



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de Oliveira

**UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA COMO
ADJUVANTE AS DROGAS ANTITUBERCULOSE E
SUA AVALIAÇÃO *IN VITRO* CONTRA
*Mycobacterium tuberculosis***

**Recife
2017**

Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de Oliveira

**UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA COMO
ADJUVANTE AS DROGAS ANTITUBERCULOSES
E SUA AVALIAÇÃO *IN VITRO* CONTRA
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Rosa Valéria da Silva Amorim**
Coorientadora: **Dra. Lilian Maria Lapa Montenegro Pimentel**

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de
Utilização da quitosana como adjuvante as drogas antituberculosas e sua avaliação
in vitro contra *Mycobacterium tuberculosis* / Maria Eduarda de Farias Albuquerque
Gaspar de Oliveira. – Recife, 2017.

65 f.: il.

Orientadoras: Rosa Valéria da Silva Amorim, Lilian Maria Lapa
Montenegro Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Tuberculose 2. Pulmões – Doenças 3. Farmacologia I. Amorim,
Rosa Valéria da Silva (orient.) II. Pimentel, Lilian Maria Lapa
Montenegro (coorient.) III. Título.**

616.995

CDD (22.ed.)

UF PE/CB-2017-472

MARIA EDUARDA DE FARIAS ALBUQUERQUE GASPAR DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA COMO ADJUVANTE AS
DROGAS ANTITUBERCULOSES E SUA AVALIAÇÃO *IN VITRO*
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 25/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Rosa Valéria da Silva Amorim (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros (Interna)

Prof.^a Dr.^a Ronaldo Dionísio da Silva (Externo)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.^a Dr.^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Larrazábal

VICE-DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães

**Recife
2017**



pósMorfotec
Programa de Pós-Graduação
em Morfotecologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade
Lima

Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso
Vieira

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

Prof.^a Dr.^a Kenia Valença Correia

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de
Seixas Maia

Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva

Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Ricardo Yara

Prof.^a Dr.^a Rosa Valeria da Silva

Amorim

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

**Recife
2017**

“Se a suas lágrimas estão regando a terra e seus sonhos estão debaixo do chão, não desista, eles brotarão.”

Ilton Oliveira.

Dedico este trabalho a minha família, por sempre estar ao meu lado, sem vocês eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e são os meus pilares de vida, vocês são essenciais e a base para minha formação como pessoa.

A minha irmã, que sempre me ajudou em diversas formas.

A todos meus familiares, que me estimularam a conquistar meus sonhos e objetivos, em especial aos meus queridos avós que sempre se orgulharam de mim e acreditaram no meu potencial.

A minha querida avó materna Cosma Celerino (*in memoriam*) e minha bisavó paterna Josefa Soares (*in memoriam*).

Aos meus tios e tias que sempre torceram por meu sucesso.

A minha orientadora Prof^ª. Rosa Valéria Amorim, pela oportunidade, confiança, apoio durante a realização desse trabalho e durante todo o mestrado. A sua orientação foi essencial para a minha formação, para mim é uma honra ser sua orientanda.

A minha querida coorientadora Lilian Montenegro, a qual sempre esteve presente e disposta a ajudar quando precisei obrigada por todo apoio e dedicação.

A equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz (IAM/Fiocruz), em especial aos alunos Yuri de Albuquerque e Leonardo Linhares pelo auxílio nas realizações dos testes biológicos.

Ao professor Severino Alves Júnior pela orientação e colaboração na realização dos testes físico-químicos do presente trabalho.

A toda equipe do laboratório BSTR, em especial a Leandro Azevedo pela sua disponibilidade e solidariedade em me ajuda sempre que foi preciso, foi uma honra para mim fazer parte dessa equipe.

Aos meus queridos amigos da primeira turma do mestrado em Morfotecnologia, que me proporcionaram momentos especiais que jamais serão esquecidos e fizeram desse mestrado uma etapa mais leve e descontraída. Em especial a quatro pessoas: Jéssica Andrade, Erivaldo Alves, Gibbelly Cavalcante e Emerson Xavier que juntos formamos “Os Chegados”, independente dos diferentes caminhos que cada um toma tenho certeza que essa amizade durará para sempre. Muito obrigado pela amizade de vocês.

A minha melhor amiga Natália Medeiros (*in memoriam*), todo esse período estava ao meu lado, acreditando sempre que eu era capaz e a qual também faz muita falta todos os dias.

Ao meu namorado Yuri de Albuquerque por sempre estarem do meu lado me apoiando em todas as situações da minha vida.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia – PPGM e todos do Departamento de Histologia e Embriologia, em especial aos professores pelos conhecimentos compartilhados e construídos ao longo de todo o mestrado.

A todas as pessoas que colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

A tuberculose (TB) é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* com importância médica. O tratamento atual da doença é eficaz, porém apresenta efeitos adversos. A quitosana (QS) é um biopolímero natural e vem sendo testado como adjuvante para minimizar os efeitos da toxicidade de diferentes fármacos. Neste trabalho foi estudado o efeito adjuvante da QS frente às drogas Isoniazida (INH) e Etambutol (EMB), a fim de minimizar sua ação tóxica e potencializar a atividade antimicobacteriana. No presente estudo foram produzidos nanocompósitos de QS/INH (2µg/2µg; 4µg/2µg) e QS/EMB (4µg/4µg; 8µg/4µg) nas proporções de 1:1 e 2:1 e avaliada a concentração mínima inibitória (CMI) dos nanocompósitos e dos controles das drogas INH e EMB isoladamente (INH-4µg; EMB-8µg). Foi utilizado o método de microdiluição em placas contra as cepas de referência ATCC H37Rv e multidroga resistente (MDR-TB). Ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados através do método utilizando brometo (MTT), em células *Raw 264.7*. Para os compostos estudados foram realizadas análises morfológicas e físico-químicas. Os resultados obtidos da CMI para o compósito QS/EMB 1:1 indicaram uma melhor atividade antimicobacteriana quando comparada aos demais compostos testados nas cepas H37Rv e MDR. Na citotoxicidade do QS/EMB 1:1 foi observada uma IC50 maior que o EMB isolado, contudo sem diferença estatística significativa ($p = 0,25$). O QS/EMB 1:1 apresentou um tamanho de 145 nm e interações fármaco-polímero confirmado em estudos físico-químicos. Conclui-se que o QS/EMB 1:1 formou um nanocompósito promissor contra a *Mycobacterium tuberculosis*.

Palavras-Chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Multidroga resistente; Quitosana; Nanocompósito.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) of medical importance. The current treatment of the disease is effective, but has adverse effects. Chitosan (CS) is a biopolymer and has been tested as adjuvant to minimize the effects of toxicity of different drugs. In this work, we studied the adjuvant effect of CS on the drugs Isoniazid (INH) and Ethambutol (ETH), in order to minimize its toxic action and potentiate the antimycobacterin activity. In the present study, conjugates of CS / INH (2 μ g / 2 μ g, 4 μ g / 2 μ g) and CS / ETH (4 μ g / 4 μ g; 8 μ g / 4 μ g) were produced in 1:1 and 2:1 ratios and the minimum inhibitory concentration. Of conjugates and controls of INH and ETH drugs alone (INH-4 μ g; ETH-8 μ g) by the plaque microdilution method against the reference strains ATCC H37Rv and resistant multidrug (MDR-TB). In vitro cytotoxicity assays were performed by the method using bromide (MTT) in Raw 264.7 cells. Morphological and physico-chemical analyzes were performed for the compounds studied. The results obtained from the CMI for the 1:1 CS / ETH composite indicated a better antimycobacterial activity when compared to the other compounds tested in the H37Rv and MDR strains. In the 1:1 CS / ETH cytotoxicity a higher IC50 was observed than the isolated EMB, however with no significant statistical difference ($p = 0.25$). 1:1 CS / ETH had a 145 nm size and confirmed drug-polymer interactions in physico-chemical studies. It is concluded that the 1: 1 CS / ETH formed a promising nanocomposite for the treatment of TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Multidrug resistant; Chitosan; Nanocomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do Etambutol. Fonte: ELSEVIER LTD., 2008.	22
Figura 2. Estrutura molecular da Isoniazida. Fonte: SQUIBB et al., 2008.	24
Figura 3. Ilustração da influência do tamanho das partículas na deposição pulmonar e fagocitose pelos macrófagos alveolares. Fonte: COSTA et al, 2016.	27
Figura 4. Estrutura molecular da Quitosana. Fonte: AZEVEDO et al., 2007.	28
Figura 5. Esquema para teste das Microdiluições em placa de 96 poços. O número de poços e placas foram reduzidos na ilustração apenas por questões didáticas.	34
Figura 6. Efeito da citotoxicidade dos compostos etambutol (EMB), quitosana (QS), o compósito (QS/EMB 1:1) e o controle negativo (C-) em macrófagos RAW 264.7. Cada barra representa a média \pm erro padrão dos resultados de citotoxicidade, a partir de três experimentos independentes em comparação com células não tratadas (viabilidade 100%).	41
Figura 7. Eletromicrografia de varredura das partículas de QS (A-B), da droga EMB (C-D) e do compósito QS/EMB 1:1 (E-F), nos aumentos de 1.000x – 4.000x respectivamente.	42
Figura 8. Ilustração da formulação química do nanocompósito QS/EMB 1:1 (A) com os espectros de RMN do Etambutol – EMB (B), da Quitosana de baixo peso molecular despolimerizada – QS (C) e o do nanocompósito QS/EMB 1:1 (D).	44
Figura 9. A) Perfil de emissão da QS, do EMB e do nanocompósito QS/EMB 1:1, excitando em 357 nm, 465 nm e 470 nm respectivamente. B) Imagem de Microscopia Confocal de Fluorescência do QS, EMB e QS/EMB excitando nas mesmas regiões do perfil de emissão.	45
Figura 10. Espectro de FTIR da quitosana despolimerizada (QS), etambutol isolado (EMB), e o nanocompósito QS/EMB respectivamente.	46
Figura 11. Análise termogravimétrica da QS, EMB, e do nanocompósito QS/EMB respectivamente, em atmosfera de nitrogênio no intervalo de 10 ^o /min.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e toxicidade celular (IC50) dos compostos isolados e associados a quitosana em cepas ATCC H ₃₇ Rv e cepa clínica MDR - 1576 da <i>M. tuberculosis</i>	40
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximado
±	Mais ou menos
°	Grau
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor igual
≥	Maior igual
%	Por cento
$\Delta\lambda$	Delta lambda
λ_{ex}	Absorbância de excitação
cm^{-1}	Centímetro menos um
g	Gramas
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
μL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
μg	Micrograma

