



FURG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO LIPÍDICA
CONTENDO RIFAMPICINA E QUERCETINA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE AO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

FRANK DO CARMO GUEDES JÚNIOR

Rio Grande, 2023

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO LIPÍDICA
CONTENDO RIFAMPICINA E QUERCETINA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE AO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

FRANK DO CARMO GUEDES JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiana Lima Dora

Rio Grande, 2023

FRANK DO CARMO GUEDES JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO LIPÍDICA
CONTENDO RIFAMPICINA E QUERCETINA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE AO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Banca examinadora:

Profª Drª Daniela Fernandes Ramos – FURG

Drª Gabriela Hädrich – Externo

Profª Drª Anna Siebel (Suplente) – FURG

Profª Drª Cristiana Lima Dora – FURG

Rio Grande, 2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Frank e Josélia,
meus primeiros e mais importantes
professores.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Universidade do Rio Grande pela oportunidade de estudo.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela convivência, troca de experiências e ensinamentos que contribuíram com meu desenvolvimento pessoal e aperfeiçoamento profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristiana Lima Dora, pelo seu profissionalismo, dedicação, paciência, companheirismo, otimismo e acima de tudo por aceitar me orientar e confiar no meu trabalho, mesmo apesar de todas as dificuldades.

Ao meu amigo, coorientador e colega de trabalho Gustavo Richter Vaz, pela prestatividade, paciência, inteligência e companheirismo desde os primeiros passos até a finalização deste trabalho, sem os quais este jamais teria sido possível.

À minha colega de laboratório, Virginia Yurgel, por todo auxílio teórico e prático, pela paciência e prestatividade durante toda a concepção deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Jamile Rodrigues, José Ricardo, Rodolfo Baptista e, em especial, à Daniela Vaiss, pelo auxílio e motivação durante os intermináveis dias de experimentação, pelo coleguismo durante as aulas e eventos do curso, pela amizade durante os momentos de dificuldade e pela parceria durante todo o período de mestrado.

Aos alunos de iniciação científica Paula Barros, Lauanda Larissa e em especial a Gabriela Alves, por todo o auxílio, dedicação e companheirismo durante as várias etapas de execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos e Dra. Gabriela Hädrich pelas inestimáveis contribuições e mentorias que, tanto na teoria quanto na prática tornaram este trabalho possível.

Aos colegas do CEME-Sul, Carol e Rudimar por todo o apoio durante o período do mestrado e pelos momentos de descontração que ajudaram a tornar nossas rotinas mais leves.

Aos colegas que fiz durante minha trajetória pela empresa Raia Drogasil, em especial aos meus amigos Jean e Eldilaine pelo companheirismo e acolhimento durante todo o meu período na empresa, e ao meu ex-gerente Magdiel Serafim

Santos, pela sua compreensão, liderança e profissionalismo, por ter confiado em mim e por permitir que realizasse minha pesquisa e tarefas do mestrado mesmo durante os períodos de trabalho, sua contribuição foi fundamental para que este trabalho tenha se tornado exequível.

Aos meus colegas de trabalho no Hospital Universitário Miguel Riet Corrêa Jr., pela amizade e companheirismo e em especial a minha chefe de setor, Gisele Senhorin, pela compreensão e cooperação que auxiliaram diretamente na execução deste trabalho.

As minhas irmãs, Sophia e Mariana, pelo carinho, parceria e dedicação e por estarem sempre comigo, durante os momentos bons ou ruins.

A minha namorada e companheira de todas as horas, Beatriz Cardoso, por todo o amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo, estando comigo em todos os momentos, principalmente os mais difíceis. Obrigado por acreditar em mim mesmo quando eu achei que não fosse possível.

Ao meu pai Frank Guedes e a minha mãe Josélia Cavalcante, meus maiores exemplos de pessoas e profissionais, pelo profundo amor e dedicação, nada disso teria sido possível sem o seu apoio.

E, por fim, a todos os amigos, mentores, colegas e familiares que durante estes dois anos caminharam ao meu lado, seja de perto ou de longe, participando direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, foi somente graças ao seu suporte que pude chegar até aqui.

The only thing we have to fear is fear itself.

Franklin D. Roosevelt

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. O <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.2. Patogenia e transmissão.....	17
2.3. Tratamento.....	20
2.3.1. Tratamento da tuberculose resistente.....	22
2.3.2. Fatores relacionados à falha terapêutica.....	25
2.3.3. Novas alternativas para o tratamento da tuberculose.....	26
2.4. Nanocarreadores de fármacos.....	28
2.4.1. Tipos de nanocarreadores lipídicos	29
2.5. Utilização de rifampicina e quercetina em nanocarreadores	32
3. Objetivos.....	35
3.1. Objetivos gerais.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. Referências bibliográficas.....	36
Artigo. Preparo e caracterização de uma nanoemulsão lipídica contendo rifampicina e quercetina e avaliação da sua atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> frente ao <i>mycobacterium tuberculosis</i>	46
1. Introdução.....	49
2. Materiais.....	50
3. Metodologia.....	50
3.1. Preparo das nanoemulsões contendo rifampicina e quercetina.....	50
3.2. Caracterização físico-química das nanoemulsões.....	51
3.2.1. Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão.....	51
3.2.1. Determinação do potencial zeta.....	51
3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação da rifampicina e quercetina	51
3.3.1. Análise por espectrofotometria UV/Vis.....	51
3.3.2. Validação do método analítico por espectrofotometria UV/Vis.....	51

3.3.2.1. Especificidade.....	52
3.3.2.2. Linearidade.....	52
3.3.2.3. Limite de detecção e quantificação.....	52
3.3.2.4. Precisão.....	53
3.3.2.5. Exatidão.....	53
3.3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação da rifampicina e quercetina.....	54
3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanocarreadores em cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
3.4.1. Cultivo das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
3.4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanocarreadores frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pelo método REMA (Resazurin microtiter assay)...	54
4. Resultados.....	55
4.1. Validação do método analítico por espectrofotometria UV/Vis.....	55
4.1.1. Especificidade.....	55
4.1.2. Linearidade.....	56
4.1.3. Precisão.....	56
4.1.4. Exatidão.....	57
4.2. Caracterização, teor e taxa de recuperação das nanoemulsões contendo rifampicina e quercetina.....	57
3.2. Atividade antimicrobiana.....	58
5. Discussão.....	58
6. Conclusões.....	62
7. Referências bibliográficas.....	63
8. Perspectivas.....	66

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa que constitui um grave problema de saúde global. A terapia convencional vigente possui diversas limitações, dentre elas baixa aderência, elevada toxicidade e altos níveis de resistência bacteriana. Formulações farmacêuticas utilizando nanocarreadores lipídicos são uma forma promissora de resolver tais problemas por trazerem matrizes biocompatíveis que permitem a utilização de um ou mais compostos com atividade antimicrobiana conhecida em uma formulação líquida, aumentando sua biodisponibilidade e eficácia e diminuindo efeitos adversos. Dessa forma, o objetivo deste projeto é desenvolver e caracterizar nanoemulsões lipídicas contendo rifampicina (RIF) e quercetina (QU) e avaliar sua atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de difusão do solvente a quente associado a temperatura de inversão de fases. Foram realizadas a caracterização físico-química e morfológica dos sistemas, avaliados o teor e taxa de recuperação dos ativos encapsulados e avaliada sua atividade antimicrobiana *in vitro*. Foram obtidas nanoemulsões com tamanho médio de 24nm, índice de polidispersão de 24% e potencial zeta médio de -26mV. O método de doseamento desenvolvido demonstrou ser preciso, exato, linear e sensível para detecção e quantificação de RIF e QU. O teor médio de RIF nas nanoemulsões foi de aproximadamente 680 µg/mL e de aproximadamente 655 µg/mL para QU, com uma taxa de recuperação média de aproximadamente 91% para RIF e 87% para QU. Em relação a atividade antimicrobiana, as nanoemulsões contendo RIF e QU apresentaram uma concentração inibitória mínima $\leq 0,09$ µg/mL na cepa sensível de *M. tuberculosis*, mesma concentração obtida para RIF livre. Estes resultados apontam que as nanoemulsões produzidas demonstraram características físico-químicas adequadas, alto teor de encapsulação e que a atividade antimicrobiana da RIF foi mantida após o encapsulamento. Desta forma, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica líquida combinando dois ativos lipofílicos para o tratamento da tuberculose facilitaria a adesão do paciente, aumentando as chances de cura e evitando o desenvolvimento de resistência ao esquema terapêutico proposto.

Palavras-chave: tuberculose, *mycobacterium tuberculosis*, nanoemulsão, rifampicina, quercetina.

ODS contemplados: 3 - Saúde e bem-estar; 9 - Indústria, inovação e infraestrutura.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that constitutes a serious global health problem. Current conventional therapy has several limitations, including low adherence, high toxicity and high levels of bacterial resistance. Pharmaceutical formulations using lipid nanocarriers are a promising way to solve such problems by bringing biocompatible matrices that allow the utilization of one or more compounds with known antimicrobial activity in a liquid formulation increasing their bioavailability, efficacy and reducing adverse effects. Thus, this project aims to develop and characterize lipid nanoemulsions containing rifampicin (RIF) and quercetin (QU) and to evaluate their antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nanoemulsions were prepared by the hot solvent diffusion associated with phase inversion temperature technique. Physicochemical and morphological characterization of the systems, content, and recovery rate of the encapsulated actives and nanoemulsions in vitro antimicrobial activity was assessed. Nanoemulsions with an average size of 24nm, polydispersion index of 24%, and an average zeta potential of -26mV were obtained. The developed method proved to be precise, accurate, linear, and sensitive for the detection and quantification of RIF and QU. The average RIF content in nanoemulsions was nearly 680 µg/mL and nearly 655 µg/mL stands for QU content, with an average recovery rate of nearly 91% for RIF and 87% for QU. Regarding antimicrobial activity, nanoemulsions containing RIF and QU showed a minimum inhibitory concentration ≤ 0.09 µg/mL in the susceptible strain of *M. tuberculosis*, same concentration obtained for free RIF. These results suggests that the produced nanoemulsions showed adequate physicochemical characteristics, high encapsulation content, and antimicrobial activity maintained by the encapsulated RIF. Thus, a liquid pharmaceutical form combining two lipophilic actives for the treatment of tuberculosis would facilitate patient compliance, increasing the chances of cure and preventing resistance to the proposed therapeutic scheme.

Keywords: tuberculosis, *mycobacterium tuberculosis*, nanoemulsion, rifampicin, quercetin.

Contemplated ODS: 3 – Health and well-being; 9 – Industry, innovation, and infrastructure.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos antituberculose e os principais gene envolvidos na sua resistência.....	23
Tabela 2: Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas de entrega no melhoramento da biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos.....	31
Artigo: Preparo e caracterização de nanoemulsões lipídicas contendo rifampicina e quercetina para o tratamento da tuberculose pediátrica	
Tabela 1: Especificidade do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.....	55
Tabela 2: Linearidade do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis...	56
Tabela 3: Precisão do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.....	56
Tabela 4: Exatidão do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.....	57
Tabela 5: Concentração inibitória mínima de NEs contendo RIF e QU, NE-Br e RIF e QU livres.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLN – Carreador lipídico nanoestruturado
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DOTS – Tratamento diretamente observado
- DPP – Derivado proteico purificado
- ETB – Etambutol
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- INH – Isoniazida
- ITBL – Infecção por tuberculose latente
- MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- NE – Nanoemulsão
- NSL – nanopartícula sólida lipídica
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAS – Ácido para-aminossalicílico
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PDI – Índice de polidispersão
- PRZ – Pirazinamida
- QU – Quercetina
- RHZE – Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
- RIF – Rifampicina
- SNC – Sistema nervoso central
- Tb – Tuberculose
- Tb-MDR – Tuberculose multidroga resistente
- Tb-XDR – Tuberculose extensivamente resistente a drogas
- TGI – Trato gastrointestinal
- TIF – Temperatura de inversão de fases
- TPT – Teste de pele de tuberculina

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (Tb) é a segunda doença infectocontagiosa causada por um único agente infeccioso que mais mata em todo o mundo, tendo sido superada apenas pela COVID-19 em 2020. Aproximadamente 10,6 milhões de novos casos de Tb foram detectados em 2021, com 1,6 milhões de mortes, dentre as quais 187.000 foram entre pacientes HIV-positivos. Neste cenário, apenas 161.476 pessoas com tuberculose multidroga resistente (Tb-MDR), caracterizada pela resistência concomitante a rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), fármacos considerados carro-chefe para o tratamento da Tb, tiveram acesso a um tratamento alternativo eficaz (WHO, 2022).

Novos casos de Tb devem ser tratados sob um regime inicial de 6 meses utilizando o regime RHZE, composto pelos fármacos RIF, INH, pirazinamida (PRZ) e etambutol (ETB) pelos primeiros 2 meses, seguidos de 4 meses de manutenção utilizando RIF e INH. Ainda que este tratamento de primeira linha seja capaz de produzir taxas de cura acima de 85% em cepas sensíveis, fatores como sua duração, elevada toxicidade e falha de adesão são reconhecidos como os principais responsáveis pela mitigação do sucesso terapêutico, além de estarem atrelados ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos, tornando-se grandes desafios para as estratégias de alcance das metas de fim da Tb traçadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ERNEST et al, 2021; WHO, 2022).

