-19 in 2020: lessons from the past viral outbreaks and possible future outcomes. **Canadian Respiratory Journal**, 1401053, Set. 2020.
- DA SILVA, P. B. et al. In vitro activity of copper(II) complexes, loaded or unloaded into a nanostructured lipid system, against mycobacterium tuberculosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.
- DA SILVA, P. B. et al. A nanostructured lipid system to improve the oral bioavailability of Ruthenium(II) complexes for the treatment of infections caused by Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, Dez. 2018.
- DE FREITAS, E. S. et al. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in Vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5999–6008, 2014.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F. et al. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 20 Jun. 2012.

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom [data storage]. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 1, n. 1, p. 60–66, 1992.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4981–5003, 2015.

GAO, E. et al. Synthesis, structures, molecular docking, cytotoxicity and bioimaging studies of two novel Zn(II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 1–11, 2016.

GUPTA, S.; MOULIK, S. P. Biocompatible Microemulsions and Their Prospective Uses in Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p. 22–45, Jan. 2008.

HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H.-J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 129, 19 Mar. 2019.

HOTTINGER, D. G. et al. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 462–471, Oct. 2014.

IDRISS, K. A. et al. Spectral properties and analytical application of the ternary complex of lanthanum(III) with 1,10-phenanthroline and eosin. **Analytica Chimica Acta**, v. 116, n. 2, p. 413–416, 1980.

KHAN, I. et al. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 396–400, Dec. 2015.

KOCH, S.; ACKERMANN, G. Application of redox reactions in spectrophotometry—The iron(III)/1,10-phenanthroline complex as a reagent for the determination of some anions and organic compounds. **Talanta**, v. 39, n. 6, p. 687–691, 1992.

LORENZO, E. et al. Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 3, p. 319–332, 1998.

MAHAJAN, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. **International Journal of Applied & Basic Medical Research**, v. 3, n. 1, p. 1–2, Jan. 2013.

MAINARDES, R. M. et al. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, 2006.

MCCANN, M. et al. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phenedio)₂][ClO₄]

(phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **BioMetals**, v. 17, n. 6, p. 635–645, Nov. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**, 2017.

NASIRUDDIN, M.; NEYAZ, M. K.; DAS, S. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. **Tuberculosis Research and Treatment**, 4920209, 2017.

OCHEKPE, N. A.; OLORUNFEMI, P. O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and drug delivery part 1: Background and applications. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 265–274, 2009.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

PAVAN, F. R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-Myco bacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, May 2010.

PAVAN, F. R. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011.

PENTENERO, M. Nanotechnology: a novel adjunctive aid to fight cancer. **Oral Diseases**, v. 23, n. 3, p. 273–275, Apr. 2017.

RABAHI, M. F. et al. Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 5, p. 472–486, 2017.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, Jan. 2007.

RYAN, N. J.; LO, J. H. Delamanid: First Global Approval. **Drugs**, v. 74, n. 9, p. 1041–1045, 2014.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, Apr. 2014.

SHETYE, G. S.; FRANZBLAU, S. G.; CHO, S. New tuberculosis drug targets, their inhibitors, and potential therapeutic impact. **Translational Research**, v. 220, p. 68–97, 2020.

SILVA, D. R. et al. Tuberculosis and COVID-19, the new cursed duet: What differs between Brazil and Europe? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 2, p. 1–8, 2021.

SILVA, P. DA F. et al. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 8, p. 1745–1754, 2014.

SOLCIA, M. C. et al. Growth-inhibitory effects of tris-(1,10-phenanthroline) iron (II) against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. **Tuberculosis**, v. 128, n. April, p. 1–8, 2021.

TARALLO, M. B. et al. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 11, p. 1164–1170, 2010.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, n. 5, p. 461–521, 1999.

UÇAR, I. et al. Tris(1,10-phenanthroline-k2N,N')iron(II) squarate octahydrate. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 61, n. 7, p. 1405–1407, 2005.

VAN DER MEEREN, O. et al. Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01E Vaccine to Prevent Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 17, p. 1621–1634, 25 Set. 2018.

VASAVA, M. S. et al. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 252–275, 2017.

VISCA, D. et al. Tuberculosis and COVID-19 interaction: A review of biological, clinical and public health effects. **Pulmonology**, v. 27, n. 2, p. 151–165, 2021.

WADA, O. What are Trace Elements ? — Their deficiency and excess states. **Japan Medical Association Journal**, v. 47, n. 5, p. 351, 2004.

WARD, S. K.; HOYE, E. A.; TALAAT, A. M. The global responses of Mycobacterium tuberculosis to physiological levels of copper. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2939–2946, 2008.

WEISSIG, V.; PETTINGER, T. K.; MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 4357–4373, 2014.

WELLINGTON, S.; HUNG, D. T. The Expanding Diversity of Mycobacterium tuberculosis Drug Targets. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, p. 696–714, 11 Maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report** World Health Organization. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Paradigm Shift - Global Plan to End TB** World Health Organization. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **WHO report on TB 2020**. [s.l: s.n.]. v. 1

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **WHO report on TB 2020**. [s.l: s.n.]. v. 1

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis**. [s.l: s.n.].

YANG, H.; LU, S. COVID-19 and tuberculosis. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 8, n. 2, p. 59–65, 2020.

ZHANG, Y.; SEN, S.; GIEDROC, D. Iron Acquisition by Bacterial Pathogens: Beyond tris-Catecholate Complexes. **ChemBioChem**, Mar. 2020.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 388, 2013.