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-TB	Antituberculose
BCG	Bacilos Calmette-Guerin
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EMB	Etambutol
FTIR	Espectro Infravermelho com Transmissão de <i>Fourier</i>
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC50	Concentração Inibitória
INH	Isoniazida
IS	Índice de Seletividade
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco
MCF	Microscopia Confocal de Fluorescência
MDR	Multidroga Resistente
MDR-TB	Tuberculose Multirresistente
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaNO ²	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PZA	Pirazinamida
QS	Quitosana
RIF	Rifampicina
TB	Tuberculose
TGA	Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Patogênese da tuberculose	18
2.2 Macrófagos	19
2.3 Tratamento da Tuberculose	20
2.4 Etambutol	22
2.5 Isoniazida	24
2.6 Associação de antibióticos com adjuvantes	25
2.7 Nanosistemas para anti-TB	26
2.8 Quitosana	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Materiais	32
4.2 Purificação e Despolimerização da Quitosana	32
4.3 Preparação dos Compósitos	33
4.4 Atividade Biológica	33
4.4.1 Atividade Antimicrobacteriana	33
4.4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da Citotoxicidade	35
4.4.3 Cálculo do índice de seletividade	35
4.5 Caracterizações morfológica e físico-química	36
4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	36
4.5.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	36
4.5.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)	36
4.5.4 Fotoluminescência	37
4.5.5 Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF)	37
4.5.6 Espectro Infravermelho com Transmissão de Fourier (FTIR)	37
4.5.7 Análise Termogravimétrica (TGA)	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Atividades Biológicas	39

<i>5.1.1 Atividade antimicrobacteriana dos compostos QS, INH e EMB e os compósitos QS/INH e QS/EMB</i>	39
<i>5.1.2 Atividade citotóxica</i>	40
5.2 Caracterização morfológica e físico-química	41
<i>5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	41
<i>5.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	43
<i>5.2.3 Espectro infravermelho com transmissão de Fourier (FTIR)</i>	45
<i>5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)</i>	46
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO A	64
ANEXO B	65

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ou bacilo de Koch, e que ainda está longe de ser um problema de saúde do passado. De acordo com um relatório atual da Organização Mundial de Saúde, o número anual de mortes por TB supera as perdas por infecção pelo HIV- *Human Immunodeficiency Virus* (SCHUBERT et al., 2017). Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relataram 9,6 milhões de novos casos de tuberculose, que resultou em 1,6 milhões de mortes, tornando-se a principal causa de morte no mundo das doenças infecciosas (Global tuberculosis report., 2015).

O Brasil é o 17º país com maior número de casos, dentre os 22 países em desenvolvimento, que juntos, somam 80% dos casos de TB no mundo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2016). Em 2016 foram 2.200 casos confirmados de TB em Pernambuco, e 952 casos confirmados na região metropolitana do Recife (SITETB - Sistema de Informação do Tratamento Especial da Tuberculose). A OMS propôs a erradicação da TB até 2050 e, embora seja possível, constitui um objetivo ambicioso de abordagem, que exige tecnologias mais eficazes (COSTA et al., 2016a; WHO, 2014).

O atual tratamento recomendado contra os novos casos de TB pulmonar é composto por uma terapia de pelo menos seis meses com quatro medicamentos antituberculose de primeira linha (Isoniazida (INH), Rifampicina, Etambutol (EMB) e Pirazinamida), e fármacos de segunda linha, tais como agentes injetáveis (Estreptomicina, Kanamicina, Amicacina, Capreomicina e Viomicina) que são utilizados quando o tratamento com fármacos de primeira linha falham ou na presença de casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB) (COSTA et al., 2016a). As cepas resistentes aos fármacos tradicionais da terapia anti-TB, são atualmente um grande desafio para o tratamento da TB em todo o mundo (CHANG; YEW, 2013).

A tuberculose multirresistente (MDR-TB) é uma forma da doença causada por bactérias que não respondem a, pelo menos, Isoniazida e Rifampicina, os dois mais potentes fármacos de primeira linha das drogas antituberculose. A terapia para os casos de MDR-TB é mais prolongada, com drogas mais caras e mais tóxicas (KAUR; SINGH, 2014; WHO, 2014). Além disso, estes medicamentos antituberculose são metabolizados no fígado, podendo induzir a hepatotoxicidade (KAUR; SINGH, 2014; WHO, 2014).

A imunidade celular é um dos principais mecanismos da terapia anti-TB. A quimioterapia mata a maioria das bactérias durante alguns dias, mas uma subpopulação

em fase estacionária pode persistir de forma aeróbica dentro dos macrófagos (PARK et al., 2013a). Durante este tempo o sistema imunológico deve proteger o corpo do paciente, sendo essencial descobrir drogas para serem usadas no tratamento que não sejam tóxicas para as células que desempenham papel importante na resposta imune (SINGH et al., 2014).

A utilização de materiais nanoestruturados na tecnologia farmacêutica é abordada como novas possibilidades para o desenvolvimento de drogas e dispositivos de liberação de fármacos altamente funcionais que possam ser propostas no tratamento e diagnóstico da tuberculose facilitando a sua administração, sobretudo para a forma multidroga resistente (BROOKS; BROOKS, 2014; HOAGLAND et al., 2016; KAUR; SINGH, 2014; SOSNIK et al., 2010). O desenvolvimento de nano e micropartículas, são utilizadas em aplicações médicas, dentre eles, os nanocompósitos produzidos com polímeros naturais (CARUSO; MERLO; CAFFO, 2014).

A quitosana (QS) é um biopolímero formado por resíduos de 2-amino-2-deoxi-D-glucano, obtida da desatilação da quitina (ILLUM, 1998). Ela que tem sido empregada como base para a formação de sistemas de liberação controlada de fármacos, em virtude de suas propriedades físico-químicas e biológicas, além de apresentar adjvância aos compostos com os quais está associada (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). A QS vem sendo estudada como um biopolímero promissor para a compensação de toxicidade de fármacos e a proteção dos hepatócitos durante a administração de drogas antituberculose (GARG; RATH; GOYAL, 2015; VAVŘÍKOVÁ et al., 2011a).

Nanocompósitos de quitosana com drogas antituberculose podem ser uma alternativa eficaz na quimioterapia não-tóxica da tuberculose, além de potencializar as ações antimicobacteriana das drogas, visto que a QS apresenta uma atividade antibacteriana (EL-ZOWALATY et al., 2015; MARTIN; PALOMINO, 2012; PALOMINO et al., 2002; SANTHOSH et al., 2006), e por essa razão é esperado que a associação da mesma com os fármacos Isoniazida e Etambutol, possa resultar em uma diminuição da concentração mínima inibitória (CMI) contra a *M. tuberculosis* e consequentemente menor toxicidade. Desse modo, esse trabalho avalia o potencial da quitosana associado as drogas INH e EMB, sugerindo como uma alternativa promissora para o tratamento da Tuberculose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Patogênese da tuberculose

A tuberculose é causada pela infecção de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A infecção de um hospedeiro com *M. tuberculosis* é iniciada pela inalação/absorção de gotas (aerossóis) contendo um pequeno número de Bacilos (DUBE; AGRAWAL; VYAS, 2012). Os bacilos se propagam do local da infecção inicial através dos vasos linfáticos ou sangue para outras partes do corpo. O pulmão é o órgão mais suscetível a infecção da TB, conhecida como tuberculose pulmonar, porém o bacilo pode afetar praticamente todos os órgãos do corpo humano (tuberculose extrapulmonar) (COSTA et al., 2016b).

As Micobactérias podem existir como bacilos que se dividem ativamente ou em estado "latente", podendo ambos ocorrerem dentro do mesmo indivíduo dependendo do estágio da doença (PANDEY; AHMAD, 2011a). Esta condição resulta em infecção latente da TB, onde a infecção não está ativa e não pode ser transmitida. No entanto, estas células latentes podem ser reativadas quando o sistema imunitário do hospedeiro é suprimido (por exemplo, por infecção por HIV) (ARBEX et al., 2010a). Por outro lado, em uma pessoa com um sistema imunológico fraco o granuloma não captura ou contém as bactérias. Portanto, a *M. tuberculosis* será capaz de escapar e se espalhar para outros alvéolos e órgãos que conduzem à TB primária progressiva (PARUMASIVAM et al., 2016).

Uma vez que o *M. tuberculosis* atingem as vias aéreas terminais, as micobactérias são cercadas e fagocitadas por macrófagos alveolares. As bactérias dentro dos macrófagos são então expostas a múltiplos microbicidas, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pH ácido, enzimas lisossomais e peptídeos tóxicos (SOSNIK et al., 2010). Além disso, os macrófagos iniciam a produção de enzimas proteolíticas e citocinas para degradar estes microrganismos patogênicos, mas alguns bacilos são capazes de sobreviver dentro do macrófago por períodos de tempo, evitando todo um mecanismo bactericida dos macrófagos (ONYEBUJOH et al., 2005). O lançamento de citocinas atraem, conseqüentemente, linfócitos T para o sítio infectado. Em uma pessoa com imunidade celular intacta, os granulomas serão formados através da acumulação de linfócitos T ativados e macrófagos ao redor do *M. tuberculosis* para conter a infecção (GONZÁLEZ-JUARRERO; O'SULLIVAN, 2011). Estes granulomas são dependentes

do fator de necrose tumoral (TNF), em criar um microambiente que limita a replicação e propagação da *M. tuberculosis* (PARUMASIVAM et al., 2016).

2.2 Macrófagos

Os macrófagos são células de defesa, amplamente distribuídas pelo organismo, que recebem diferentes nomes de acordo com a sua localização. Alguns exemplos são os macrófagos no Sistema Nervoso Central que são denominados de micróglia, temos também as células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, células dendríticas na região subcortical dos linfonodos e células de Langerhans na pele (YUE et al., 2010). São células relativamente grandes, que medem entre 25-50 μm de diâmetro, apresentam núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias (SOSNIK et al., 2010).

Os macrófagos são um dos mais importantes tipos de células do sistema imune inato e podem assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização (SHIBATA et al., 1997a). Eles podem exercer a função de defesa de maneira indireta, por meio de atividades antitumorais e microbicidas, da secreção de citocinas, da apresentação de antígenos, regulando assim o sistema imune ou de forma indireta, identificando, fagocitando e destruindo efetivamente corpos estranhos. Desta forma, o macrófago tem papel central no início da resposta inata adquirida e a efetividade da resposta contra patógenos depende da sua forma de ativação (SHIBATA et al., 1997b).