Outro fator intrinsecamente associado a resistência aos fármacos pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é a atividade de proteínas transmembrana comumente chamadas de bombas de efluxo. A superexpressão dessas bombas de efluxo está associada a concentrações subinibitórias de fármacos como RIF, INH e ETB, permitindo o MTB sobreviver na presença de antibióticos até a aquisição de mutações em genes de alvos terapêuticos, desencadeando uma cascata de alterações que conferem alto grau de resistência a vários dos antibióticos utilizados atualmente (RODRIGUES et al, 2020).

A quercetina (QU) é um flavonoide versátil de origem natural cuja atividade antimicrobiana é amplamente citada na literatura, como, por exemplo, em estudos de *docking* molecular que sugerem a interação da QU com a DNA girase e com as bombas de efluxo presentes no MTB (SURIYANARAYANAN et al, 2013; SURIYANARAYANAN et al, 2014), além de estudos *in vitro* que demonstraram que a

QU pode inibir o crescimento do MTB através da inibição da síntese de ácidos graxos e ácidos micólicos presentes na membrana celular do microrganismo (SASIKUMAR et al., 2018; BROWN et al., 2007).

A RIF, por outro lado, é um antibiótico de amplo espectro utilizado para o tratamento da Tb desde a década de 60, época em que foi inicialmente recomendada para pacientes com Tb pulmonar crônica refratária à terapia (GROBBELAAR et al., 2019). A utilização da RIF como fármaco antimicrobiano em conjunto com a QU como potencial inibidor das bombas de efluxo no MTB ainda possui um vasto potencial a ser explorado.

Além da combinação de compostos com atividade anti-Tb comprovada, o desenvolvimento de novas tecnologias em formulações farmacêuticas é uma das formas de contornar diversos problemas relacionados à terapia. Neste contexto, formulações utilizando nanoemulsões lipídicas vêm ganhando importância devido a sua capacidade em potencial de entrega de fármacos em sítios específicos de ação e melhoramento das características físico-químicas dos compostos carregados, além de apresentarem-se como uma forma farmacêutica líquida, sendo mais amigável para uso oral (HADRICH et al., 2020).

As diferentes estratégias envolvendo nanocarreadores para entrega de medicamentos objetivam não somente aumentar seu índice terapêutico através do endereçamento da sua atividade farmacológica para o sítio de ação desejado, como também diminuir sua toxicidade, aumentar sua biodisponibilidade e permitir o desenvolvimento de formulações líquidas contendo fármacos hidrofóbicos, como é o caso da RIF e da QU (SHEGOKAR; AL SHAAL; MITRI, 2011).

Dessa forma, este trabalho tem o intuito de desenvolver formulações farmacêuticas líquidas baseadas em nanocarreadores lipídicos contendo RIF e QU uma vez que este campo de estudo demonstra ser promissor para pesquisa e elaboração de esquemas terapêuticos para o tratamento da Tb convencional e resistente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O *Mycobacterium tuberculosis*

O sequenciamento genômico do MTB permite remontar sua origem a tempos remotos. Estima-se que seu ancestral primitivo esteve presente no leste africano há aproximadamente 3 milhões de anos atrás, sendo as cepas modernas de MTB originadas de um ancestral em comum datado entre 20.000 e 15.000 anos atrás também de origem africana, enquanto boa parte das cepas presentes atualmente tenham tido origem entre 250 e 1000 anos atrás (DANIEL, 2006).

Sendo hoje reconhecidamente uma das doenças infecciosas que mais matou em toda a história, a natureza infecciosa da Tb foi primeiramente sugerida apenas em 1790, quando Jean-Antoine Villemin inoculou um coelho com uma “pequena quantidade de secreção purulenta de uma cavidade tuberculosa” proveniente da autópsia um indivíduo morto por tuberculose, tendo como resultado da autópsia do animal sacrificado 3 meses depois uma extensiva infecção por tuberculose (MAJOR, 1945).

A história da Tb mudou drasticamente quando Hermann Heinrich Robert Koch fez sua tal qual famosa apresentação *Die aetiologie der tuberculose* a sociedade médica de Berlim, na qual Koch não apenas demonstrou a etiologia do agente infeccioso como também estabeleceu seus famosos postulados, também conhecidos como os postulados de Koch-Henle, que até hoje servem como padrão demonstrativo de infecção da doença, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1905 pela elucidação da etiologia da tuberculose (KOCH, 1932).

A Tb humana é causada principalmente por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), um grupo de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) com 99% das suas sequências de nucleotídeos semelhantes entre si (GAGNEUX, 2018). O MTB diferencia-se das demais micobactérias pela sua proficiência como um patógeno estritamente humano, ou seja, não possui hospedeiro animal ou ambiental intermediário, além disso, as bactérias pertencentes ao MTBC são apenas transmitidas através de infecção ativa, diferenciando-se de outros patógenos nos quais sua virulência não está necessariamente relacionada a via de transmissão (GAGNEUX, 2018).

O MTBC possui várias características morfológicas distintas em relação a outras bactérias, como por exemplo a presença de diversos lipídios únicos na sua parede celular, dentre os quais cabe destacar o ácido micólico, este que dá origem ao nome do gênero. Assim sendo, o MTBC exclui-se da grande divisão morfológica baseada na coloração de gram, não sendo considerado nem gram-positivo nem gram-negativo devido a fraca afinidade que o corante tem com a parede celular destas bactérias (TORTOLI, 2003).

O alto teor lipídico na parede celular do MTB confere ainda ao microrganismo características como alto teor de virulência, resistência a uma ampla gama de antibióticos e capacidade de sobreviver em condições extremas, como excesso de acidez ou alcalinidade, baixa disponibilidade de oxigênio e consequentemente a capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos, mesmo este sendo um ambiente altamente inóspito para qualquer agente invasor (GROENEWALD et al, 2014).

2.2. Patogenia e transmissão

O MTB parece ter evoluído de um ancestral em comum do *M. canetti* até tornar-se um patógeno humano obrigatório. Diferente de outros patógenos humanos onde a transmissão não está necessariamente relacionada a virulência, o MTB adaptado aos humanos deve causar doença pulmonar para ser transmissível entre indivíduos, sendo a Tb uma consequência da resposta imunológica do hospedeiro a uma carga antigênica, a qual leva a destruição do tecido pulmonar e formação de cavidades que aumentam substancialmente a transmissão do patógeno em potencial (GAGNEUX, 2018).

A infecção por MTB se inicia quando o bacilo chega ao pulmão através da inalação de gotículas em aerossol expelidas por indivíduos com Tb pulmonar ativa, podendo se dar através da tosse ou espirro, por exemplo. Uma vez no espaço alveolar, o MTB é internalizado via fagocitose pelos macrófagos alveolares, sendo os Receptores de Reconhecimento de Padrões nas células do hospedeiro os responsáveis pelo reconhecimento dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos presentes na superfície do bacilo, assim induzindo a secreção de citocinas e quimiocinas que levam ao recrutamento de células fagocíticas adicionais (neutrófilos,

macrófagos intersticiais e células dendríticas, por exemplo) ao local da infecção (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Após a fagocitose, estima-se que entre 20 e 25% dos casos o macrófago pode conter a infecção por si só, eliminando completamente o patógeno. No entanto, na maioria dos casos, o MTB é capaz de escapar desse mecanismo de eliminação do hospedeiro. A permanência do MTB no interior do fagossomo se dá através da atividade do seu sistema secretor chamado ESX-1, capaz de liberar proteínas e outras moléculas no fagossomo, levando a uma ruptura da membrana fagossomal com uma consequente liberação de componentes da micobactéria no interior do citosol do macrófago. Dessa forma, o MTB é capaz de impedir a maturação fagossomal através da prevenção da fusão lisossomal, transformando o previamente hostil ambiente em algo mais compatível com a sua sobrevivência, permitindo sua replicação no interior do próprio macrófago (CIRILLO & KONG, 2019).

Já infectadas pelos bacilos, as células de defesa do sistema respiratório migram para os linfonodos pulmonares, onde elas processam e apresentam os antígenos para preparação dos linfócitos T CD4+ e CD8+. Como consequência, após 15 a 18 dias de infecção a resposta imune adaptativa produz células T preparadas, as quais migram para o sítio de infecção atraídas pelas quimiocinas produzidas pelas células infectadas. A partir daí desenvolvem-se três possíveis cenários: 1) o patógeno pode ser eliminado pela resposta imune do hospedeiro, 2) a doença pode progredir para sua forma ativa, o que vai acontecer principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, ou 3) o bacilo pode persistir em estruturas chamadas granulomas, sendo estes patologicamente a marca registrada da Tb (**Figura 1**) (BARANYAI et al., 2021).

Um granuloma nada mais é que um agregado bem-organizado de células imunes respondendo a um estímulo persistente. Os granulomas são estruturas esféricas com os macrófagos infectados no meio, cercados de neutrófilos, células dendríticas, células *natural killers* (NK), linfócitos B e T, fibroblastos e outros componentes da matriz extracelular. A função principal do granuloma é localizar e confinar a infecção enquanto restringe a resposta imune a uma certa área. Nesta estrutura os bacilos são expostos a uma variedade de condições de estresse, tais como hipóxia, pH ácido, baixa disponibilidade de ferro e privação de nutrientes (RAMAKRISHNAN, 2012).

Como forma de sobreviver a um ambiente tão adverso, o MTB desenvolveu mecanismos de manter-se viável com replicação limitada ou nula. Tal estado, chamado dormência, caracteriza-se por uma baixa taxa metabólica e mudança estrutural na arquitetura da parede celular do bacilo, o que leva fenotipicamente a resistência a antibióticos que utilizam como alvo funções relacionadas ao crescimento. O equilíbrio entre a defesa imune do hospedeiro e a dormência bacteriana pode levar a um estado de controle da infecção nos granulomas, chamado de infecção por tuberculose latente (ITBL) (VICHÈZE & CREMER, 2017; BALABAN et al., 2019).

A ITBL é uma infecção controlada e assintomática que ocorre em 65 a 75% dos casos, podendo durar por anos ou até mesmo uma vida inteira. Durante essa fase, granulomas sólidos prevalecem, os quais são normalmente cercados por uma parede fibrótica que os separa do tecido adjacente (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012). No entanto, devido a um desbalanceamento do sistema imune a bactéria dormente pode voltar a reativar-se levando a uma necrose dos macrófagos infectados, o que leva a formação de uma zona necrótica no centro dos granulomas, conhecida como lesão caseosa (devido a sua aparência leitosa) a qual contém MTB liberado dos macrófagos necrosados, formando assim o granuloma necrótico caseoso (**Figura 1**), outra marca registrada da Tb pulmonar (BARANYAI et al., 2021).

O granuloma necrótico está associado a uma redução na vascularização devido a lesão (hipóxia) e alto conteúdo lipídico, como resultado da morte de macrófagos espumosos. A consequente perda da integridade do granuloma leva a entrada de oxigênio e nutrientes vasculares necessários para o crescimento da bactéria, seguindo com o seu colapso que leva a liberação do bacilo no interior dos capilares sanguíneos e espaço alveolar, permitindo que o MTB se dissemine a outras partes do pulmão e também para outros órgãos (tuberculose extrapulmonar), levando novamente a forma ativa da doença com a presença de sintomas clínicos e a possibilidade de transmissão a outros indivíduos (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012; CIRILLO & KONG, 2019).

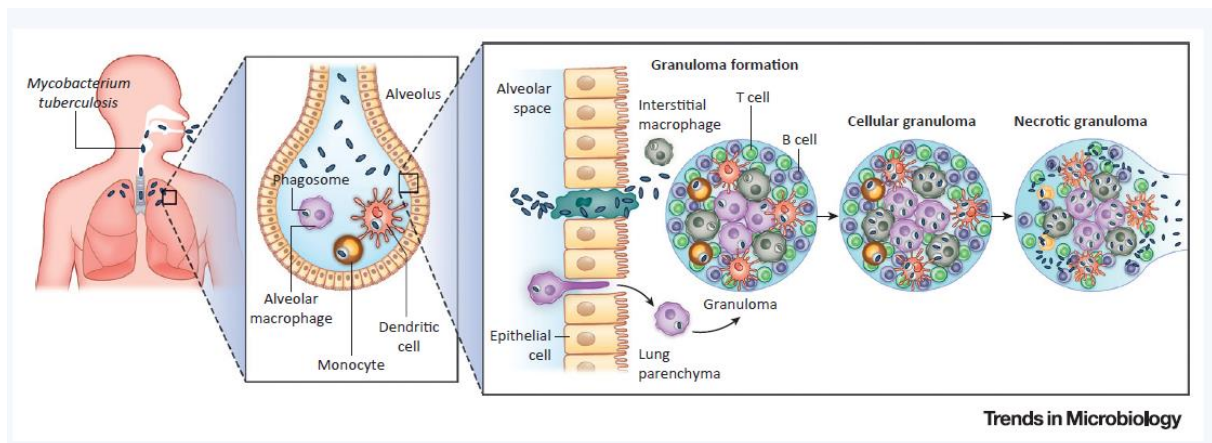


Figura 1: A formação do granuloma necrótico. Fonte: Adaptado de KOCH & MIZRAHI, 2018.