Os macrófagos são hospedeiros principais de patógenos intracelulares das doenças infecciosas crônicas e, assim, alvo terapêutico para a administração intracelular de antibióticos. Agentes antibacterianos são administrados a macrófagos para o tratamento de infecções intracelulares, tais como a tuberculose, salmonelose e brucelose. Estas infecções são causadas por bactérias que “residem” nas células hospedeiras, o que lhes permitem replicar, sobreviver e causar danos ao hospedeiro. Os macrófagos fornecem um nicho imune-privilegiado e agem como reservatórios para estes patógenos intracelulares (SOSNIK et al., 2010). Infecções por estes patógenos, como a *M.tuberculosis* não apresentam bons resultados terapêuticos, já que a maioria das bactérias sobrevivem dentro dos macrófagos e grande maioria das drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose são incapazes de atravessar a membrana celular devido à polaridade ou ao tamanho (GONZÁLEZ-JUARRERO; O’SULLIVAN, 2011).

Desta forma, linhagens macrófagos são de grande interesse para obtenção de informações sobre a resposta produzida frente à presença de agentes patológicos no organismo. Dentre as linhagens imortalizadas de macrófagos disponíveis, se destaca as RAW 264.7, oriundas de células tumorais peritoneais induzidas por vírus em ratos. Estas células são aderentes, apresentam alta taxa de fagocitose e de multiplicação. São resistentes e relativamente fáceis de cultivar. São interessantes para testes de toxicidade, pois apresentam metabolismo que mimetiza macrófagos de culturas primárias, porém não sofrem fase de declínio no seu crescimento, por serem imortalizadas (SHIBATA et al., 1997a).

2.3 Tratamento da Tuberculose

A quimioterapia atualmente disponível para o tratamento da MTB inclui fármacos orais de primeira linha como Isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), rifampicina (RIF) e etambutol (EMB); Fármacos de segunda linha como os são injetáveis Estreptomicina, Kanamicina, Amicacina, Capreomicina e Viomicina, e outros fármacos (SARKAR; SURESH, 2011). De acordo com as diretrizes da OMS, o esquema padrão para o tratamento da TB inclui a administração diária de INH, RIF, PZA e EMB por 2 meses para uma diminuição dos sintomas clínicos. Após os 2 meses, a continuação dessa quimioterapia é realizada com a administração de duas a três drogas (INH, RIF ou EMB) intermitentemente por quatro a sete meses para eliminar as possíveis *M. tuberculosis* remanescentes e reduzir resistência (DYE, 2006; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

O esquema primário preconizado para a TB pulmonar consiste na ingestão de 150mg de Rifampicina, 75mg de Isoniazida, 400mg de Pirazinamida e 275mg de Etambutol, sendo administrada em dois comprimidos para pacientes com 20 a 35 Kg; três comprimidos 36 a 50 Kg; e quatro comprimidos para pacientes com mais de 50 Kg, isso durante os dois primeiros meses. Os últimos quatro meses – fase de manutenção, consiste na administração de uma cápsula de Rifampicina de 300mg com 200mg de Isoniazida para pacientes com peso entre 20 a 35 Kg; para a faixa de 36 a 50 Kg a ingestão de duas cápsulas, uma contendo 300mg de Rifampicina e 200mg de Isoniazida e outra contendo 150mg de Rifampicina e 100mg de Isoniazida; e para pacientes acima de 50Kg, são ingeridas duas cápsulas de Rifampicina 300mg e 200mg de Isoniazida (BRASIL, 2011).

Todas as combinações de fármacos devem considerar o impacto das interações medicamentosas, proporções de compostos e regimes de dosagem na adsorção, metabolismo e excreção de cada fármaco individualmente (BOUCHARD; VISKOV; GARCIA-ECHEVERRIA, 2014; GROSSET; SINGER; BISHAI, 2012). A administração sequencial de fármacos sinérgicos pode evitar o mecanismo de resistência bacterina, já que, a eficácia dos fármacos em conjunto é maior que o efeito dos fármacos isoladamente. (ARBEX et al., 2010a). Em particular, certas combinações entre fármacos podem realmente mitigar a toxicidade de drogas individuais, muitas vezes devido à diminuição da dosagem e concentração necessárias, contudo podem aumentar o potencial toxicológico para as bactérias, bem como para células e microbiota do hospedeiro. (GARG; RATH; GOYAL, 2015; VAVŘÍKOVÁ et al., 2011b).

Os fármacos de segunda linha são usados quando o tratamento com fármacos de primeira linha falha ou na presença de casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB). O tratamento atual da MDR-TB requer pelo menos oito meses para a fase inicial com um regime contendo 2-3 medicamentos injetáveis de segunda linha, e depois mais três de terceira linha incluindo fluoroquinolona, etambutol e possivelmente etionamida por até 20 meses (BAGHAEI et al., 2009). Estes medicamentos são menos eficazes, mais tóxicos e não estão disponíveis em muitos países devido a custos elevados (COSTA et al., 2016b; PARUMASIVAM et al., 2016).

O tratamento atual é geralmente associado a efeitos adversos graves, e uma falha na administração da quimioterapia constitui uma das principais razões para o aparecimento de estirpes resistentes (BAGHAEI et al., 2009). Além das limitações acima mencionadas, as vias de administração têm também desafios críticos. A via oral é a mais conveniente e menos onerosa; contudo, a administração prolongada de doses elevadas necessárias dos medicamentos anti-TB atingem o metabolismo hepático de primeira passagem que podem reduzir a biodisponibilidade do fármaco, comprometendo a eficácia dos medicamentos anti-TB (ARBEX et al., 2010a). Além disso, também temos problemas com tolerância ou resistência por *M. tuberculosis* aos fármacos administrados (COSTA et al., 2016b).

Outra forma de prevenção para a TB é uma vacina de forma atenuada da *Mycobacterium bovis*, ou bacilos Calmette-Guerin (BCG) que foi isolado de uma vaca com mastite tuberculosa, desenvolvida em 1908 (BAGHAEI et al., 2009; DESAI et al., 2016). A vacinação com BCG foi realizada com sucesso em crianças de cinco anos e menos por mais de um século. A vacina é relativamente barata e seguro, é administrado

como uma única injeção intradérmica, contudo protege apenas na primeira infância contra a *M. bovis*, mas não é eficaz para a *Mycobacterium tuberculosis* (COLANGELI et al., 2005; GONZÁLEZ-JUARRERO; O'SULLIVAN, 2011). Além disso, em ensaios clínicos, a eficácia da BCG demonstrou que a proteção diminui ao longo do tempo e só dura até 10 anos após a vacinação (SUBHEDAR et al., 2017). Uma série de metanálises revelou ainda que a eficácia da vacinação com BCG para a prevenção da tuberculose pulmonar em adultos depende da localização geográfica, fatores ambientais e genéticos (TROWS; SCHERLIES, 2016).

2.4 Etambutol

O etambutol (EMB) (Figura 1) é utilizado em associação com outros fármacos antituberculose de primeira linha, ele inibe a arabinosil transferase, uma enzima que é responsável pela biossíntese do arabinogalactano, que por sua vez é um componente-chave da parede celular da micobactéria impossibilitando o seu crescimento. O papel principal do EMB na linha no tratamento da Tuberculose é prevenir a resistência à rifampicina em caso de resistência pré-existente a isoniazida (ELSEVIER LTD., 2008). Em casos de resistência, o EMB pode ser administrado por até 20 meses, entretanto após 10 dias de uso da droga o paciente apresenta sintomas diversos, devido a toxicidade do uso intermitente da droga (BAGHAEI et al., 2009).

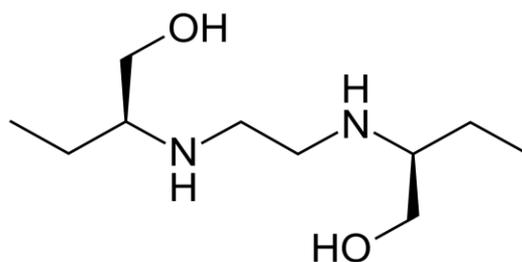


Figura 1. Estrutura molecular do Etambutol. Fonte: ELSEVIER LTD., 2008.

Em alguns testes de toxicidade *in vitro* do EMB, em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, foi relatado uma dose inibitória que variou entre 4,32 – 6 mg/mL, após 3 dias de incubação (AHMAD; NAKPHENG; SRICHANA, 2014). Nos fetos de ratos que foram tratados com EMB na dose de 500 mg/mL, durante a gestação, foi observado alterações morfológicas no palato, anencefalia e anormalidade na região vertebral, principalmente na vértebra cervical. Nesse estudo, foi também testado a toxicidade do EMB em coelhos com a mesma dose do teste anterior, durante a gestação, foram observados fetos com monoftalmia (uma malformação congênita que consiste na

presença de apenas um olho), e outras malformações, especialmente no crânio, o que dificilmente é compatível com a vida (BOULANGER SCEMAMA; TOUITOU; LE HOANG, 2013). Na realização de teste para administração farmacológica segura em animais, foi realizado testes em cães para obtenção da DL50, produzindo danos no miocárdico e despigmentação dos olhos (ELSEVIER LTD., 2008).

A dose oral de EMB para o tratamento da *M. tuberculosis* é de 275 mg/kg, 2 vezes ao dia e isto produz níveis plasmáticos máximos de 3-5 mg/mL em adultos. As recomendações atuais da dose pediátrica pela OMS são baseados em uma revisão da experiência clínica em crianças com doses de 15 a 30 mg/kg, sendo doses diárias de 20 mg/kg (Intervalo, 15 a 25 mg/kg) e doses intermitentes de 30 mg/kg, 3 vezes por semana para crianças de todas as idades são recomendadas (DYE, 2006; Global tuberculosis report., 2015; ONYEBUJOH et al., 2005; SARKAR; SURESH, 2011). Vários estudos relataram uma alta toxicidade em humanos, apresentando neuropatia óptica e hepatotoxicidade ocasional nas concentrações acima de 10 mg/mL durante a administração da droga (CHEN; LIN; SHEU, 2015; GUILLET et al., 2010; RASOOL et al., 2015).

A Neuropatia óptica, incluindo neurite óptica ou neurite retrobulbar em associação com a terapia do EMB, pode ser caracterizada por um ou mais dos seguintes eventos: diminuição da acuidade visual (escotoma) e/ou daltonismo (RASOOL et al., 2015). Estes efeitos podem estar relacionados com as doses diárias durante o longo tratamento da Tuberculose, que geralmente é reversível quando a administração do fármaco é descontinuada. Em casos raros há perda de 80% da visão, e em alguns pacientes a cegueira é irreversível (CHEN; LIN; SHEU, 2015; CHOI et al., 2006). Há outras observações sobre as reações adversas do uso do EMB em humanos: Dor nas articulações, disfunção gastrointestinal, dor abdominal, mal-estar, dor de cabeça, tonturas, confusão mental, desorientação e possíveis alucinações (ELSEVIER LTD., 2008; JÚNIOR; RAMOS; ROBAZZI, 2017). Dentro deste contexto, são necessários novos fármacos aperfeiçoados para reduzir a duração do tratamento da tuberculose, prevenir a resistência e reduzir a lesão pulmonar (JÖNSSON et al., 2011).

O EMB possui uma concentração mínima inibitória (CIM) de 4 - 2 µg/mL em cepas de referência da *M. tuberculosis* (H37Rv) in vitro e 16 µg/mL em cepas resistentes (HEIFETS; ISEMAN; LINDHOLM-LEVY, 1986). O espectro da atividade antibacteriana do EMB é amplo, sendo eficaz contra o crescimento ativo do gênero *Mycobacterium*, incluindo quase todas as cepas *M. tuberculosis* e *M. kansasii*, bem

como um número de estirpes da *M. avium*. Porém já existe cepas da micobactéria que se encontram resistentes a droga, com CMIs de 10-50 mg/mL. A resistência da *M. tuberculosis* em cepas clínicas e de referências, pode ser expressa através da mutação do gene Met306 resistente ao EMB (BAGHAEI et al., 2009; COLANGELI et al., 2005; SLAVCHEV; MICHAILOVA; MARKOVA, 2016). A mutação no códon 306 representa apenas 68% das cepas resistentes ao EMB, sugerindo que possa haver outros mecanismos de resistência (MUSTAFA et al., 2015).

2.5 Isoniazida

A isoniazida (INH) é um dos mais importantes fármacos no tratamento da tuberculose, utilizada desde 1952. Sua estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazina (Figura 2). A INH apresenta uma ação bactericida sobre os bacilos semelhante ao EMB, inibindo a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo, com ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (extracelulares) (BEREZIN; SKORIK, 2015a).

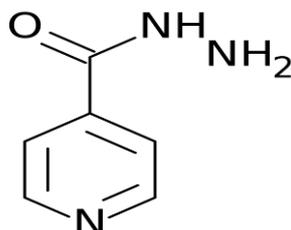


Figura 2. Estrutura molecular da Isoniazida. Fonte: SQUIBB, et al., 2008.

A INH possui alta atividade contra *M. tuberculosis* com CMIs que variam de 0,25 - 0,02µg/mL (DIXIT et al., 2012), sendo também utilizada contra *M. avium* e para a redução tremores causados por esclerose múltipla (COLANGELI et al., 2005). Contudo, a INH é rapidamente metabolizada pela via hepática de primeira passagem, necessitando assim de altas doses, o que acarreta no aumento da toxicidade no organismo (SINGH et al., 2014).

A administração da INH é normalmente em associação com outra droga do tratamento da TB, como a Rifampicina, podendo levar a uma hepatite medicamentosa aguda e fulminante. A INH, quando associada à rifampicina, pode reativar infecções virais inaparentes em portadores assintomáticos e pacientes imunodeprimidos, com

consequente instalação de hepatite viral, especialmente a do tipo B e potencializar o efeito hepatotóxico da INH (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). A característica histopatológica da hepatite medicamentosa por isoniazida pode ser a necrose celular aguda ou a colestase (SQUIBB; INDEX; INDEX, 2008).

Na profilaxia da tuberculose, a INH quando utilizada como droga única, é recomendada a dose de 10 mg/kg ao dia para crianças e até 300 mg/kg para adultos, devendo ser administrada com o estômago vazio, pois os alimentos, provocam uma diminuição na absorção do medicamento em até 57% (ARBEX et al., 2010a; SARKAR; SURESH, 2011). Essa é a dose proposta para o tratamento atual da tuberculose no Brasil em associação com outros fármacos (DYE, 2006; Global tuberculosis report., 2015). Geralmente 20% dos indivíduos apresentam efeitos colaterais ao uso da medicação, alguns dos sintomas são: Náuseas, epigastria; Elevação transitória e assintomática das enzimas hepáticas (o aumento pode ser até três vezes, acima dos níveis séricos normais, da enzima alanina aminotransferase); Artralgia; Alterações de comportamento (cefaleia, insônia, euforia, agitação, ansiedade e sonolência); Psicose (há relatos de tentativa de suicídio com o uso da isoniazida), crise convulsiva, confusão mental e coma; Alterações hematológicas ou vasculite e Lúpus (os pacientes podem desenvolver anticorpos antinucleares durante o uso do fármaco) (SQUIBB; INDEX; INDEX, 2008).

Estudos relatam que apesar das toxicidades apresentadas durante o uso prolongado da INH, sua administração é segura durante a gravidez e no período de amamentação, mas há risco de hepatite no período pós-parto e icterícia ao recém-nascido (SQUIBB; INDEX; INDEX, 2008). A OMS recomenda o uso de piridoxina (25-50 mg/dia) a toda a gestante em uso de isoniazida (ARBEX et al., 2010b).

2.6 Associação de antibióticos com adjuvantes

Os adjuvantes são considerados substâncias que podem potencializar a ação de fármacos melhorando a terapia de várias doenças, dentre elas as infecciosas. Os medicamentos citotóxicos são amplamente utilizados para tratar cânceres e doenças infecciosas, sob certas condições clínicas, mudaram o curso natural de algumas dessas doenças. Embora efetivos, devido ao seu modo de ação intrínseco, podem causar efeitos adversos significativos impedindo a eficácia clínica completa, possivelmente resultando

em um aumento no risco de recaída ou recorrência da doença (BOUCHARD; VISKOV; GARCIA-ECHEVERRIA, 2014).

Os esforços destinados a melhorar a qualidade do tratamento dos pacientes concentraram-se em métodos alternativos para manter a eficácia de fármacos quimioterápicos e minimizar a toxicidade sistêmica. Entre estas abordagens inovadoras, as conjugações de agentes citotóxicos com polímeros ou produtos de fontes naturais começaram a ser utilizados ou estudados (CHAUBEY; MISHRA, 2014).

A utilização de adjuvantes associados a antibióticos oferece uma solução mais eficaz, em longo prazo, para os casos de resistência da micobactéria, através de uma nova via de liberação de fármaco (ALMATAR et al., 2017). Três adjuvantes têm tido destaque nas utilizações clínicas, são eles: os inibidores antissépticos, os agentes naturais derivados de planta ou polímeros, e bacteriófago (BROOKS; BROOKS, 2014).

2.7 Nanosistemas para anti-TB

A nanotecnologia é uma área de ciência no que se refere à concepção de estruturas, chamadas nanoparticuladas (NPs). As NPs podem ser usadas para fins médicos, como nanocarreadores para agentes terapêuticos e de diagnóstico, como forma de encapsulamento, ou adsorção de fármacos (PANDEY; AHMAD, 2011b). A aplicação biomédica de nanopartículas baseado em sistemas de entrega de drogas oferece uma nova perspectiva para o tratamento da tuberculose (MORAIS, 2011; SOSNIK et al., 2010). Estudos demonstraram que a administração de nano-suspensões favorece concentrações mais elevadas nos tecidos, isto poderia melhorar a biodisponibilidade e conseqüentemente uma melhor eficácia do tratamento, sendo apropriado para doenças infecciosas (CHOUDHARY; KUSUM DEVI, 2015; QI et al., 2004).

Os estudos em nanotecnologia vêm sendo bastante estudado para pesquisas e desenvolvimentos de materiais em todas as áreas técnicas. Um dos segmentos da nanotecnologia é a utilização de nanocompósitos com propriedade que vão desde eletro-ótica, aplicações cosméticas e bactericidas (PAUL; ROBESON, 2008).

Os nanocompósitos com matriz polimérica são resultados da combinação de polímeros e materiais inorgânicos/orgânicos em escala do nanométricos que potencializem e/ou melhorem suas propriedades individuais (FELDMAN, 2016). Os nanocompósitos de polímeros naturais podem oferecer inúmeras vantagens para administração de drogas antituberculose. Os produtos de degradação destes polímeros

podem ser seguros para administração por inalação, devido à sua capacidade de aumentar a solubilidade de compostos hidrófobos, como também a liberação sustentada dos fármacos incorporados, aumentando a superfície de contato das partículas e protegendo as drogas da degradação (CIPOLLA et al., 2014).

O tamanho da partícula é uma característica importante para administração de fármacos. Para via inalatória é desejado que a partícula se encontrasse no tamanho entre 50 – 200 nm (Figura 3) para maximizar a localização do fármaco após a administração. O tamanho da partícula também é uma característica importante no alvo passivo de macrófagos, uma vez que afeta o sucesso de internalização dentro dessas células. Neste contexto, as partículas com diâmetros de cerca de 500 nm foram considerados ideais para serem fagocitados pelos macrófagos alveolares (COSTA et al., 2016b).

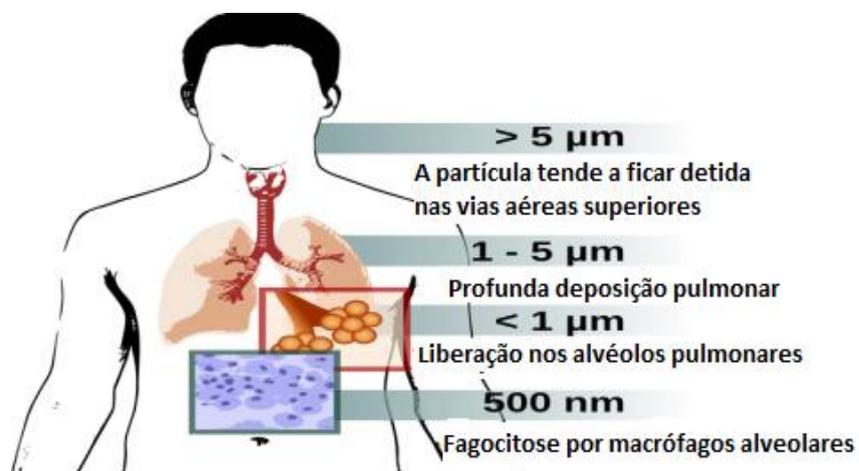


Figura 3. Ilustração da influência do tamanho das partículas na deposição pulmonar e fagocitose pelos macrófagos alveolares. Fonte Costa et al, 2016.