2.3. Tratamento

Até a metade do século 20 não havia tratamento definitivo para Tb. Em 1940, com a disponibilidade de estreptomicina, ácido para-aminossalicílico (PAS) e INH, o tratamento de Tb passou a possuir uma previsibilidade de cura e a introdução de RIF, PRZ e ETB nos anos seguintes trouxe à tona a era do tratamento a “curto prazo” (SHARMA & MOHAN, 2004).

O tratamento inicial padrão em vigor estabelecido pela OMS preconiza que novos casos de Tb sejam tratados sob um regime terapêutico de 6 meses, estando subdividido em fase intensiva, caracterizada por 2 meses de tratamento com RIF, INH, PRZ e ETB, seguida da fase de manutenção nos 4 meses subsequentes com RIF e INH (ZUMLA et al., 2015)

Enquanto a INH é um fármaco com maior potencial micobactericida disponível, permitindo conversão de escarro mais precoce e ajudando a diminuir a transmissão da Tb, a RIF possui a maior capacidade esterilizante, sendo essencial no combate a ITBL e diminuindo a possibilidade de recaídas. Por serem os pilares do tratamento de primeira linha anti-Tb, a resistência a ambos os fármacos demanda a utilização de fármacos de segunda linha, tendo estes atividade esterilizante limitada e estando relacionadas a tratamentos mais longos, menos eficazes e com mais efeitos adversos (SHARMA & MOHAN, 2004; ZUMLA et al., 2015).

Os principais fármacos utilizados no tratamento da Tb atualmente e suas principais reações adversas estão presentes no **Quadro 1**.

Fármaco	Efeitos adversos comuns
Grupo 1: Fármacos anti-Tb orais de primeira linha	
Isoniazida	Toxicidade a nível de SNC, aumento das enzimas hepáticas, distúrbios no TGI, hepatite e neuropatia periférica.
Rifampicina	Descoloração de fluidos corporais, aumento das enzimas hepáticas, febre, distúrbios no TGI, hepatite, hipersensibilidade e neutropenia.
Pirazinamida	Artralgia, intolerância no TGI, hepatite e hiperuricemia,
Etambutol	Neurite óptica.
Grupo 2: Fármacos anti-Tb de segunda linha para uso em Tb-MDR	
Levofloxacino ou Moxifloxacino	Prolongamento do intervalo QT, podendo levar a arritmias potencialmente fatais, intolerância no TGI, toxicidade no SNC, tontura e aumento das enzimas hepáticas.
Bedaquilina	Distúrbios gastrintestinais, artralgia, dor de cabeça e tontura. Prolongamento do intervalo QT.
Linezolida	Inibe a síntese proteica nas mitocôndrias humanas podendo causar acidose láctica, mielossupressão e neuropatia ótica e periférica.
Grupo 3: Fármacos anti-Tb de terceira linha para uso em Tb-MDR	
Clofazimina	Cristais de clofazimina são formados no corpo durante o tratamento, podendo levar a descoloração de pele e de fluidos corporais, pele seca, fotossensibilidade e depósitos nas córneas.
Ciclosserina ou Terizidona	Toxicidade ao SNC, enjôo, psicose.
Grupo 4: Fármacos anti-Tb para uso em Tb-MDR para completar o regime quando alguma das drogas anteriores não estão disponíveis	
PAS	Intolerância no TGI, hipersensibilidade.
Etionamida ou protionamida	Toxicidade ao SNC, intolerância no TGI, hepatite.
Amicacina ou Estreptomina Canamicina, Capreomicina*	Uso injetável. Alergias, dano aos nervos auditórios e vestibulares, náusea, bloqueio neuromuscular, falha renal e erupções cutâneas (comum a todas as drogas injetáveis da classe).

Delamanida	Prolonga o intervalo QT. Pode causar náuseas, vômito, tremores, ansiedade e parestesia.
Pretomanida	Neuropatia periférica, anemia, distúrbios no TGI e elevação das enzimas hepáticas.
Imipenem-cilastatina ou Meropenem	Reações de hipersensibilidade, aumento anormal das enzimas hepáticas e dano hepático induzido por drogas. Danos ao SNC podem acontecer estando associados a disfunção renal.

Quadro 1: Principais fármacos anti-Tb utilizadas atualmente e seus efeitos adversos. Legenda: PAS: Ácido para-aminossalicílico SNC: sistema nervoso central; TGI: trato gastrointestinal. *Canamicina e capreomicina não são mais utilizadas devido ao risco de falha ao tratamento e recaída envolvidos no seu uso por longos períodos em regimes para Tb-MDR. Fonte: Adaptado de PELOQUIN & DAVIES (2021); WHO (2018); ZUMLA et al (2015).

Os guias oficiais da OMS recomendam um regime terapêutico para crianças entre 3 meses e 16 anos semelhante ao visto em adultos nos casos de Tb não severa e sem suspeitas ou evidência de resistência a RIF ou INH, sendo este tratamento constituído por um período inicial de 4 meses de RIF, INH, PRZ e em alguns casos também ETB, seguido por 2 meses com apenas RIF e INH (WHO, 2022).

2.3.1. Tratamento da Tuberculose resistente

A resistência ao tratamento pode ser definida como um estado permanente ou temporário de declínio de eficácia de um fármaco contra um microrganismo previamente suscetível aquele composto. Desta forma, a resistência pode ser: (1) de origem primária, quando ocorre em um paciente que nunca recebeu o tratamento com um medicamento anti-Tb; (2) secundária ou adquirida, quando a resistência aparece durante ou após o decorrer da quimioterapia, seja como resultado de não adesão ao regime terapêutico ou prescrição inadequada; (3) inicial ou transitória, quando uma colônia resistente já está presente antes mesmo do início do tratamento, sendo detectada antes da conversão de escarro, neste caso o bacilo não se multiplica ou influencia o desfecho do tratamento (SINGH; SINGH; GUPTA, 2020).

A Tb resistente possui diversas variações, dentre as quais cabe destacar: a Tb-MDR, sendo esta causada por cepas resistentes a pelo menos RIF e INH e a Tb extensivamente resistente a drogas (Tb-XDR), sendo definida por uma cepa de Tb-

MDR com adicional resistência a alguma fluoroquinolona e outro fármaco de segunda linha do Grupo 2 (**Quadro 1**) (WHO, 2021; ZUMLA et al, 2015).

O tratamento para Tb refratária à terapia deve ser suportado por evidências laboratoriais confiáveis, especialmente em casos de Tb-MDR e Tb-XDR. Quando instalações para cultura e testagem de suscetibilidade de colônias não estão disponíveis, a escolhas terapêuticas geralmente estarão limitadas a algoritmos e interferências oriundas de um tratamento prévio (SHARMA & MOHAN, 2004). A **Tabela 1** mostra os principais genes envolvidos no desenvolvimento de Tb resistente a fármacos.

Principais genes envolvidos na resistência a fármacos anti-Tb	
Fármacos	Gene envolvido na resistência
Isoniazida	Enoil acp redutase (<i>inhA</i>)
	Catalase-peroxidase (<i>katG</i>)
	Alquil hiperóxido redutase (<i>ahpC</i>)
	Regulador do estresse oxidativo (<i>oxyR</i>)
Rifampicina	RNA polimerase subunidade B (<i>rpoB</i>)
Pirazinamida	Pirazinamidase (<i>pncA</i>)
Etambutol	Arabinosil transferase (<i>bem A, B e C</i>)
Estreptomina	Proteína ribossomal subunidade 12 (<i>rpsL</i>)
	RNA ribossomal 16s (<i>rrs</i>)
	Gene aminoglicosídeo fosfotransferase (<i>strA</i>)
Fluoroquinolonas	DNA gyrase (<i>gyrase A e B</i>)
Etionamida	Enoil acp redutase (<i>inhA</i>)
	Flavina monooxigenase (<i>ethA</i>)
	Repressor transcricional (<i>ethR</i>)
PAS	Timidilato sintase A (<i>thyA</i>)

Tabela 1: Fármacos antituberculose e os principais gene envolvidos na sua resistência. Legenda: PAS: Ácido para-aminossalicílico Fonte: Adaptado de (SHARMA & MOHAN, 2004; SINGH; SINGH; GUPTA, 2020)

O MTB destaca-se de outros grupos de bactérias onde a resistência aos fármacos utilizados não está relacionada a genes adquiridos horizontalmente de outras bactérias, mas sim através de mutações relacionadas a genes de limpeza

responsáveis por codificar os alvos terapêuticos, incluindo proteínas para internalização dos fármacos, bombas de efluxo, ou ativação de pró-fármacos. Nesse caso a resistência a múltiplos fármacos parece estar associada ao acúmulo sequencial de mutações durante a falha na quimioterapia. As mutações espontâneas nos genes do MTB associadas Tb resistente ocorrem numa ordem estimada de $3,5 \times 10^{-6}$ para INH e $3,1 \times 10^{-8}$ para RIF, por exemplo (DOOLEY & SIMONE, 1994).

Dentre alguns dos mecanismos de resistência relacionados ao desenvolvimento de Tb-MDR estão as bombas de efluxo transmembrana, tais quais presentes tanto em procariotos quanto eucariotos de diversas espécies, incluindo células humanas. Bombas de efluxo transmembrana desempenham o papel de excretar uma ampla gama de compostos não estruturais do interior das células através de força próton motriz ou energia fornecida por ATP (DA SILVA et al, 2011).

Um exemplo de transportador presente em células humanas é a glicoproteína-P, cujo aumento da expressão foi observado em linhagens de células infectadas por MTB, com conseqüente diminuição da concentração de INH no interior das células infectadas. Além da suprarregulação destes transportadores nas células do hospedeiro, o próprio MTB expressa pelo menos três tipos de transportadoras multidrogas, sendo elas as proteínas Tap, Lfr A e Mmr (SHARMA & MOHAN, 2004). Dessa forma, potenciais inibidores das bombas de efluxo, como a QU, podem auxiliar no tratamento com os antimicrobianos disponíveis, aumentando a eficácia destes compostos e prevenindo potenciais mutações gênicas adquiridas em alvos terapêuticos.

Outros mecanismos de resistência também estão envolvidos com a sobrevivência do bacilo no interior do hospedeiro, como por exemplo: (1) Inativação enzimática de fármacos, quando o genoma micobacteriano codifica enzimas capazes de inativar antibióticos por hidrólise, fosforilação, acetilação ou adenilação dos compostos, formando assim derivados inativos, como é o caso das β -lactamases e enzimas modificadoras de glicosídeos. (2) Prevenção da entrada de fármacos, sendo a célula do MTB formada por uma série de lipídios complexos que agem como uma barreira de entrada para permeação de fármacos no interior das células. (3) Mutações, que nada mais são do que modificações espontâneas no genoma do MTB, fazendo com que as proteínas ou enzimas que serviriam como alvo terapêutico percam sua

afinidade pelo antibiótico utilizado, fazendo da bactéria resistente ao fármaco, dependendo do seu mecanismo de ação (DAVIES, 1994; LOUW et al, 2009; DA SILVA et al, 2011; SINGH; SINGH; GUPTA, 2020).

2.3.2. Fatores relacionados à falha terapêutica

Dados da literatura indicam que tratamento incompleto, irregular e inadequado é um dos principais preditores de resistência adquirida aos fármacos. Já em 1993, MAHMOUDI & ISEMAN observaram que, dentre 35 pacientes com Tb-MDR, erros em decisões de manejo ocorreram em 28 pacientes, com uma média de 3.93 erros por paciente, dentre eles os mais comuns: a inclusão de um único fármaco a um regime terapêutico falho, falha em identificar uma resistência pré-adquirida, regime inicial de tratamento inadequado e falha em identificar e associar não-adesão ou adesão inadequada à terapia preventiva com INH. Dessa forma, o grupo no qual erros de manejo ocorreram tiveram maiores casos de resistência adquirida comparada ao grupo onde não houveram erros (MAHMOUDI; ISEMAN, 1993).

Um estudo conduzido por JOHNSON e colaboradores em 2003 com 109 pacientes com cultura positiva para tuberculose pulmonar encontrou um alto índice de incidência de resistência ao tratamento em pacientes com histórico prévio de abandono, sendo que dos 27 pacientes com Tb-MDR detectada, apenas 4 teriam adquirido resistência no primeiro contato com o tratamento. Os principais motivos para o abandono foram viagem para diferentes lugares, melhora dos sintomas, efeitos adversos relacionados ao tratamento e incapacidade de arcar com os custos do mesmo (JOHNSON et al, 2003).

Dentre os principais fatores predisponentes ao desenvolvimento de Tb-MDR estão o histórico prévio de tratamento dos pacientes. Um estudo internacional de vigilância conduzido por ESPINAL e colaboradores em 2001 demonstrou uma correlação linear positiva entre a probabilidade de pacientes previamente tratados desenvolverem Tb-MDR e a duração do tratamento anterior em meses, trazendo através de uma análise multivariada o histórico prévio de tratamento como fator de risco maior para Tb-MDR do que a positividade para o HIV (ESPINAL et al., 2001). Estas evidências foram suportadas por estudos posteriores realizados na Arábia Saudita e Nova Déli, que demonstraram como histórico prévio de tratamento, pouca idade, baixa adesão ao tratamento, status socioeconômico baixo e IMC abaixo de 18

foram fatores de risco independentes contribuindo para desenvolvimento de Tb-MDR (ALRAJHI et al., 2002; SHARMA et al., 2003).