Dessa maneira, nanopartículas poliméricas formuladas com quitosana, como nanoemulções, nanofilmes e nanocompósitos, têm atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades terapêuticas e biológicas, como baixa toxicidade e maior estabilidade durante administração, tornando-as materiais interessantes para aplicações em sistemas de liberação controlada para transporte de fármacos direcionados para a indústria farmacêutica (MATHEW; OKSMAN, 2012; POURSHAHAB et al., 2011; WU et al., 2017).

2.8 Quitosana

A quitosana (QS) é um polissacárido catiônico natural, derivado da desacetilação da quitina (Figura 4), que é composto por unidades β -1,4- D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (ILLUM, 1998). Existem vários derivados da quitosana, os quais podem se diferenciar pelo grau de desacetilação, assim como pela disposição dos grupos N-acetil residuais, na cadeia do polímero (AZEVEDO et al., 2007). Em meio ácido os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênio do meio, resultando em uma carga global positiva no polímero. Esta característica permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente tais como: gorduras, tecido animais ou vegetais, membrana celular, entre outras formas (COSTA; MANSUR, 2008; STAMFORD-ARNAUD, 2012).

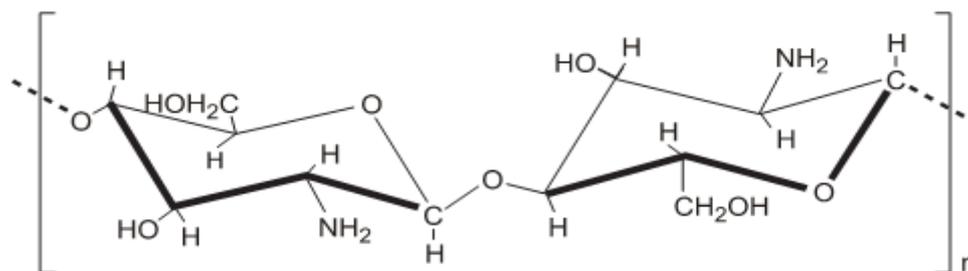


Figura 4. Estrutura molecular da Quitosana. Fonte: AZEVEDO et al., 2007.

A QS pode ser utilizada em soluções, hidrogéis, micropartículas e nanopartículas devido à sua versatilidade única. A QS é amplamente utilizada em sistemas de liberação controlada de proteínas, fármacos, vacinas e enzimas, devido às suas excelentes características mucoadesivas, que prolongam o tempo no local de absorção (HEJAZI; AMIJI, 2003; XIA et al., 2015; XU; DU, 2003). Tendo um amplo espectro antimicrobiano, a quitina e a quitosana foram estudadas, *in vivo* e *in vitro*, como um biopolímero antimicrobiano contra uma ampla gama de microrganismos como fungos e bactérias gram positivas e negativas, na forma de compósitos, filmes e soluções (DU et al., 2009; WANG et al., 2017).

Em diversos estudos a quitosana é considerada como bactericida e bacteriostática, (HU et al., 2017; MUZAFFAR et al., 2017a). Vários modelos foram propostos para ação antibacteriana da QS entre os quais os modelos mais aceitos são: 1. A penetração da QS oligomérica nas células dos microrganismos e inibindo o crescimento celular (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; QI et al., 2004); 2. As interações eletrostáticas entre a carga positiva do grupo amino na molécula da QS (em pH <6,3; ao

valor de pKa da quitosana) e cargas negativas sobre a superfície das células bacterianas. Essas consequências da interação eletrostática promovem alterações de permeabilidade da parede bacteriana: a ligação da QS catiônica ao ácido sálico presente em fosfolípidios e subsequentemente a restrição da passagem de substâncias microbianas, promovendo assim os desequilíbrios osmóticos internos, e inibição do crescimento de microrganismos (WU et al., 2017; YILMAZ ATAY; ÇELIK, 2017).

A QS de baixo peso molecular, em alguns estudos demonstrou atividade antimicrobiana (WANG et al., 2017). Nas bactérias *E.coli*, o grupamento químico NH₂ da QS sob as moléculas da parede celular podem causar uma ruptura levando à saída de materiais intracelulares das bactérias, acelerando consequentemente a morte celular bacteriana (MUZAFFAR et al., 2017b).

A quitosana vem sendo extensivamente estudada devido às suas propriedades peculiares que lhe conferem um aproveitamento bastante versátil, tais como: regeneração de tecidos epiteliais e confecção de membranas artificiais (ANGADI; MANJESHWAR; AMINABHAVI, 2010; COSTA; MANSUR, 2008); absorção de gordura e redução do colesterol sérico (AZEVEDO et al., 2007); componente de cosméticos (SALA et al., 2016; SCHMITT et al., 2010a); antibacteriana (MOHAMMADI; HASHEMI; MASOUD HOSSEINI, 2016; QI et al., 2004; WU et al., 2017; YILMAZ ATAY; ÇELIK, 2017); baixa toxicidade e redução da carga de toxicidade de drogas (GARG; RATH; GOYAL, 2015; SANTHOSH et al., 2006; VAVŘÍKOVÁ et al., 2011b); mucoadesividade (BIVAS-BENITA et al., 2004), anticancerígena (YANG et al., 2008); antifúngica (WANG et al., 2017) e antiviral (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006; XIA et al., 2015).

Além dessas propriedades citadas anteriormente, a de quitosana interage com os receptores de manose da membrana dos Macrófagos, o que resulta na fagocitose das partículas de quitosana e seus derivados, fato importante para o tratamento da tuberculose (PARK et al., 2013a). Dessa forma, nanopartículas de QS com ação antimicrobiana, podem ser utilizados como adjuntos aos antibióticos de amplo espectro (ZHU et al., 2007).

Nos últimos anos têm aumentado exponencialmente o número de pesquisas realizadas focando novas aplicações da QS, principalmente no que diz respeito ao mundo nano. Isto se deve ao fato de que os materiais nestas dimensões (nano) apresentam novas propriedades e consequentemente, novas aplicações (MANIVASAGAN; OH, 2016). Estudos realizados com em QS, demonstraram que a

utilização de nanopartículas de quitosana podem ser utilizadas como uma abordagem para terapia de doenças pulmonares, como TB (BEREZIN; SKORIK, 2015b; CIPOLLA et al., 2014; GARG; RATH; GOYAL, 2015).

Um estudo realizado por Pourshahab et al. (2011), foi utilizado NPs de quitosana e tri-poli fosfato como nanocarreadores para INH conseguindo uma eficiência de carregamento da droga de 17%. Em outro estudo realizado por Garg et al. (2015), foram desenvolvidas NPs de quitosana para liberação controlada de INH e RIF, com eficiência de encapsulação de fármaco de 69%. Adicionalmente, estas formulações mostraram uma menor citotoxicidade e redução significativa do número de bacilos nos pulmões, em comparação com a droga livre (GARG; RATH; GOYAL, 2015). Estes achados sugerem que a quitosana é uma plataforma potencial para o tratamento pulmonar da TB e desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos intracelulares (KUSONWIRIYAWONG et al., 2013a; PARK et al., 2013a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia na utilização da quitosana (QS) como adjuvante aos antibióticos antituberculose de primeira linha (Isoniazida e Etambutol), nas formas de nanocompósitos através de estudos de atividades biológicas *in vitro* contra a *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Desenvolver nanocompósitos de quitosana associada às drogas Isoniazida/Etambutol;

3.2.2 Avaliar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos nanocompósitos de quitosana associada às drogas Isoniazida e Etambutol contra a cepa de referência ATCC (H37Rv) e a cepa clínica multidroga resistente (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis*;

3.2.3 Determinar a atividade citotóxica (IC50) e o efeito citoprotetor da QS em macrófagos com a droga isolada e os nanocompósitos;

3.2.4 Caracterizar os nanocompósitos de quitosana associada às drogas Isoniazida/Etambutol por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espalhamento de Luz Dinâmico, Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho, Análise Termogravimétrica, Fotoluminescência e Microscopia de Confocal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A quitosana de baixo peso molecular (50 a 190 Da; 75-85% desatilada) foi adquirida da Sigma-Aldrich Brasil. As drogas antituberculose Isoniazida e Etambutol (ambos com grau de pureza de $\geq 99\%$) foram cedidas pelo laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (CPqAM/Fiocruz), também adquirida da Sigma-Aldrich Co. Os demais reagentes são de grau analítico, do acervo próprio do nosso Laboratório de Tecnologia Biopolímero (Departamento de Histologia e Embriologia) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do laboratório BSTR (Dep. De Química Fundamental) da UFPE.

4.2 Purificação e Despolimerização da Quitosana

Para a purificação foi utilizada uma solução de QS de baixo peso molecular a 0,3%, em ácido acético a 1% em agitação magnética, durante 1 hora. Essa solução foi filtrada com pré-filtro e em seguida com filtro 3,0 μm . Após as filtrações, a QS precipitada com NaOH a 40% para ajustar em pH 8. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, seguido por três lavagens com água destilada, etanol absoluto e éter, entre cada lavagem, a QS foi separada por centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos. O precipitado obtido após a purificação foi posto para secar em estufar na temperatura de 37 °C.

A QS purificada e seca foi posteriormente despolimerizada, segundo a metodologia de Janes et al., 2003, com algumas modificações. Para a despolimerização, a QS purificada foi dissolvida em ácido acético a 1%. Após total solubilização da QS, foi adicionada uma solução de NaNO_2 a 0,1M para concentração final 10 mg/mL e mantida por agitação por 3 horas, depois a solução foi filtrada no filtro de 0,8 μm . O pH da solução foi ajustado com solução de NaOH a 40% até atingir pH 8. A solução foi filtrada novamente no filtro de 0,8 μm e posteriormente foram realizadas três lavagens com água ultrapura e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. O precipitado obtido foi secado em temperatura ambiente (JANES; ALONSO, 2003).

4.3 Preparação dos Compósitos

As soluções de INH e EMB foram preparados separadamente em água ultrapura para uma concentração final de 2046 µg/ml, pH final 7, sob agitação por 5 minutos. A solução de QS despolimerizada foi dissolvida em ácido acético a 1%, pH final de 4,5 na concentração de 2046 µg/ml. Os compósitos foram preparados nas proporções quitosana/droga de 1:1 e 2:1 (p/p), e deixados em agitação por 24h a 23 °C, com pH final de 6. Logo em seguida os compósitos foram congelados em temperatura de - 80 °C e posteriormente liofilizados.

4.4 Atividade Biológica

4.4.1 Atividade Antimicrobiana

Uma solução com 4.320 µg/ml de quitosana despolimerizada em ácido acético a 0,25% com uma agitação constante de 500 rpm durante 1 min, e foi utilizado uma alíquota para adição no primeiro poço da placa, onde contem diluição com 100µl do meio 7H9 ficando na concentração final de 1080 µg/ml.