Fatores demográficos tais como idade, gênero, status marital, nível educacional e status socioeconômico não demonstraram correlação com o grau de adesão ao tratamento. Por outro lado, certos fatores como problemas psiquiátricos, alcoolismo, abuso de drogas e falta de moradia mostraram-se preditores de não adesão ao tratamento (WEISS et al, 1994).

Como forma de contornar a problemática da não adesão, a implementação de DOTS (do inglês: *Directly Observed Therapy Shortcourse*) vinha ganhando destaque em alguns países, embora o cenário de saúde caótico recente causado pela pandemia de COVID-19 tenha dificultado a adesão ao programa. Os DOTS consistem basicamente em cinco pilares distintos, sendo eles: comprometimento político, serviços de acompanhamento clínico, suprimento de medicamentos, sistemas de vigilância e monitoramento terapêutico e utilização de regimes altamente eficazes sob observação direta. Sua principal finalidade é garantir a adesão completa à terapia bem como prevenir o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos na comunidade (DAVIES, 2003).

Idealmente, todas as crianças deveriam realizar o tratamento para ITBL mediante o uso de DOTS, porém devido a dificuldades logísticas e carência de mão-de-obra especializada para a área, este método é mais focado em crianças mais jovens com um alto risco de progressão, mais especificamente aqueles expostos a casos ativos confirmados. Outras medidas que podem ser tomadas de forma a garantir o tratamento efetivo são, por exemplo: utilizar de veículos semissólidos para evitar problemas estomacais ao administrar comprimidos quebrados, visitar os pacientes mensalmente e supri-los com um mês de tratamento por vez, prover instrução escrita sobre razões para o tratamento e sintomas de Tb e toxicidade e oferecer horários de acompanhamento convenientes e pequenos períodos de espera para os pacientes que forem realizar os DOTS fora de casa (LOEFFLER, 2013).

2.3.3. Novas alternativas para o tratamento da tuberculose

Além dos fármacos comumente utilizados em regimes terapêuticos bem estabelecidos para o tratamento da tuberculose, novos fármacos isolados e suas combinações vem sendo avaliadas ao longo dos últimos anos. Dentre eles, o

chamado regime “BPaI” (bedaquilina, pretomanida e linezolida) vem ganhando destaque e sendo foco de interesse recente em estudos clínicos de fase 3 (PELOQUIN & DAVIES, 2021). O **Quadro 2** traz esses e outros fármacos em testes clínicos avançados para o tratamento da Tb, seu regime terapêutico sugerido e suas principais características farmacocinéticas.

Fármacos	Dose recomendada	ADME
Bedaquilina	Dose inicial: 400 mg diariamente por 2 semanas. Dose de manutenção: 200mg três vezes por semana.	Biodisponibilidade aumentada em duas vezes por alimentos. Liga-se a 99% das proteínas plasmáticas, sendo metabolizada por CYP3A4, CYP2C8 e 2C19. Metabólitos eliminados pelas fezes.
Pretomanida	200 mg diariamente.	Absorção aumentada por alimentos. Metabolizada em 20% pela CYP3A4, além de múltiplos caminhos de oxirredução.
Linezolida	600 mg diariamente para Tb.	Biodisponibilidade oral de aproximadamente 100% não afetada por alimentos. Biotransformação causada por oxidação não enzimática com eliminação de metabólitos via renal.
Clofazimina	Dose usual de 100 mg diariamente junto a alimentos, podendo chegar a 200 mg durante curtos períodos em casos mais severos.	Biodisponibilidade oral entre 45 e 62%, aumentada em 45% por alimentos ricos em gordura.
Delamanida	Dose inicial de 100 mg duas vezes ao dia por dois meses e dose de manutenção de 200 mg	Biodisponibilidade oral entre 25 e 47% sendo aumentada em 3 a 4 vezes por alimentos.

	diariamente com alimentos.	Liga-se 99,5% a proteínas plasmáticas, incluindo albumina e lipoproteínas. Metabolizada pela albumina, CYP3A4 e outras enzimas oxidativas.
--	----------------------------	---

Quadro 2: Principais antimicrobianos utilizados em novos regimes terapêuticos, regime terapêutico recomendado e características farmacocinéticas. Legenda: ADME: Absorção, Distribuição, Metabolização e Eliminação. Fonte: Adaptado de PELOQUIN & DAVIES (2021).

Além de novas alternativas terapêuticas, estudos utilizando tecnologias de entrega de fármacos em sítio de ações específicos ou utilização de vias de administração alternativas, tal como a via pulmonar, vêm exibindo resultados promissores como alternativa para o tratamento da Tb (HADRICH et al, 2020; HALICKI et al, 2018). Dentre eles, cabe destacar o uso de formulações farmacêuticas utilizando nanocarreadores funcionalizados para entrega de antimicrobianos no interior dos macrófagos alveolares, comumente alvos de difícil acesso presentes na Tb pulmonar refratária à terapia (PANDEY & KULLER, 2006; SHEGOKAR et al, 2011).

Dentre as principais vantagens na utilização destas formulações estão o aumento do índice terapêutico dos fármacos carregados, seja devido a sua proteção contra os metabolismos de primeira passagem, no caso da administração pela via pulmonar ou endovenosa, ou pela proteção contra a degradação proporcionada pelos nanocarreadores em si, sendo estes também responsáveis pela diminuição da toxicidade e aumento da biodisponibilidade dos fármacos devido as suas características físico-químicas semelhantes às membranas biológicas, tornando-os biocompatíveis, biodegradáveis e de fácil permeação nos tecidos (HALICKI et al, 2018; SHEGOKAR et al, 2011).

2.4. Nanocarreadores de fármacos

A nanotecnologia tem se tornado um aliado global no tratamento de várias doenças, sendo uma tecnologia promissora utilizada também em vários outros campos da ciência. Podem ser consideradas nanopartículas pequenas partículas com um tamanho que varia de 1 a 1000nm ($1\text{cm} \times 10^{-9}$) de diâmetro. A utilização de nanopartículas propicia desenvolvimento nos campos diagnóstico e terapêutico,

sendo utilizados como dispositivos analíticos, agentes de contraste ou sistemas de liberação de fármacos (SINGH; SINGH; GUPTA, 2020).

Sistemas de liberação de fármacos apresentam várias vantagens tais como proteger os compostos bioativos da degradação, seja via metabolização enzimática ou devido a exposição a luz ou temperatura, além de apresentarem uma redução significativa de efeitos colaterais e controlarem a liberação dos compostos no interior das células, tornando-se uma abordagem interessante para contornar diversos dos problemas encontrados ao se trabalhar com compostos de origem natural (WANG et al., 2016).

Diversos tipos de compostos antituberculose tem-se mostrado compatíveis com o sistema de nanocarreadores como vetores do tratamento (SINGH; SINGH; GUPTA, 2020). A utilização de nanocarreadores para entrega de agentes terapêuticos via pulmonar ou endovenosa evita a degradação destes compostos pelo metabolismo de primeira passagem, a qual se atribui uma das principais limitações do tratamento via oral. Além disso, o tratamento da Tb via pulmonar permite uma abordagem *in situ* do problema, trazendo menos efeitos colaterais sistêmicos, sendo estes mais comuns a via oral ou endovenosa, junto a uma abordagem livre de agulhas para melhor conforto dos pacientes (ARBAIN et al., 2019).

A utilização de nanocarreadores permite ainda a solubilização de compostos geralmente pouco absorvidos pela via oral, como é o caso da RIF e da QU, ambos compostos hidrofóbicos solubilizados em uma formulação líquida de fácil absorção. (WANG et al, 2016).

2.4.1. Tipos de nanocarreadores lipídicos

Dentre os principais tipos de nanocarreadores lipídicos podemos citar as nanoemulsões (NEs), as nanopartículas sólidas lipídicas (NSLs) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) . As NEs (O/A – óleo em água) consistem em nanopartículas líquidas esféricas dispersas em um meio aquoso, possuindo uma estrutura de núcleo/casca. O núcleo hidrofóbico consiste em lipídios solubilizados e partes apolares dos agentes emulsificantes enquanto a “casca” polar consiste na parte polar dos emulsificantes. Dessa forma, ativos lipofílicos podem ser encapsulados em seu núcleo hidrofóbico (WANG et al, 2016).

NEs são sistemas considerados termodinamicamente instáveis e possuem um diâmetro médio de partículas na faixa entre 20 e 200nm em uma estreita variação de tamanho. As NEs podem ser produzidas em larga escala através da mistura de uma fase oleosa imiscível em água em meio alto estresse pelo processo de extrusão mecânica, processo este amplamente disponível (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). NEs também podem ser definidas como sistemas heterogêneos cineticamente estáveis onde um líquido (fase interna) está disperso em outro líquido (fase externa) na forma de gotículas e na presença de uma agente emulsionante (surfactante), sendo suas características físico-químicas governadas pela sua composição quali e quantitativa, além das condições de preparo (BRUXEL, 2012).

Comparadas a emulsões convencionais, NEs possuem maior estabilidade quanto agregação gravitacional de partículas e separação de fases, além de maior transparência ótica e biodisponibilidade aumentada dos compostos encapsulados em seu núcleo (WANG et al, 2016).

Uma das técnicas para preparo de nanocarreadores lipídicos, incluindo NEs, nanopartículas sólidas lipídicas (NSLs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) é a técnica de difusão do solvente a quente associada a temperatura de inversão de fases, na qual emulsões submícron são formadas mediante a difusão de solventes orgânicos miscíveis em água presentes na fase oleosa para a fase aquosa após aquecimento prévio da fase aquosa. Nanocarreadores lipídicos baseados nesta técnica possuem diferentes características de solubilização de compostos a depender do tipo de lipídio utilizado (sólido ou líquido) e do tipo e da concentração de surfactante empregados (DORA et al, 2012).

As NSLs são compostas por lipídios sólidos a temperatura ambiente. As NSLs são geralmente criadas através da preparação de uma NE óleo em água (O/A) em uma temperatura acima do ponto de fusão da fase lipídica, a qual é em seguida resfriada até a cristalização lipídica. Por se tratar de um sistema de entrega de partículas em escala submicron, as NSLs possuem alta biocompatibilidade, alta biodisponibilidade, liberação controlada e problemas mínimos com diversas vias de administração, tais como a via oral, endovenosa, pulmonar e transdérmica (WANG et al., 2016).

Embora possua excelentes vantagens tais como alta capacidade de encapsulação e diminuição da taxa de degradação dos ativos encapsulados, vem-se percebendo que as NSLs podem ter algumas desvantagens, tais como potencial de agregação, risco de recristalização e possibilidade de expulsão do fármaco ao longo do tempo (WANG et al., 2016).

Os CLNs são considerados a segunda geração de nanopartículas baseadas em lipídios, sendo compostos por uma matriz sólida capaz de armazenar diversos tipos de óleos em nanocompartimentos que servem como meio de solubilização para compostos lipofílicos bioativos (WANG et al., 2016). SUN e colaboradores em 2014 sintetizaram CLNs biocompatíveis e biodegradáveis utilizando o método de inversão de fase e descobriram que seus CLNs carregados com QU não somente apresentaram boa estabilidade térmica e padrão de liberação sustentada, como também foram capazes de aumentar a solubilidade da QU em água em até 1000 vezes, além de aumentar sua efetividade em inibir o crescimento do câncer de mama.

A **Tabela 2** mostra as principais vantagens e desvantagens de nanocarreadores lipídicos comumente utilizados para encapsulação de fármacos hidrofóbicos.

Sistemas de entrega	Vantagens	Desvantagens
Nanoemulsões	Estabilidade a precipitação e agregação; Pequeno tamanho de gotícula e maior interface de contato líquida; Alta eficiência de encapsulação; Capacidade de direcionamento.	Liberação rápida; Baixa estabilidade em condições gástricas.
Nanopartículas sólidas lipídicas (NSLs)	Boa tolerabilidade e biodegradabilidade; Alta eficiência de encapsulação; Capacidade de direcionamento.	Potencial de agregação; Risco de recristalização; Baixa carga de encapsulação.
Carreadores Lipídicos	Tamanhos de partículas menores que as dos SLNs;	Liberação ligeiramente mais rápida se comparada aos NSLs.

Nanoestruturados (CLNs)	Alta capacidade de incorporação; Alta estabilidade.
-------------------------	--

Tabela 2: Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas de entrega no melhoramento da biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos. Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2016).

Embora a utilização de sistemas de entrega de fármacos venham sendo utilizados cada vez mais como forma de melhorar as características físico-químicas dos agentes terapêuticos investigados, tais tecnologias ainda podem apresentar contrapontos como alto custo envolvido na sua fabricação, dificuldade de produção em larga escala, estabilidade física limitada, baixa capacidade de encapsulamento, resíduos de solventes orgânicos, dificuldade na aceitação regulatória dos componentes utilizados e potencial citotoxicidade (WANG et al., 2016).