Os compostos EMB, INH, QS/EMB 1:1, QS/EMB 2:1, QS/INH 1:1 e QS/INH 2:1, foram preparadas em uma solução mãe de 1 mg/ml em PBS, pH 7,2, separadamente e agitados por 1 min no vótex.

O EMB possui uma CMI conhecido na literatura de 2 µg/ml (MARTIN; PALOMINO, 2012), essa CMI também foi utilizada como base para os compósitos. Como são feitos diluições anteriormente com o meio, a concentração cai 4 vezes, sendo assim, para atingir uma CMI de 2 µg/ml o primeiro poço da placa iniciou com 8 µg/ml, tanto para a droga isolada como para os compósitos QS/EMB 1:1 e QS/EMB 2:1 (4µg/4µg/ml na proporção 1:1 e 8µg/4µg/ml na proporção 2:1 de cada componente). Usando o mesmo raciocínio anterior, o primeiro iniciou na concentração de 4 vezes maior, ou seja, 32 µg/ml da droga EMB isolada e dos compósitos QS/EMB 1:1 e QS/EMB 2:1. Então na placa vamos ter 32 µl do da solução mãe de 1mg/ml + 968 µl do meio 7H9 (Figura 5).

Já para INH temos uma CMI de 1 µg/ml (VAVŘÍKOVÁ et al., 2011), para os compósitos QS/INH 1:1 (2µg/2µg/ml) e QS/INH 2:1 (4µg/2µg/ml). Novamente segundo o mesmo protocolo das diluições anteriores vamos ter no primeiro poço 24µg/ml da INH isolada e dos compósitos QS/INH 1:1 e QS/INH 2:1. Também foram

utilizados controles de Ácido Acético a 0,25%, PBS e água ultrapura na realização do experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		µg/ml	µg/ml	µg/ml								
B		1080	540	270	135	67,5	13,5	6,75	3,37	1,68		
C		1080	540	270	135	67,5	13,5	6,75	3,37	1,68		
D		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,01562		
E		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,01562		
F		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125		
G		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125		
H												

Figura 5. Esquema para teste das Microdiluições em placa de 96 poços. O número de poços e placas foram reduzidos na ilustração apenas por questões didáticas.

Legenda:

	Água		Controle + (inóculo)
	Quitosana		Controle - (apenas o meio 7H9)
	QS/INH ou INH		Controles (Ác. Acético a 0,25%, PBS e H ₂ O)
	QS/EMB ou EMB		

A atividade antimicobacteriana dos compostos isolados e os compósitos nas cepas de referência ATCC H37Rv e cepa clínica multidroga resistente MDR-1576 da *Mycobacterium tuberculosis*, foi determinado pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços de acordo com o protocolo descrito por Palomino et al., 2002. As diluições seriadas das drogas isoladas e dos compósitos na microplaca foram realizadas da seguinte forma: 100 µL de caldo 7H9-S + 100 µL das drogas diluídas, variando as concentrações na placa de 1080 - 0,125 µg / mL. Posteriormente, um volume de 100µL do inóculo da cepa de referência ATCC H37Rv e cepa MDR-1576 padronizado na escala de McFarland nº 1 foi adicionado em todos os poços, exceto nos poços para controle de esterilidade do meio. As placas foram incubadas a 37 °C de 7 a 10 dias, em atmosfera normal.

Após o período de incubação, foi adicionado aos poços 30 µL da solução estéril de Resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% e reincubadas por 24h, a 37 °C, em atmosfera normal. A mudança da coloração, azul para rosa, indicará o crescimento do bacilo e, portanto, a ausência de atividade antituberculose da molécula em uma determinada concentração. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração da droga que impedirá a mudança de coloração, ou seja, as que não sofreram uma oxirredução.

Os testes foram realizados em triplicata e desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) e realizados no Laboratório Nível de Biossegurança 3 (NB-3) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/Fiocruz).

4.4.2 Avaliação *in vitro* da Citotoxicidade

A atividade citotóxica dos compostos isolados e compósitos foram realizadas através do método de MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983) no Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. A linhagem celular utilizada foi RAW 264.7, mantidos em meio de cultura DMEM com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. As células RAW 264.7 (10⁵ células / mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 48h.

Em seguida as amostras dissolvidas em água ultrapura para a droga isolada e para os compósitos, em ácido acético a 0,25% a QS, foram adicionadas aos poços com concentrações de 1000 – 31,25 µg/mL. A água ultrapura e o ácido acético a 0,25% utilizados para dissolver as amostras foram utilizados isoladamente como controle negativo. Após 72h de reincubação, foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg / mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado em cada poço. A absorbância dos resultados foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicada e a concentração inibitória 50% (IC50) foi calculada a partir da curva concentração-resposta de cada composto, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

Para testar a suposição de homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Bartlett. Para avaliação a diferença entre as medianas utilizou-se os testes estatísticos Kruskal-Wallis e como post hoc Mann-Whitney.

4.4.3 Cálculo do índice de seletividade

A partir dos valores de citotoxicidade e CMI, foi calculado o Índice de Seletividade dos compostos ($IS = IC_{50}/CMI$), valor utilizado para estimar a janela terapêutica de fármacos e identificar candidatos a fármacos para estudos adicionais. Os compostos com maiores valores de IS foram selecionados para seguimento dos estudos.

4.5 Caracterizações morfológica e físico-química

4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As características morfológicas dos compostos foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram montadas em bases de alumínio fitas de carbono e revestidas de ouro por um equipamento de crepitação por 240s, e posteriormente foram observadas usando o MEV JSM-5600L V (JEOL, Japão) a uma voltagem de aceleração de 15 kV. Em todas as medições com pelo menos, 100 partículas em cinco campos diferentes foram examinadas.

4.5.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas DLS foram realizadas no Laboratório de Nanopartículas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). As análises foram realizadas em temperatura ambiente, no equipamento Zetatracc (Microtac), com capacidade de distinção de tamanho no intervalo de 0,8 a 6500 nm, diodo de laser com comprimento de onda de 780 nm e 3 mW de potência. As medidas para análise foram obtidas em soluções aquosas, as quais as amostras em estado sólido foram suspensas em PBS, pH 7,2.

4.5.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para as análises de RMN, as amostras de QS, EMB e o compósito QS/EMB 1:1 foram utilizados 30 mg da amostra adicionados de 600 μ L de D₂O, também em tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Para aquisição do espectro da quitosana, houve adição de 1 gota de ácido clorídrico P.A, para fins de dissolução (pH = 6,0). Os sinais do espectro foram referenciados a partir do sinal atribuído aos hidrogênios da água (δ 4,70 ppm). Foram obtidos espectros utilizando espectrômetro Varian Unity Plus 300, operando a 299,95 MHz, para o núcleo de ¹H. As sequências de pulsos de RF utilizadas foram a PRESAT, para o compósito, com janela espectral 4,8 kHz, tempo de pressaturação igual a 2 s, tempo de aquisição igual a 1,704 s, pulso de RF de 45°, 32 repetições e temperatura de 25°C. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 0,3 Hz.

4.5.4 Fotoluminescência

As propriedades fotoluminescentes (espectros de excitação e emissão, e tempo de vida) dos compostos estudados neste trabalho foram realizadas em um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon, modelo Fluorolog-3 ISA. O aparelho é equipado com monocromador duplo de excitação e de emissão, modelo FL-1039/40. Os dados foram coletados em um ângulo de 90°, em relação ao feixe de emissão. A medida de emissão foi realizada em amostras sólidas em temperatura/pressão ambiente, foram excitados em 357 nm, 465 nm e 470 nm respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório BSTR do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5.5 Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF)

Foi utilizado MFC, LEICA modelo TCS-SP5 AOBS, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Microscopia, do Dep. de Tecnologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. O MFC é equipamento com vários lases com amplitude de 405 nm a 633 nm. Nesse trabalho, as amostras secas foram fixadas com óleo de imersão em lâminas e lamínula para serem analisadas, foi empregada a linha 405 nm de diodo para excitar as amostras isoladas e os compósitos, e posteriormente analisada em 488 nm, 543 nm e 633 nm. As imagens foram obtidas usando uma objetiva com magnitude de 60x e depois de capturadas editada com o auxílio do software LAS-AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence).

4.5.6 Espectro Infravermelho com Transmissão de Fourier (FTIR)

A caracterização das interações químicas dos compostos isolados e compósitos foram realizadas através do método de Espectro infravermelho com transmissão de *Fourier* (FTIR). O perfil espectrofotométrico dos compostos isolados e os compósitos foram obtidos a partir da técnica do espectrômetro Agilent 630 com comprimento de onda entre 4000 e 750 cm^{-1} . As amostras em estado sólido foram prensadas contra um cristal de diamante usando uma braçadeira de pressão anexada ao aparelho seguida de leitura e registro. Os espectros de FTIR foram adquiridos em menos de 30 segundos e foram comparadas as amostras de referências em sua biblioteca. As análises de FTIR foram realizadas no Laboratório de Biofísica do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) dos compostos isolados e compósitos foram realizadas através do equipamento DTG-60H, fabricado pela Shimadzu com os parâmetros da análise no intervalo de 10 °C por minuto em atmosfera de nitrogênio. As amostras contendo 8 - 10 mg de cada composto foram colocadas em recipientes de alumínio, fluxo de 20 ml/min e aquecidas entre 30 °C à 750 °C, em uma razão de aquecimento de 10 °C/min. As análises TGA foram realizadas no Laboratório Central do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

5 RESULTADOS

5.1 Atividades Biológicas

5.1.1 Atividade antimicobacteriana dos compostos QS, INH e EMB e os compósitos QS/INH e QS/EMB

As drogas isoladas INH e EMB apresentaram atividade antimicobacteriana na cepa de referência H₃₇Rv de acordo com a concentração mínima inibitória (CMI) estabelecido pela literatura (DAHL, 2004; DIXIT et al., 2012; KUMAR et al., 2005). Na cepa clínica MDR-1576 testada, as drogas INH e o EMB apresentaram CMI padrão de resistência de acordo com outros autores (SLAVCHEV; MICHAILOVA; MARKOVA, 2016) (Tabela 1). A QS isolada apresentou uma CMI ≥ 1080 $\mu\text{g/mL}$ tanto na cepa de referência (H₃₇Rv) quanto na MDR-1576, representando uma não atividade para *M. tuberculosis* (Tabela 1).