2.5. Utilização de rifampicina e quercetina em nanocarreadores

A QU (3,3', 4', 5'-7-penta-hidroxi-flavona) é um dos flavonoides mais abundantes presentes em plantas, com uma concentração que pode variar entre 53 e 153mg/kg de peso seco de material vegetal, a QU está presente em diversos compostos da alimentação humana, como por exemplo no vinho tinto, onde sua concentração pode variar entre 4 e 16mL/L, na cebola, com concentração média entre 284 e 486mg/kg e nas maçãs, com uma concentração média entre 21 e 72mg/kg (KUMARI et al., 2010; BIANCHI et al, 2004).

A utilização de QU no campo farmacêutico é limitada devido a suas características físico-químicas, sendo elas baixa solubilidade em meio aquoso e instabilidade em meio fisiológico. Estas propriedades podem resultar em baixa biodisponibilidade, baixa permeabilidade, instabilidade química e extensa degradação por metabolismo de primeira passagem antes de alcançar a circulação sistêmica. Tais características podem reduzir a eficácia da QU quando utilizada nos campos farmacêutico ou alimentício (KUMARI et al., 2010).

A incorporação de RIF e QU em nanocarreadores pode ajudar a melhorar várias das características farmacocinéticas dos compostos, incluindo fatores como sua baixa hidrossolubilidade, proteção contra degradação, aumento da sua biodisponibilidade e controle da sua liberação (HADRICH et al, 2016; HALICKI et al, 2018).

Outros meios pelos quais os nanocarreadores melhoram a biodisponibilidade dos compostos carregados é através da sua solubilização nas formas coloidais, o que permite a apresentação do composto ao seu sítio de ação em uma forma altamente dispersa com uma grande área de superfície para absorção. Além disso, as finas gotículas empregadas oferecem uma grande superfície de contato para ação das lipases pancreáticas levando a hidrólise dos lipídios e aumentando a taxa de liberação dos compostos carregados e geração de micelas contendo a forma ativa destes compostos (DORA et al, 2016).

Em 2009, GAO e colaboradores utilizaram nanoemulsões como forma de aprimorar a biodisponibilidade da QU, o que resultou em um aumento para 4,138mg/mL de QU solubilizada comparada a 0,17 – 7,7µg/mL do mesmo composto em água, o que implicou em um aumento significativo de absorção de QU devido às NEs utilizadas.

Em 2011, TAN e seus colegas, através de testes *in vitro* e *in vivo*, interpretaram que os CLNs carregados com QU promoveram uma maior permeabilidade do composto no interior da célula além de aumentar a retenção de QU na derme e epiderme e potencializar suas funções antioxidantes e anti-inflamatórias.

Já em 2014, LIU e seus colegas desenvolveram uma formulação de CLNs catiônicos carregados com QU, sendo estes compostos por uma quantidade adequada de QU, lipídios (monoestearato de glicerol e triglicerídeos de cadeia média) e lecitina de soja, as quais exibiram um tamanho médio de partículas de aproximadamente 126 nm, potencial zeta de 40 mV e 89,3% de capacidade de encapsulação de QU com uma liberação *in vitro* mais lenta se comparada à QU suspensa em 0,5% (p/v) de uma solução aquosa de carboximetilcelulose.

HALICKI e colaboradores (2018) desenvolveram uma NE contendo RIF para o tratamento da tuberculose. Além de conseguirem um alto teor de encapsulação do composto hidrofóbico em seu interior (~ 500 µg/mL), a atividade antimicrobiana da RIF em cepas de Tb sensíveis foi mantida, o que indica a possibilidade de utilização do composto em nanoemulsões semelhantes sem perda de sua atividade farmacológica e ainda com melhoramento das suas características farmacocinéticas.

Em 2019, GROTZ e colaboradores produziram micelas poliméricas contendo RIF para administração pulmonar, avaliando sua atividade antimicrobiana *in vitro*,

propriedades inalatórias e características farmacocinéticas. As micelas não apenas aumentaram substancialmente a solubilidade aparente em água da RIF (aproximadamente 14,3 vezes mais solúvel quando encapsulada), como também apresentaram comportamento aerodinâmico adequado a administração via pulmonar e atividade antimicrobiana 2,5 vezes aumentada em linhagens de macrófagos infectados com MTB em comparação a RIF livre, além de demonstrarem acúmulo maior no período de 24 horas nos pulmões das cobaias testadas.

De forma semelhante, GALDOPÓRPORA e colaboradores (2022) co-encapsularam RIF e curcumina, ambos compostos lipofílicos, em nanomicelas decoradas com manoses em sua superfície para uso pulmonar. A coencapsulação dos compostos permitiu a entrega adequada a partes profundas do pulmão, mantendo os carreadores no local de ação por até 48 horas. Ainda, a nanoformulação decorada com manose demonstrou manter não apenas o potencial antimicrobiano da RIF e anti-inflamatório da curcumina encapsulada, como também aumentou sua atividade antimicrobiana frente a cepas sensíveis de MTB, sem demonstrar potencial hemolítico e sendo capaz de permanecer estável em fluido intersticial de pulmão simulado.

Em estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, HADRICH e colaboradores (2016) e DORA e colaboradores (2011) demonstraram a possibilidade de incorporação da QU em nanocarreadores. A utilização da QU em NEs apresentou uma propriedade antiedematosa pronunciada frente QU livre na forma de suspensão em modelos de edema de pata de ratos, atividade esta correlacionada ao aumento da biodisponibilidade oral da QU (HADRICH et al, 2016).

Ademais, HADRICH e colaboradores (2022) ao produzirem NLCs carregados com QU e funcionalizados com lectina WGA em sua superfície obtiveram não apenas uma grande quantidade do ativo encapsulado como também uma maior fagocitose por parte dos macrófagos tratados associado a uma liberação prolongada do ativo, tornando uma formulação interessante para o tratamento de parasitas intracelulares que residam no interior de macrófagos, como é o caso do MTB.

Tendo como base o exposto, este trabalho visa desenvolver uma nanoemulsão lipídica capaz de explorar o potencial antimicrobiano da associação de RIF e QU como forma de trazer novas perspectivas para o tratamento da Tb.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver e caracterizar nanoemulsões lipídicas contendo a associação de RIF e QU para o tratamento da tuberculose e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro*.

3.2. Específicos

- Desenvolver nanoemulsões lipídicas contendo RIF e QU;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões desenvolvidas;
- Desenvolver um método analítico para quantificação de RIF e QU e avaliar o teor e a taxa de recuperação destes compostos;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana frente ao *M. tuberculosis in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALRAJHI, A. A. et al. Risk factors for drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. **Neurosciences**, v. 7, n. 2, p. 99–104, 2002.

ARBAIN, N. H. et al. In vitro evaluation of the inhalable quercetin loaded nanoemulsion for pulmonary delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 2, p. 497–507, 2019.

BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.

BARANYAI, Z. et al. Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery : An Emerging Tool to Overcome Tuberculosis. **Advanced Therapeutics**, v. 4, n. 2000113, p. 1–22, 2021.

BIANCHI, M. L. P. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim Nutr**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BROWN, A. K.; et al. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. **Microbiology**, n. 153, p. 3314 - 3322, 2007.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827 - 1840, 2012.

CIRILLO, J. D.; KONG, Y. **Tuberculosis Host-Pathogen Interactions Ed. 1**. Springer Nature, Switzerland 2019, p. 63 – 93.

DAL BÓ, A. G. et al. Self-assembly of amphiphilic glycoconjugates into lectin-adhesive

nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, n. 2, p. 1418–1426, 2012.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p. 375 – 382, 1994.

DAVIES, P. D. O. The role of DOTS in Tuberculosis Treatment and Control. **Am J Respir Med.**, v. 2 (3), p. 203 – 209, 2003.

DA SILVA, P. E. A. et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 63, p. 1 – 9, 2011.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DOOLEY, S. W.; SIMONE, M. The extent and management of drug-resistant tuberculosis: the American experience. **Clinical Tuberculosis**. Chapman & Hall, London; p 171 – 189, 1994.

DORA, C. L.; et al. Formulation Study of Quercetin-Loaded Lipid-Based Nanocarriers Obtained by Hot Solvent Diffusion Method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 2, p. 289 - 296, 2011.

DORA, C. L., Poly (ethylene glycol) Hydroxystearate-Based Nanosized-Emulsions: Effect of Surfactant Concentration on Their Formation and Ability to Solubilize Quercetin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1 - 9, 2012.

DORA, C. L.; et al. Oral Delivery of a High Quercetin Payload Nanosized Emulsion: *In Vitro* and *In Vivo* Activity Against B16-F10 Melanoma. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1275 - 1281, 2016.

ERNEST, J. P. *et al.* Development of new tuberculosis drugs: translation to regimen composition for drug-sensitive and multidrug-resistant tuberculosis. **Annu Ver Pharmacol Toxicol.**, v. 61, p. 495-516. January 06, 2021;

ESPINAL, M. A. et al. Determinants of drug-resistant tuberculosis: Analysis of 11 countries. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 5, n. 10, p. 887–893, 2001.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018.

GALDOPÓRPORA, J. M.; et al. Inhalable Mannosylated Rifampicin-Curcumin Co-loaded Nanomicelles with Enhanced In Vitro antimicrobial Efficacy for an Optimized Pulmonary Tuberculosis Therapy. **Pharmaceutics**, n. 14, v. 959, 2022.

GAO, Y.; et al. Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 306 - 314, 2009.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 514–532, 2012.

GROBBELAAR, M. et al. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, n. April, p. 103937, 2019.

GROENEWALD, W.; BAIRD, M. S.; VERSCHOOR, J. A.; MINNIKIN, D. E.; CROFT, A. K. Differential spontaneous folding of mycolic acids from Mycobacterium tuberculosis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 15-22, 2014.

GROTZ, E.; et al. Pulmonary delivery of rifampicin-loaded soluplus micelles against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. 53, v. 101170, 2019.

GUO, Y.; MAH, E.; BRUNO, R. S.; Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. **Nutrition**, v. 30, p. 1279 - 1286, 2014.

HADRICH, G. et al. Anti-inflammatory effect and toxicology analysis of oral delivery

quercetin nanosized emulsion in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 12, 2016.

HADRICH, G. et al. Development of a novel lipid-based nanosystem functionalized with WGA for enhanced intracellular drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, 2022.

HADRICH, G. et al. Tuberculosis treatment facilitated by lipid nanocarriers: Can inhalation improve the regimen? **Assay and Drug Development Technologies**, v. 18, n. 7, p. 298–307, 2020.

HALICKI, P. C. B.; et al. Alternative Pharmaceutical Formulation for Oral Administration of Rifampicin. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 16, n. 8, p. 456-461, 2018.

JACOB, S. J. P.; JOTHIVANAN, E.; VAMSI, B. Y. V.; Molecular docking analysis of bioflavonoids against *Mycobacterium tuberculosis* drug target beta-ketoacyl-ACP synthase III. **Inter J Pharm Res Dev**, n.6, p. 48 - 52.

JOHNSON, J. KAGAL, A. BHARADWAJ, R. Factors associated with drug resistance in pulmonary tuberculosis. **Indian J Chest Allied Science**, v. 45, p. 105-109, 2003.

KHURANA, A. K. DHINGRA, B. What is new in management of pediatric tuberculosis? **Indian Pediatrics**. v. 55, 2019.

KOCH, R. Die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K. Krause. **Am Rev Tuberc.**, v. 25, p. 285 – 323, 1932.

KUMARI, A. et al. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 2, p. 184–192, 2010.

LI, Z. L.; et al. The effect of hyperoside on the functional recovery of the ischemic/reperfused isolated rat heart: Potential involvement of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 132 - 140, 2013.

LISNYAK, Y. V.; MARTYNOV, A. V.; Docking study of molecular mechanism behind the quercetin inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* urease. **Annals of Mechnikov Institute**, n. 4, 2018.

LIU, L. et al. Characterization and biodistribution *in vivo* of quercetin-loaded cationic nanstructured lipid carriers. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 125-131, 2014.

LOEFFLER, A. M. Pediatric Tuberculosis. **Seminars in respiratory infections**, v. 18, n. 4, p. 272-291, 2003.

LOUW, G. E. et al. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 3181-3189, 2009.

LUCIANI-GIACCOBE, L. C.; GUZMAN, M. L.; MANZO, R. H.; OLIVEIRA, M. E. Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for rifampicin and isoniazid quantification in human plasma. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 07, p. 93 - 99, 2018.

MAHMOUDI, A.; ISEMAN, M. D. Pitfalls in the Care of Patients With Tuberculosis: Common Errors and Their Association With the Acquisition of Drug Resistance. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 270, n. 1, p. 65–68, 1993.

MAJOR, R. H. **Classic descriptions of disease, 3rd ed.** Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1945.

NAIR, M. P.; et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 319 - 328, 2006.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 16, p. 275 - 278.

OZYÜRT, H.; et al. Quercetin protects radiation-induced DNA damage and apoptosis in kidney and bladder tissues of rats. **Free Radicals Research**, v. 48, p. 1247 - 1255, 2014.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, n. 5, p. 357–366, 2006.

PELOQUIN, C. A. DAVIES, G. R. The Treatment of Tuberculosis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. April, 2021.

PORTER, C. J. H.; WASSAN, K. M.; CONSTANTINIDES, P. Lipid-based systems for the enhanced delivery of poorly water soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 615 - 660, 2008.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 2012.

RAMOS, A. M.; ALLER, P. Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. **Biochemical pharmacology**, v. 75, p. 1912 - 1923, 2008.

RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A.; Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutations (Ames) test. **Molecules**, v. 17, p. 5255 - 5268, 2012.

RODRIGUES, L.; CRAVO, P.; VIVEIROS, M. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 8, p. 741 - 757, 2020.

ROGERIO, A. P.; et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 288 - 297, 2010.

SAFWAT, N. A.; et al. Quercetin 3-O-glucoside recovered from the wild Egyptian Sahara plant, *Euphorbia paralias* L., inhibit glutamine synthetase and has antimycobacterial activity. **Tuberculosis**, n 108, p. 106 - 113.

SASIKUMAR, K.; GHOSH, A. R.; DUSTHACKER, A. Antimycobacterial potentials of quercetin and rutin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **3 Biotech**, v. 8, n. 247, 2018.

SAVIC, I. M.; NIKOLIC, V. D.; SAVIC, I. M.; NIKOLIC, L. B.; STANKOVIC, M. Z.; Development and validation of a new RP-HPLC method for determination of quercetin in green tea. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 906 - 911, 2013.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. **Systematic Review Pharmacy**, v.1, n. 1, 2010.

SHARMA, D. et al. In silico and in vitro approach of *Allium cepa* and isolated quercetin against MDR bacterial strains and *Mycobacterium smegmatis*. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 29–35, 2019.

SHARMA, S. K. et al. Clinical and genetic risk factors for the development of multi-drug resistant tuberculosis in non-HIV infected patients at a tertiary care center in India: A case-control study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 183–188, 2003.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 4, p. 354–376, 2004.

SHEGOKAR, R.; AL SHAAL, L.; MITRI, K. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société**

canadienne des sciences pharmaceutiques, v. 14, n. 1, p. 100–116, 2011.

SINGH, S.; SINGH, A.; GUPTA, A. K. **Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Role of Nanoparticles Against Multi-drug-Resistant Tuberculosis (MDRTB)**, Springer Nature Singapore Pte Ltda, 2020, p. 286 - 314.

SUN, M. et al. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities *in vitro*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 15 – 24, 2014.

SURIYANARAYANAN, B.; SHANMUGAN, K.; SANTOSH, R. S. Syntethic quercetin inhibit mycobacterial growth possibly by interacting with DNA gyrase. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 5, 2013.

SURIYANARAYANAN, B.; SANTOSH, R. S. Docking analysis insights quercetin can be a non antibiotic adjuvant by inhibiting Mmr drug efflux pump in *Mycobacterium sp* and its homologue EmrE in *Escherichia coli*. **Journal of biomolecular structure and dynamics**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2014.974211>

TAN, Q. LIU, W. GUO, C. & ZAI, G. Preparation and evaluation of quercetin loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1621 – 1630, 2011.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 319 – 354, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, p. 1 - 40, 2006.

VICHÈZE, C.; KREMER, L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, p. 519 – 532, 2017.

WALLE, T.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **The Journal Nutrition**, v. 131, p. 2648 - 2652, 2001.

WANG, W. et al. Trends in Food Science & Technology The biological activities , chemical stability , metabolism and delivery systems of quercetin : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, n. 1, p. 21–38, 2016.

WARIS,G. ASHAN, H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of carcinogenesis**, v. 5, 14p., 2006.

WEISS, S. E. et al. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. **N Engl J Med**, v. 330, n. 17, p. 1179 – 1184, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2022**. Geneva, World Health Organization; 2022. 51 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis**. Geneva, World Health Organization; 2021. 33 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rapid Communication: Key changes to treatment of multi-drug and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR-RR TB)**. Geneva, World Health Organization; 2018. 7 p.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

Artigo 1. Preparo e caracterização de uma nanoemulsão lipídica contendo rifampicina e quercetina e avaliação da sua atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

Preparo e caracterização de uma nanoemulsão lipídica contendo rifampicina e quercetina e avaliação da sua atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa que constitui um grave problema de saúde global ocasionando 1,6 milhões de mortes apenas em 2021. O tratamento convencional vigente possui diversas limitações, dentre elas baixa aderência, alto nível de resistência e longa duração. Neste cenário, a utilização de nanocarreadores lipídicos contendo um ou mais compostos com atividade antimicrobiana conhecida demonstra ser uma forma promissora de resolver tais problemas através do aumento da biodisponibilidade de ativos de natureza lipofílica associados em uma formulação líquida. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar nanoemulsões lipídicas contendo rifampicina (RIF) e quercetina (QU) e avaliar sua atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de difusão do solvente a quente associado a temperatura de inversão de fases. Foram realizadas caracterização físico-química e morfológica dos sistemas, avaliados o teor e taxa de recuperação dos ativos encapsulados e avaliada sua atividade antimicrobiana *in vitro*. Foram obtidas nanoemulsões com tamanho médio de 24nm e potencial zeta de aproximadamente -26mV. O método de doseamento desenvolvido demonstrou ser preciso, exato, linear e sensível para detecção e quantificação de RIF e QU. O teor médio de RIF nas nanoemulsões foi de aproximadamente 680 µg/mL e o de QU aproximadamente 655 µg/mL, com uma taxa de recuperação média de 91% para RIF e de 87% para QU. Em relação a atividade antimicrobiana, nanoemulsões contendo rifampicina e quercetina apresentaram uma concentração inibitória mínima $\leq 0,09$ µg/mL na cepa sensível de *Mycobacterium tuberculosis*, mesma concentração obtida para RIF livre. Estes resultados apontam que as nanoemulsões produzidas demonstraram características físico-químicas adequadas, alto teor de encapsulação e mantiveram a atividade antimicrobiana da RIF em uma formulação líquida contendo dois compostos lipofílicos.

Palavras-chave: tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, nanoemulsão, rifampicina, quercetina.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that constitutes a serious global health problem, causing 1.6 million deaths in 2021 alone. The current conventional treatment has several limitations, including low adherence, high level of resistance and long-term treatment. In this scenario, the use of lipid nanocarriers containing one or more compounds with antimicrobial activity proves to be a promising way to solve such problems by increasing the bioavailability of lipophilic compounds in a liquid formulation. Thus, this work aims to develop and characterize lipid nanoemulsions containing rifampicin (RIF) and quercetin (QU) and to evaluate their antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nanoemulsions were prepared by the hot solvent diffusion associated with phase inversion temperature technique. Physicochemical and morphological characterization of the systems, content, encapsulated compounds recovery rate and nanoemulsions in vitro antimicrobial activity were assessed. Nanoemulsions with an average size of 24nm and an average zeta potential of -26mV were obtained. The developed method proved to be precise, accurate, linear, and sensitive for the detection and quantification of rifampicin and quercetin. The average RIF content in nanoemulsions was nearly 680 µg/mL and nearly 655 µg/mL stands for QU content, with an average recovery rate of 91% for RIF and 87% for QU. Regarding antimicrobial activity, nanoemulsions containing rifampicin and quercetin showed a minimum inhibitory concentration ≤ 0.09 µg/mL in a susceptible strain of *M. tuberculosis*, the same concentration obtained for free RIF. These results shown that the produced nanoemulsions exhibited adequate physicochemical characteristics, high encapsulation content, and antimicrobial activity maintained by the encapsulated RIF in a liquid formulation containing two lipophilic compounds.

Key-words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, nanoemulsion, rifampicin, quercetin.

1. Introdução

Embora possua um tratamento bem estabelecido e com altas taxas de cura caso bem executado, a tuberculose (Tb) segue sendo um grave problema de saúde global, sendo a segunda doença infectocontagiosa causada por um único agente infeccioso causadora de morte em todo o mundo. Apenas em 2021 estima-se que 10,6 milhões de pessoas foram infectadas, com 1,6 milhões de mortes dentre as quais 187.000 foram entre pacientes HIV positivos (1).

Fatores como duração do tratamento, toxicidade e falha de adesão são reconhecidamente os maiores responsáveis pela mitigação do sucesso terapêutico, além de serem os maiores responsáveis pela aquisição de resistência a múltiplos fármacos utilizados no tratamento da Tb (2).

Dentre os fármacos de primeira linha para o tratamento da Tb, cabe destacar a rifampicina (RIF), um antibiótico de amplo espectro utilizado desde a década de 60, época em que foi inicialmente utilizado para o tratamento da Tb crônica refratária à terapia (3). Embora possua uma excelente capacidade esterilizante, seu uso sozinho está propenso a falha em particular devido a mutações em seu alvo terapêutico, a enzima RNA polimerase dependente de DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (4).

A quercetina, por outro lado, é um flavonoide versátil de origem natural cuja ação farmacológica é amplamente citada na literatura. Sua atividade anti-Tb já foi documentada em estudos de *docking* que sugerem sua interação com a enzima DNA girase do Mtb (5). Ademais, estudos também sugerem sua ação sobre bombas de efluxo do Mtb, um dos principais mecanismos de resistência adquiridos, levando a uma possível inibição destas bombas, o que traz um aumento de possibilidades na sua utilização como adjuvante no tratamento da Tb (6).

Além da combinação de compostos com atividade anti-Tb conhecida, o desenvolvimento de novas tecnologias em formulações farmacêuticas é uma das formas de contornar problemas relacionados à terapia. Formulações utilizando nanocarreadores lipídicos vêm ganhando importância no contexto atual devido a sua capacidade em potencial de entrega de fármacos em sítios específicos de ação e melhoramento das características físico-químicas dos compostos carreados (7). A utilização de nanocarreadores para entrega em sítios de ação específicos objetiva não

somente aumentar o índice terapêutico dos fármacos, aumentando sua eficácia e diminuindo o tempo de tratamento, como também diminuir sua toxicidade, facilitando a adesão e diminuindo chances de abandono e consequente falha terapêutica além de aquisição de resistência associada (8).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão líquida contendo a associação de rifampicina e quercetina e avaliar sua atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Materiais

RIF, QU, estearato de polietilenoglicol (PEG) 660 (Solutol HS15®) e óleo de rícino (OR) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (Missouri, USA). Lecitina de ovo (LEC) (Phospholipon 80®) foi adquirida da Lipoid (Steinhausen, Switzerland). Metanol foi adquirido da Pareac® (Barcelona, Spain) e a água destilada foi filtrada utilizando um sistema Milli-Q® da Millipore® (Massachusetts, USA). Etanol, acetona e outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3. Metodologia

3.1. Preparo das nanoemulsões contendo rifampicina e quercetina

As nanoemulsões (NEs) lipídicas foram preparadas em um lote com um total de 11 formulações, 5 contendo os ativos RIF e QU e 6 formulações brancas sem ativos (NE-Br) através do método de difusão do solvente a quente (DSQ) associado a técnica de temperatura de inversão de fases (TIF) (9,10).

Brevemente, a fase oleosa composta por RIF, QU, OR e LEC diluídos em acetona etanol (60:40) foi previamente aquecida a 60°C e vertida sobre a fase aquosa composta pelo surfactante PEG-660 estearato aquecido a 80°C e sob agitação constante a 700rpm. A agitação constante em temperatura ambiente foi mantida até o resfriamento. Após aproximadamente 24 horas, os solventes orgânicos foram evaporados sob pressão reduzida (23mbar ~ 20min) e o volume final ajustado para 20mL. Por fim, as NEs foram filtradas em filtro de nitrato de celulose 0,45µm para retirada de possíveis impurezas. As NE-Br foram preparadas substituindo RIF e QU na fase orgânica por acetona:etanol 60:40.

A composição das formulações produzidas em um volume final de 20mL foi de: PEG-660 Estearato 1,5% (%p/v), 150 mg de OR, 20 mg de LEC, 15 mg de RIF e 15 mg de QU.

As NEs foram armazenadas em refrigerador em temperaturas entre 2 a 8°C e após 7 dias de preparo, foram visualmente inspecionadas buscando possíveis instabilidades, separação de fases ou precipitação dos ativos durante este período.

3.2. Caracterização físico-química das nanoemulsões

3.2.1. Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão

O diâmetro médio das NEs foi determinado por espalhamento de luz dinâmico usando um equipamento Anton Paar Litesizer™ 500. As amostras foram previamente diluídas na proporção de 1000x em água ultrapura. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas em ângulo de 90° na temperatura de 25 °C. O raio hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes-Einstein $R=(kBT/6phD)$, onde kB é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, D a constante de difusão e h a viscosidade do meio.

3.2.2. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por dispersão de luz eletroforética, usando um Anton Paar Litesizer™ 500. As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição das amostras na proporção de 1000x em água ultrapura.

3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação da rifampicina e quercetina

3.3.1. Análise por espectrofotometria UV/Vis

O teor de RIF e QU nas NEs foi determinado através de espectrofotometria UV/Vis. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer® modelo Lambda 25™ utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e detecção a 337nm para RIF e 375nm para QU.

3.3.2. Validação do método analítico por espectrofotometria UV/Vis

O método de quantificação por espectrofotometria UV/Vis foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação,

precisão e exatidão, conforme descrito no *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (11).

3.3.2.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método analítico em medir com exatidão a resposta de um composto de interesse na presença de interferentes presentes na amostra (11).