O compósito QS/INH 1:1 apresentou CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$, 16 vezes maior que o CMI padrão da droga INH isolada (0,25 $\mu\text{g/mL}$) na cepa H₃₇Rv, enquanto que na proporção QS/INH 2:1 não foi observada atividade. Os compósitos QS/INH nas duas proporções testadas não exibiram atividade antimicobacteriana para a cepa clínica MDR-1576 (Tabela 1).

Devido aos resultados apresentados dos compósitos QS/INH não terem apresentado um CMI satisfatório quando comparado com o controle da INH isolada, bem como ausência de atividade, então os compósitos foram excluídos da continuidade desse estudo, pois o objetivo principal desse trabalho foi a diminuição do CMI pela associação da Quitosana com as drogas isoladas.

O compósito QS/EMB 1:1 apresentou CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$, 50% menor quando comparado ao CMI do EMB isolado na cepa H₃₇Rv. Na cepa MDR-1576 o QS/EMB 1:1 apresentou CMI semelhante ao EMB isolado, salientando que o compósito QS/EMB 1:1, salientando que o compósito QS/EMB 1:1 possui a metade da quantidade de EMB na sua composição para obter o mesmo resultado. O compósito QS/EMB na proporção 2:1 não obteve resultados na CMI e ausência de atividade antimicobacteriana contra as duas cepas testadas. O compósito QS/EMB 1:1 apresentou o melhor resultado na avaliação antibacteriana e por isso será dado continuidade na pesquisa de citotoxicidade, caracterização físico-química e morfológica.

5.1.2 Atividade citotóxica

A QS apresentou uma toxicidade celular de 419 µg/mL, sendo sua IC50 57% maior quando comparado com o EMB isolado e 33% maior que o compósito QS/EMB 1:1, sugerindo uma baixa toxicidade em macrófagos (Tabela 1).

O EMB e o compósito QS/EMB 1:1 apresentaram uma IC50 de 176 e 279µg/mL, respectivamente, onde foi observado um aumento de 35% da IC50 em relação a droga EMB. Na citotoxicidade do QS/EMB 1:1 foi observada uma IC50 maior quando comparado com EMB isolado, contudo sem diferença estatística significativa ($p = 0,25$) (Figura 6). O índice de seletividade (IS) do compósito QS/EMB 1:1, foi maior que os compostos isolados (Tabela 1), ou seja, o compósito QS/EMB 1:1 é mais seletivo em 68% que o EMB isolado.

Tabela 1. Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e toxicidade celular (IC50) em linhagem RAW 264.7 dos compostos INH e EMB isolados e associados à quitosana em cepas ATCC (H37Rv) e cepa clínica MDR - 1576 da *M. tuberculosis*.

Compostos	CMI (µg/mL)		IC50 (µg/mL)	IS ^d
	ATCC HRv37 ^a	MDR ^b -1576 ^c	RAW 264.7	
QS	≥ 1080	≥ 1080	419,3	0,38
INH	≤ 0,25	≤ 1	N/D	N/D
EMB	≤ 2	≤ 16	176,6	88,3
QS/INH 1:1	≥ 4	≥ 8	N/D	N/D
QS/INH 2:1	≥ 6	≥ 12	N/D	N/D
QS/EMB 1:1	≤ 1	≤ 16	279,3	279,3
QS/EMB 2:1	≥ 12	≥ 24	N/D	N/D

^a Cepa padrão de referência.

^b Cepa clínica resistente a Streptomina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol.

^c N° de identificação fornecido pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN).

^d Índice de seletividade (IS), é a razão entre a IC50 e o CMI (NAKAMURA et al., 2006).

N/D - Não determinado.

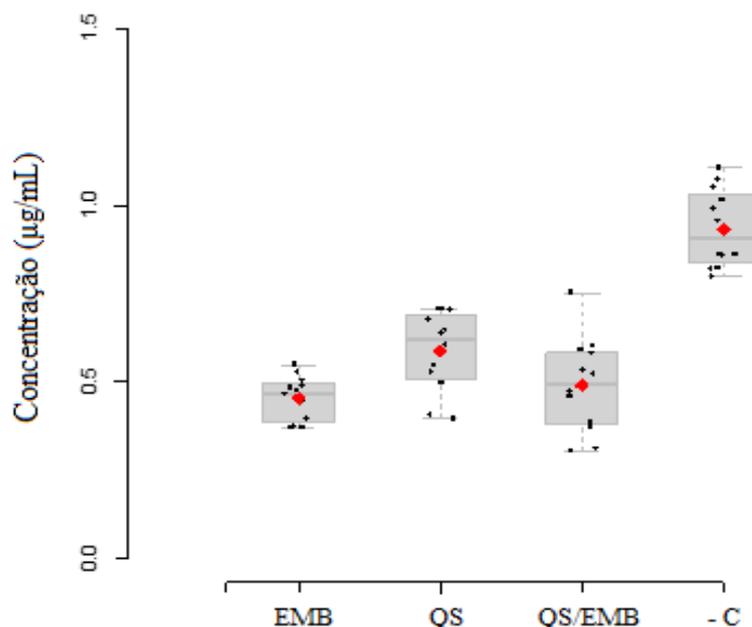


Figura 6. Efeito da citotoxicidade dos compostos ethambutol (EMB), quitosana (QS), o compósito (QS/EMB 1:1) e o controle negativo (C-) em macrófagos *RAW 264.7*. Cada barra representa a média \pm erro padrão dos resultados de citotoxicidade, a partir de três experimentos independentes em comparação com células não tratadas (viabilidade 100%).

5.2 Caracterização morfológica e físico-química

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar a morfologia dos compostos. A QS despolimerizada apresentou morfologia com superfícies descontínuas (Figura 7 – A e B) que são normalmente observadas em materiais amorfos. Na Eletromicrografia do EMB (Figura 7 – C e D) observam-se partículas com formas de bastão, o que é comum em substâncias cristalinas. O compósito QS/EMB 1:1 apresentou uma superfície com estruturas irregulares (Figura 7 – E, F).

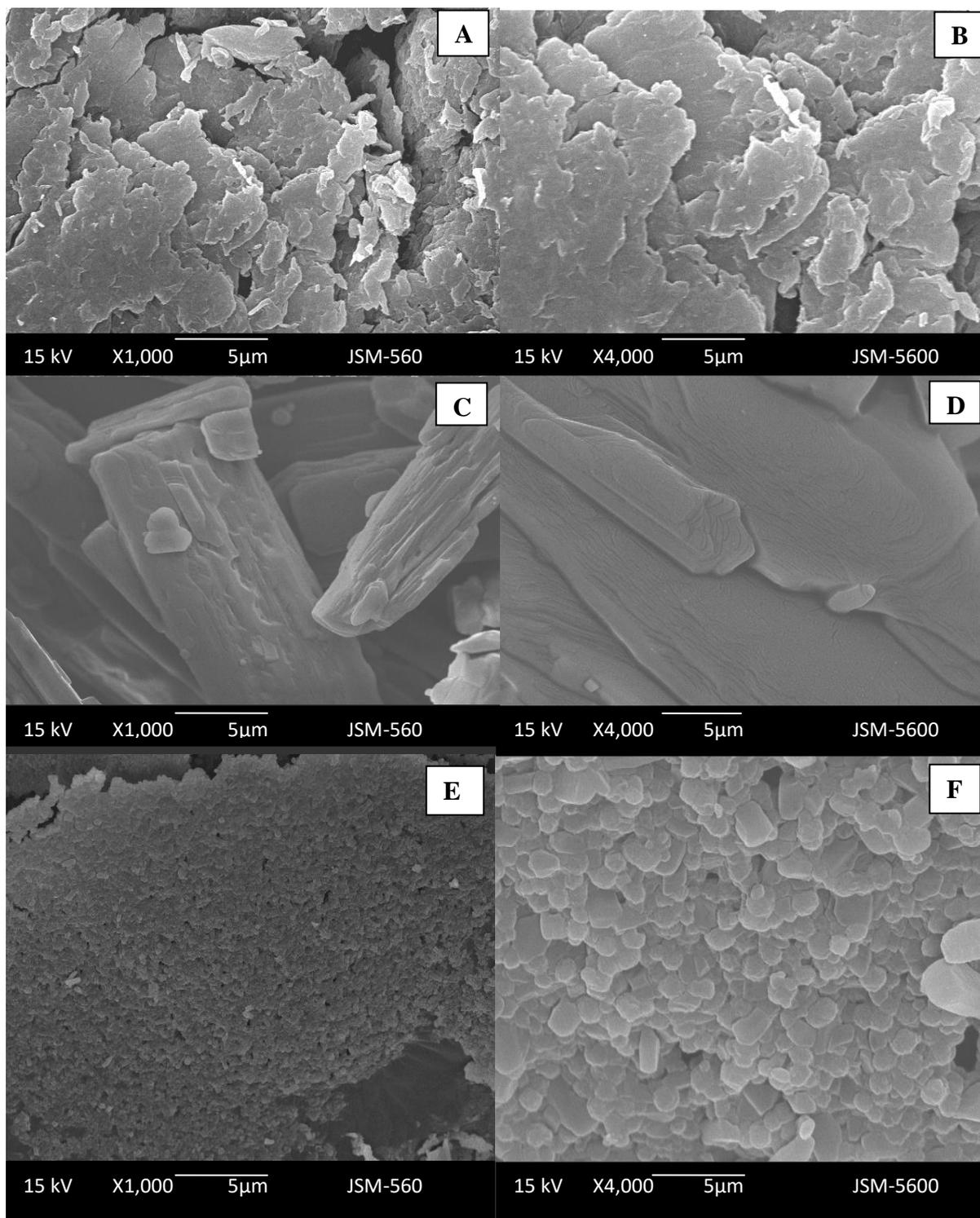
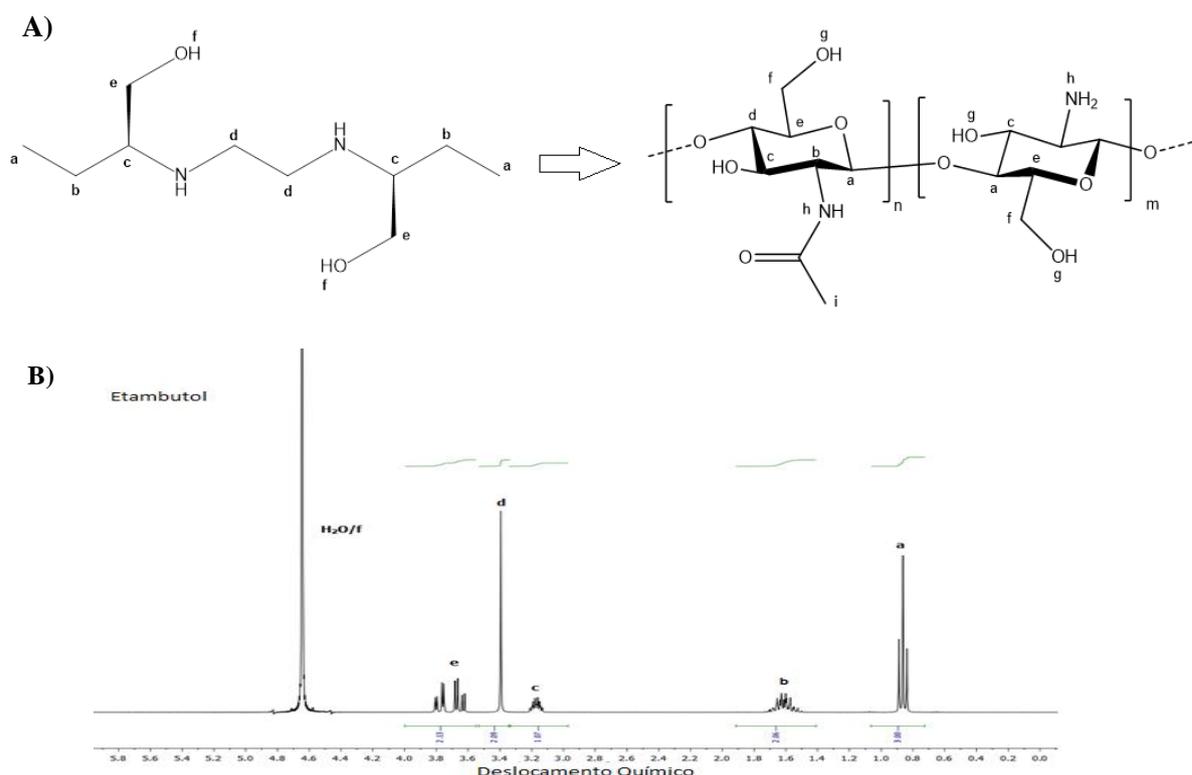