Para determinar a especificidade do método uma NE-Br foi diluída em metanol e lida entre os comprimentos de onda de 700 e 200nm. A absorbância foi comparada a obtida pela varredura de uma solução de RIF e outra de QU na concentração de 2,5µg/mL diluídas em metanol e lidas entre os mesmos comprimentos de onda.

3.3.2.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de três curvas de calibração, feitas em três dias diferentes, por meio de diluições de soluções padrões de RIF e QU em metanol, feitas em triplicata nas concentrações finais de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 µg/mL. Estas concentrações foram obtidas após diluição partindo de uma solução estoque de cada composto a 1mg/mL e a partir desta, preparando-se uma solução “mãe” a 50 µg/mL. A partir dos valores obtidos, gráficos de concentração *versus* absorbância foram construídos. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos por análise de regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

3.3.2.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do composto passível de detecção sem necessariamente ser quantificado de forma exata. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito passível de detecção de forma exata e precisa (11).

Os LD e LQ do método foram determinados através das seguintes equações:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{s} \quad LOQ = \frac{10\sigma}{s}$$

Onde:

σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y obtido a partir de três curvas de calibração e s é a inclinação média da curva de calibração.

3.3.2.4. Precisão

A precisão do método analítico foi determinada calculando-se a precisão interdia (precisão intermediária) e intradia (repetibilidade). A repetibilidade foi determinada através da leitura em sextuplicata de três soluções padrões com concentração conhecida, uma baixa (0,5 $\mu\text{g/mL}$), uma média (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e uma alta (12,5 $\mu\text{g/mL}$) sendo realizadas nas mesmas condições pelo mesmo analista. Para precisão intermediária as mesmas concentrações foram observadas em dois dias alternados, pelo mesmo analista e nas mesmas condições. O método foi considerado preciso uma vez que os valores obtidos de desvio padrão relativo (DPR) fossem menores que 15% (12), sendo representado pela fórmula:

$$DPR (\%) = \frac{\text{Desvio padrão abs}}{\text{Média abs}} \times 100$$

Onde:

DPR é o desvio padrão relativo e abs são os valores de absorbâncias obtidos em cada leitura.

3.3.2.5. Exatidão

A exatidão verifica a proximidade entre os resultados individuais encontrados nas amostras em comparação a um valor de referência conhecido. Para exatidão foi realizada a leitura em triplicata da NE-Br contaminada com o padrão em três diferentes concentrações conhecidas: uma baixa (0,5 $\mu\text{g/mL}$), uma média (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e uma alta (12,5 $\mu\text{g/mL}$). Foram também realizadas leituras da NE-Br nos comprimentos de onda utilizados para leitura dos ativos: 337nm e 375nm para RIF e QU, respectivamente.

A partir das absorbâncias obtidas a exatidão foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$E(\%) = \left(\frac{\text{Conc. NE contaminada} - \text{Conc NE - Br}}{\text{Conc. Teórica}} \right) \times 100$$

O valor de exatidão deve estar entre 15% para mais ou para menos do valor real da amostra, exceto para os limites inferiores de quantificação, onde estes valores podem estar até $\leq 20\%$ (12).

3.3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação da rifampicina e quercetina

Para análise em espectrofotômetro UV/Vis 10 μ L da NE foram dissolvidos em metanol. O teor de RIF e QU foi obtido após leitura da amostra e comparação da sua absorbância com a absorbância de soluções padrões contendo os dois ativos. A concentração foi expressa em μ g/mL.

A recuperação de RIF e QU foi calculada como sendo a porcentagem da concentração total dos compostos doseada em relação à quantidade inicialmente adicionada.

3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanocarreadores em cultura de *Mycobacterium tuberculosis*

3.4.1. Cultivo das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

As cepas de micobactérias sensíveis e resistentes a rifampicina foram cultivadas em meio Ogawa-Kudoh por um período de 14 dias a 37°C. A partir das colônias crescidas no meio Ogawa-Kudoh, foram preparadas suspensões bacterianas em tubos com água estéril contendo esferas de vidro. A suspensão foi homogeneizada por agitação utilizando vortex e a turbidez foi ajustada de acordo o nível 1 da escala McFarland (3×10^8 UFC/mL). O inóculo bacteriano foi preparado através da diluição 1:20 da suspensão em meio Middlebrook 7H9. O cultivo foi realizado no Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio Grande.

3.4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanocarreadores frente ao *Mycobacterium tuberculosis* pelo método REMA (*Resazurin Microtiter Assay*)

Em uma microplaca de 96 poços, foi realizada uma microdiluição seriada (1:2) de 100 μ L dos ativos livres (RIF e QU), NEs com e sem ativos e demais componentes da formulação de forma separada em 100 μ L de meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC (Ácido Oleico Albumina Dextrose Catalase). Ao final da microdiluição, foram

adicionados 100 µL do inóculo padronizado. Em cada placa foram adicionados controles de esterilidade (negativo) e de crescimento (positivo).

Foram testadas cepas padrão de MTB (ATCC 27294), cepas com monorresistência à RIF (ATCC 35838) com mutação no gene *rpoB* (H526Y) e um isolado clínico multidrogarresistente com mutação no gene *rpoB* (S531L).

As concentrações dos ativos encapsulados nas NEs começaram em 30 µg/mL indo até 0,09ug/mL como menor concentração para ambos. RIF e QU livres bem como os excipientes testados também partiram das mesmas concentrações iniciais de 30 µg/mL seguindo até 0,09ug/mL como menor concentração testada, enquanto as NEs-Br foram adicionadas aos poços na mesma quantidade que seus pares com ativos.

Após sete dias de incubação da placa a 37 °C foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,02 % e após mais 48 horas de incubação foi realizada a leitura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do composto testado capaz de inibir o crescimento bacteriano (13). A alteração de cor da resazurina de azul para rosa indica o crescimento bacteriano, logo a CIM foi definida como a ausência de mudança de cor.

4. RESULTADOS

4.1. Validação do método analítico por espectrofotometria UV/Vis

4.1.1. Especificidade

A varredura realizada na NE-Br demonstrou que os excipientes presentes na formulação não interferiram significativamente na absorbância dos ativos doseados, conforme valores demonstrados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Especificidade do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.

Composto	Absorbância	
	337nm	375nm
NE-Br	0,0008864	0,0004709
RIF 2,5 µg/mL	0,099	0,022
QU 2,5 µg/mL	0,102	0,217

Legenda: Ne-Br – Nanoemulsão branca; RIF - Rifampicina; QU - Quercetina.

4.1.2. Linearidade

Os resultados obtidos demonstraram que o método desenvolvido se mostrou linear para quantificação dos ativos, com um valor de $r^2 \geq 0,999$ em todas as análises de regressão linear realizadas (**Tabela 2**). Os LD e LQ encontrados foram de 0,125 µg/mL e 0,379 µg/mL para RIF e 0,143 µg/mL e 0,433 µg/mL para QU, respectivamente (**Tabela 2**). Estes dados apontam que os métodos desenvolvidos são suficientemente sensíveis para determinação da quantidade de ativos presentes nas amostras.

Tabela 2: Linearidade do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.

Variáveis Analisadas	RIF	QU
Concentração (µg/mL)	0,25 – 12,5	0,25 – 12,5
r^2	0,9999	0,9997
LD (µg/mL)	0,125	0,143
LQ (µg/mL)	0,379	0,433

Legenda: LD: limite de detecção; LQ – Limite de Quantificação; RIF - Rifampicina; QU - Quercetina.

4.1.3. Precisão

Os valores precisão intradia variaram de 11,76 a 0,67% para RIF e de 13,21 a 0,5% para QU. Já a precisão interdia ficou em entre 12,24% e 0,8% para RIF e 13,55% e 0,87% para QU (**Tabela 3**). Considerando-se que em todas as medidas o DPR foi < 15%, o método desenvolvido pode ser considerado preciso para o doseamento dos ativos (12).

Tabela 3: Precisão do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.

Concentração (µg/mL)	Precisão	RIF (DPR %)	QU (DPR %)
0,5	Interdia (n=18)	12,24	13,55
	Intradia (n=9)	11,76	13,21
2,5	Interdia (n=18)	2,87	2,89
	Intradia (n=9)	1,45	2,64
12,5	Interdia (n=18)	0,80	0,87
	Intradia (n=9)	0,67	0,50

Legenda: DPR – Desvio padrão relativo; RIF - Rifampicina; QU - Quercetina.

4.1.4. Exatidão

Quanto aos testes de exatidão, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de absorvância obtidos das substâncias padrão e os valores das NE-Br contaminadas, demonstrando que o método é suficientemente capaz de quantificar uma concentração exata dos ativos testados ainda que na presença de um interferente, neste caso, os excipientes presentes na nanoemulsão.

Os valores de exatidão variaram entre 107,2 e 106,64% para RIF e 110,66 e 103,46% para QU, conforme demonstrado na **Tabela 4**. Valores entre mais ou menos 15% podem ser considerados exatos para o doseamento dos ativos por espectrofotometria UV/Vis (12).

Tabela 4: Exatidão do método desenvolvido em espectrofotômetro UV/Vis.

Ativo Testado	Concentração declarada (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	Exatidão (%)
RIF	0,5	0,56	107,2
QU	0,5	0,56	110,66
RIF	2,5	2,69	106,64
QU	2,5	2,68	106,93
RIF	12,5	13,37	106,76
QU	12,5	12,94	103,46

Legenda: RIF - Rifampicina; QU - Quercetina.

4.2. Caracterização, teor e taxa de recuperação das nanoemulsões contendo rifampicina e quercetina

As NEs foram avaliadas quanto ao seu tamanho, potencial zeta, teor e taxa de recuperação dos ativos encapsulados. As formulações preparadas possuíram um tamanho médio de 23,72nm, com um PDI de 23,75% e um potencial zeta de -26,8mV. O teor médio de RIF encapsulada foi de 681,58 µg/mL e de 654,55 µg/mL para QU, com uma taxa de recuperação de 90,88% e 87,20% para cada ativo, respectivamente.

4.3. Atividade antimicrobiana

Nos testes de CIM realizados, QU livre e excipientes isolados não inibiram o crescimento do MTB. Por outro lado, RIF livre e todas as NEs contendo os ativos apresentaram a CIM $\leq 0,09 \mu\text{g/mL}$ de RIF nas cepas testadas (H37Rv). Interessantemente, duas concentrações específicas de NEs-Br testadas, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram inibição no crescimento em alguns poços, não demonstrando, porém, inibição nas concentrações entre ambas ou em concentrações inferiores testadas.

Nenhuma das substâncias testadas demonstrou atividade antimicrobiana partindo da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ frente as cepas resistentes com mutação no gene *rpoB*. Um resumo dos resultados de atividade antimicrobiana consta na **Tabela 5**.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima de NEs contendo RIF e QU, NE-Br e RIF e QU livres.

Concentração Inibitória Mínima

Substâncias testadas	Cepa sensível	Cepa Resistente
NEs	$\leq 0,09 \mu\text{g/mL}$	Sem atividade*
NEs Br	30 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$	Sem atividade*
RIF livre	$\leq 0,09 \mu\text{g/mL}$	Sem atividade*
QU livre	Sem atividade*	Sem atividade*
Excipientes da formulação	Sem atividade*	Sem atividade*

Legenda: RIF - Rifampicina; QU - Quercetina. *Formulações consideradas sem atividade antimicrobiana foram testadas a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

5. Discussão

No presente estudo foi desenvolvida uma nanoemulsão líquida contendo RIF e QU encapsuladas em uma concentração de aproximadamente 680 e 655 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente de cada ativo. A técnica de preparo de difusão por solvente a quente associada a TIF permitiu o desenvolvimento de uma nanoemulsão sem precipitações ou separações de fase macroscopicamente observadas mesmo semanas após seu preparo.

A utilização de PEG-660 estearato como surfactante, LEC como co-surfactante e OR na fase oleosa através da técnica de DSQ associada a TIF permitiu a formação

de um sistema translúcido com um tamanho médio de 24nm. Diferentemente do que ocorre em microemulsões, que são formadas espontaneamente pela mistura de óleo, água e surfactantes a uma temperatura específica sem o fornecimento de energia externa, sendo consideradas sistemas termodinamicamente estáveis, as NEs precisam da adição de energia externa proporcionada pela técnica de DSQ associada a TIF para serem formadas, o que as caracteriza como sistemas cineticamente estáveis (14).

O potencial zeta também é um importante parâmetro de estabilidade em dispersões coloidais, visto que mede a magnitude das cargas de atração e repulsão entre as partículas no plano de deslizamento, sendo este último a interface que separa o fluido móvel daquele que permanece preso à superfície (15). As NEs desenvolvidas durante este estudo possuíam um potencial zeta médio de -26mV, sendo considerados valores adequados entre ± 30 mV para completa estabilização eletrostática das NEs. Os achados indicam o efeito estabilizador das cadeias de PEG-660 estearato nas superfícies das gotículas. A carga negativa encontrada é proveniente da presença de LEC nas NEs, sendo esta constituída majoritariamente (~70%) de fosfatidil-colina (10,15).

No presente estudo foi desenvolvido e validado um método simples, rápido, confiável e econômico para quantificar RIF e QU através de espectrofotometria UV/VIS. Embora métodos cromatográficos, como por exemplo HPLC, sejam amplamente usados e recomendados para detecção e quantificação concomitante de analitos, a necessidade de instrumentação cara e de uso complexo associada a grande quantidade de uso e descarte de solventes, procedimento de aquisição de dados e preparo de amostras trabalhosos e necessidade de treinamento especializado fazem com que estes métodos sejam de difícil aplicação prática (12).

O método validado foi suficientemente sensível e específico, tanto na detecção quanto na quantificação dos ativos, preciso dentro de um mesmo dia e entre dias, exato e seletivo mesmo na presença dos excipientes das NEs e linear nas concentrações entre 0,25 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para RIF e QU.

A co-encapsulação de RIF e QU em uma nanoemulsão líquida e de tamanho reduzido sem perda da atividade antimicrobiana da RIF é um dos principais achados do presente estudo, visto que uma das grandes limitações para o tratamento da tuberculose atual vem da necessidade de associação de mais de um ativo em comprimidos tomados várias vezes ao dia (10,16). A NE desenvolvida traz um

antimicrobiano com eficácia bem estabelecida e um flavonoide como potencial adjuvante para o tratamento de Tb resistente, embora testes futuros devam ser realizados *in vivo* para maior elucidação da sua eficácia.

SHAH et al (17) desenvolveram NEs contendo RIF com o objetivo de avaliar suas características de inalação, nebulização e perfil farmacocinético. As NEs criadas possuíam um tamanho médio de 40 a 60 nm com um potencial zeta -2,5mV e +4,18mV com um PDI variando entre 16 e 46% para diferentes formulações. As NEs produzidas no mesmo estudo apresentaram mais de 95% de liberação dos fármacos em modelos de aerossolização *in vitro*, além de demonstrarem maior potencial de internalização pulmonar, menor acúmulo plasmático e maior acúmulo do ativo nos pulmões *in vivo*, o que demonstra o potencial de entrega pulmonar de NEs semelhantes as desenvolvidas por este estudo (17).

GROTZ et al (18) desenvolveram micelas poliméricas carregadas com RIF possuindo um tamanho médio de 107nm e que apresentaram uma atividade antimicrobiana *in vitro* semelhante a soluções contendo RIF livre (CIM de 7,8 a 15,6 ng/mL) empregando como indicador o ensaio de resazurina, resultados semelhantes aos obtidos por este estudo, onde NEs contendo RIF e RIF livre não apresentaram CIM diferentes.

Ademais, ensaios conduzidos por GROTZ et al demonstraram que as micelas poliméricas contendo RIF nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL tiveram um aumento considerado 2,2 e 2,5 vezes maior de inibição de crescimento de cepas infectantes de Mtb em linhagens celulares de macrófagos em comparação a mesma concentração utilizada de solução de RIF livre, demonstrando que a encapsulação do ativo em nanocarreadores melhorou significativamente sua absorção por parte dos macrófagos infectados com o *MTB*, trazendo à tona uma perspectiva futura para utilização das NEs produzidas durante este trabalho em ensaios semelhantes (18).

Não obstante, estudos conduzidos por GALDOPÓRPORA et al (19) demonstraram não somente a possibilidade de co-encapsulação de RIF com outro bioativo, neste caso a curcumina, com a manutenção da atividade antioxidante da curcumina e antimicrobiana da RIF, como também demonstraram com a decoração da superfície dos nanocarreadores com manose pôde aumentar a concentração dos fármacos no pulmão até mesmo 24h após administração, o que abre uma ampla gama de possibilidades de melhoramento para as NEs desenvolvidas no presente estudo.

Embora a quercetina *de per se* não tenha apresentado atividade antimicrobiana, sua utilização como agente antioxidante e consequente atuação frente a casos de Tb pulmonar não deve ser descartado. Parte do mecanismo de sobrevivência do MTB no interior dos macrófagos está relacionado a sua capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro, levando a lesões necróticas caseosas no pulmão, transformando o interior das células parasitadas em uma região de difícil acesso a maioria dos antibióticos comumente utilizados (16). Frente a esta situação, a possível modulação da resposta imune do hospedeiro dada pela atividade anti-inflamatória da QU pode ajudar na ação dos antimicrobianos utilizados, evitando a formação dos granulomas e consequentemente facilitando o tratamento via pulmonar, de forma semelhante ao que acontece com outros agentes antioxidantes (19).

As NEs atuam de forma a melhorar a biodisponibilidade de substâncias naturalmente pouco absorvidas pela via oral, como é o caso da QU (21). Ainda, a proteção da degradação fornecida pelas NEs aos ativos faz com que mesmo pequenas doses encapsuladas cheguem em maior quantidade ao sítio de ação desejado, o que pode facilitar o alcance da CIM nos alvos terapêuticos, sejam ele nos pulmões ou em outros tecidos parasitados (15).

Estudos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo já haviam demonstrado a possibilidade de encapsulação de QU utilizando formulações semelhantes (9,16,22,23). Este, no entanto, é o primeiro estudo nessa linha a co-encapsular RIF e QU para o tratamento de Tb. É importante salientar que nestes estudos citados a utilização dos nanocarreadores não influenciou na atividade anti-inflamatória da QU, tampouco apresentou toxicidade renal ou hepática, dados estes que corroboram com a manutenção da atividade antimicrobiana da RIF testada *in vitro* no presente estudo, além de demonstrarem a segurança de formulações semelhantes as obtidas aqui, embora ensaios adicionais devam ser realizados para avaliação da sua toxicidade (9,16,22,23).

Utilizando a técnica de difusão de solvente a quente, ROGERIO et al. (23) obtiveram NEs com um tamanho de partícula média de 20nm, com teor de 456µg/mL de QU e 86% de taxa de recuperação do fármaco, valores estes ainda menores que o teor e taxa de recuperação obtidos no presente estudo. Ainda, a QU microemulsionada desenvolvida no mesmo estudo demonstrou maior absorção e potencial anti-inflamatório que a QU em suspensão administrada via oral, ainda que em um volume consideravelmente menor, o que reitera o aumento da

biodisponibilidade sem perda da ação trazido por NEs semelhantes às desenvolvidas no atual estudo (23).

ARBAIN et al. (24) produziram nanoemulsões encapsulando QU e avaliaram seu uso inalatório para entrega pulmonar do composto. Utilizando éster de azeite de dendê e ácido ricinoleico como fase oleosa, lecitina de soja como cossurfactante e Tween 80 como surfactante, o grupo obteve nanoemulsões esféricas com o tamanho médio de 131,4 nm, 25,7% de PDI e 51,1mV de potencial zeta. Sua formulação obteve também um tamanho aerodinâmico médio, desvio-padrão geométrico e fração de partícula fina considerados adequados para uso pulmonar. Embora tais testes de viabilidade pulmonar não tenham sido realizados durante o presente estudo, dado as semelhanças físico-químicas e ainda melhores aspectos considerando tamanho, PDI e potencial zeta das NEs desenvolvidas, o seu potencial uso em medicamentos para uso inalatório futuro não deve ser descartado.

Levando em consideração o longo tempo de tratamento vigente para Tb ativa que pode durar de 4 a 6 meses com a administração de múltiplos fármacos, ou em casos de Tb latente, com uma monoterapia de INH que pode durar até 9 meses (1), a utilização das NEs contendo RIF e QU podem diminuir significativamente o tempo de tratamento através da administração de dois ativos co-encapsulados na mesma formulação na forma líquida, facilitando a adesão e aumentando a biodisponibilidade dos compostos utilizados.

6. Conclusões

As NEs contendo RIF e QU produzidas por este estudo demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* semelhante a RIF livre, apresentando um tamanho, PDI e potencial zeta adequados para uma formulação estável e compatível com a administração oral ou pulmonar.

Embora a QU encapsulada não tenha demonstrado atividade antimicrobiana, seu efeito adjuvante no tratamento da Tb não deve ser descartado, sendo necessários estudos adicionais em relação a sua atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, além de estudos que avaliem a toxicidade das formulações desenvolvidas, bem como sua biodisponibilidade *in vivo*.

7. Referências Bibliográficas

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2022. Geneva World Health Organization; 2022.; 2022.
2. Ernest JP, Strydom N, Wang Q, Zhang N, Nuermberger E, Dartois V, et al. Development of New Tuberculosis Drugs: Translation to Regimen Composition for Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2021;61:495–516.
3. Grobbelaar M, Louw GE, Sampson SL, van Helden PD, Donald PR, Warren RM. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;74(April):103937. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103937>
4. Peloquin CA, Davies GR. The Treatment of Tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(6):1455–66.
5. Suriyanarayanan B, Shanmugam K, Santhosh RS. Synthetic quercetin inhibits mycobacterial growth possibly by interacting with DNA gyrase. *Rom Biotechnol Lett.* 2013;18(5):8587–93.
6. Suriyanarayanan B, Santhosh RS. Docking analysis insights quercetin can be a non-antibiotic adjuvant by inhibiting the Mmr drug efflux pump in *Mycobacterium* sp. and its homologue EmrE in *Escherichia coli*. *J Biomol Struct Dyn.* 2015;33(8):1819–34.
7. Hadrich G, Boschero RA, Appel AS, Falkembach M, Monteiro M, Da Silva PEA, et al. Tuberculosis treatment facilitated by lipid nanocarriers: Can inhalation improve the regimen? *Assay Drug Dev Technol.* 2020;18(7):298–307.
8. Shegokar R, Al Shaal L, Mitri K. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. *J Pharm Pharm Sci.* 2011;14(1):100–16.
9. Hädrich G, Monteiro SO, Rodrigues MR, de Lima VR, Putaux JL, Bidone J, et al. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(7):1165–73.
10. Halicki PCB, Hädrich G, Boschero R, Ferreira LA, Von Groll A, Da Silva PEA, et al. Alternative Pharmaceutical Formulation for Oral Administration of Rifampicin. *Assay Drug Dev Technol.* 2018;16(8):456–61.
11. ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In: Q2B(R1): Guideline on

- validation of analytical procedure-methodology. 2005.
12. Khan MF, Rita SA, Kayser MS, Islam MS, Asad S, Rashid R Bin, et al. Theoretically guided analytical method development and validation for the estimation of rifampicin in a mixture of isoniazid and pyrazinamide by UV spectrophotometer. *Front Chem.* 2017;5(APR).
 13. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2720–2.
 14. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 2012;8(6):1719–29.
 15. Dora CL, Silva LFC, Tagliari MP, Silva MAS, Lemos-Senna E. Formulation study of quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. *Lat Am J Pharm.* 2011;30(2):289.
 16. Baranyai Z, Soria-carrera H, Alleva M, Millán-placer AC, Lucía A, Martín-rapún R, et al. Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery : An Emerging Tool to Overcome Tuberculosis. *Adv Ther.* 2021;4(2000113):1–22.
 17. Shah K, Chan LW, Wong TW. Critical physicochemical and biological attributes of nanoemulsions for pulmonary delivery of rifampicin by nebulization technique in tuberculosis treatment. *Drug Deliv.* 2017;24(1):1631–47.
 18. Grotz E, Tateosian NL, Salgueiro J, Bernabeu E, Gonzalez L, Manca ML, et al. Pulmonary delivery of rifampicin-loaded soluplus micelles against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019;53(July):101170. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101170>
 19. Galdopórpora JM, Martinena C, Bernabeu E, Riedel J, Palmas L, Castangia I, et al. Inhalable Mannosylated Rifampicin–Curcumin Co-Loaded Nanomicelles with Enhanced In Vitro Antimicrobial Efficacy for an Optimized Pulmonary Tuberculosis Therapy. *Pharmaceutics.* 2022;14(5):1–23.
 20. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, et al. Trends in Food Science & Technology The biological activities , chemical stability , metabolism and delivery systems of quercetin : A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016;56(1):21–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.004>
 21. Dora CL, Silva LFC, Mazzarino L, Siqueira JM, Fernandes D, Pacheco LK, et

- al. Oral Delivery of a high quercetin payload nanosized emulsion: in vitro and in vivo activity against B16-F10 melanoma. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016;16(2):1275–81.
22. Hädrich G, Vaz GR, Maidana M, Kratz JM, Loch-Neckel G, Favarin DC, et al. Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats. *Pharm Res.* 2016;33(4):983–93.
23. Rogerio AP, Dora CL, Andrade EL, Chaves JS, Silva LFC, Lemos-Senna E, et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res.* 2010;61(4):288–97.
24. Arbain NH, Salim N, Masoumi HRF, Wong TW, Basri M, Abdul Rahman MB. In vitro evaluation of the inhalable quercetin loaded nanoemulsion for pulmonary delivery. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(2):497–507.

8. Perspectivas

- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanoemulsões desenvolvidas em cepas resistentes com mutações que afetem bombas de efluxo no *Mycobacterium tuberculosis*;
- Avaliar as características morfológicas das formulações desenvolvidas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar o perfil de liberação e permeação dos ativos a partir dos nanocarreadores em equipamento de difusão tipo célula Franz;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro* das nanoemulsões através de reações de ensaios de oxirredução;
- Realizar ensaios de biodisponibilidade *in vivo* e *ex vivo* para detectar o acúmulo das nanoemulsões em tecidos alvo, como por exemplo, nos pulmões.