Figura 7. Eletromicrografia de varredura das partículas de QS (A-B), da droga EMB (C-D) e do composto QS/EMB 1:1 (E-F), nos aumentos de 1.000x – 4.000x respectivamente.

Nos resultados obtidos através do DLS, observar-se que o diâmetro médio das partículas em suspensão do composto QS/EMB 1:1 apresentou um tamanho médio de ~143 nm e o índice de polidispersidade (PDI) de 0,037, dessa forma temos uma estrutura nanoparticulado.

5.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A figura 8 mostra o espectro de RMN de ^1H com a formulação do nanocompósito QS/EMB 1:1 em massa (p/p) da quitosana e o fármaco etambutol, no qual se pode observar os sinais típicos dos componentes da formulação, além de dois sinais “novos”, nas regiões de 1,80 ppm e 3,30 ppm, respectivamente. Estes sinais podem estar relacionados com as prováveis interações supramoleculares que foram geradas entre o EMB e a QS. Em um teste utilizando esta formulação em diferentes meios, constatou-se que ao usá-lo em um pH ácido, 1,0 – 3,0, os sinais oriundos da interação desaparecem, restando apenas em seu espectro de RMN, os sinais relacionados aos componentes individuais. O mesmo comportamento fora observado em pH básicos, 9,0-10. Em pH, na faixa de 6,5-7,5, a formulação manteve-se estável, mostrando que a interação associada a esta estrutura é pouco resistente a variações bruscas de pH.



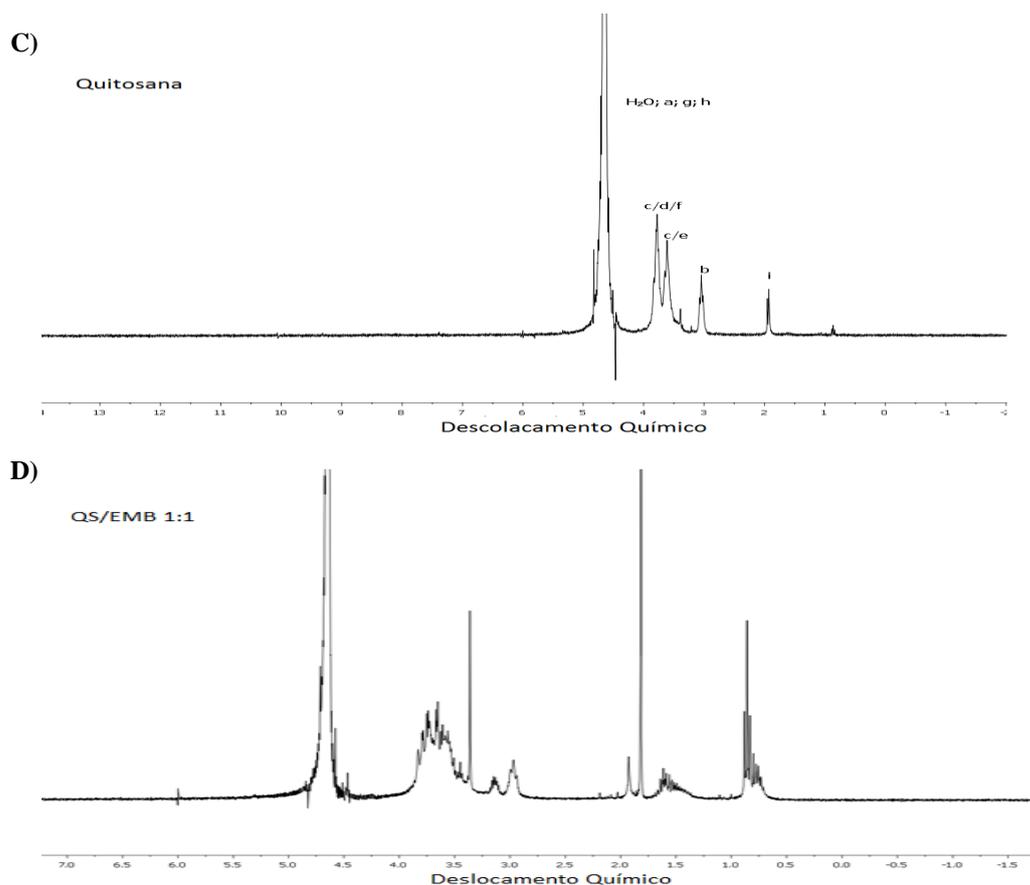


Figura 8. Ilustração da formulação química do nanocompósito QS/EMB 1:1 (A) com os espectros de RMN do Etambutol – EMB (B), da Quitosana de baixo peso molecular despolimerizada – QS (C) e o do nanocompósito QS/EMB 1:1 (D).

5.2.3 Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) e Fotoluminescência

Os compostos QS, EMB e QS/EMB 1:1 foram estudados quanto a sua fotosensibilidade no Microscópio Confocal e no fluorímetro. O espectro de emissão da QS (Figura 9 – A; linha azul) fixado em $\lambda_{exc} = 357$ nm, apresentou uma banda larga na região entre 350 – 650 nm, com o máximo em 448 nm na região do azul, que está relacionado com os espectros de fluorescência descritas na literatura para a QS (CUI et al., 2011; XUE-YIN et al., 1998). O EMB não apresentou fluorescência nos espectros de emissão testados.

O nanocompósito QS/EMB 1:1, apresentou um espectro de emissão da QS compreendido entre 480 – 750 nm observando um comprimento de onda máximo 589 nm, utilizando $\lambda_{ex} = 470$ nm (Figura 9 – A; linha vermelha), com uma intensa de emissão na região do vermelho. Os perfis de emissão do nanocompósito exibem uma variação entre os máximos com um deslocamento no comprimento de onda de $\Delta\lambda = 145$ nm para QS e $\Delta\lambda = 127$ nm para EMB, sugerindo uma interação entre o QS e o EMB.

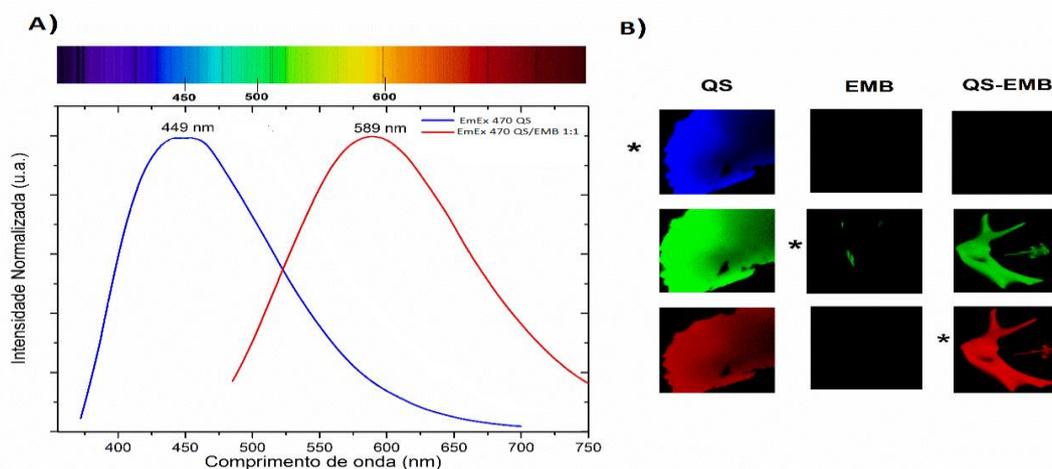


Figura 9. A) Perfil de emissão da QS, do EMB e do nanocompósito QS/EMB 1:1, excitando em 357 nm, 465 nm e 470 nm respectivamente. B) Imagem de Microscopia Confocal de Fluorescência do QS, EMB e QS/EMB excitando nas mesmas regiões do perfil de emissão. (*) Corresponde a maior absorção de energia, representada no gráfico.

As observações da luminescência na Microscopia Confocal (Figura 9 – B) dos compostos QS e QS/EMB 1:1 corroboraram com a de fotoluminescência apresentados pelas soluções dos componentes individuais onde entre os materiais isolados, apenas a QS possui luminescência natural. Contudo, verifica-se uma luminescência nas cores vermelho e verdes no nanocompósito QS/EMB 1:1, provavelmente devido a interação físico-química da quitosana com a droga etambutol isolada confirmadas nos resultados do RMN, já que a droga não possui luminescência isolada.

5.2.3 Espectro infravermelho com transmissão de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos compostos QS, EMB e QS/EMB 1:1 são apresentados na Figura 10. O espectro de infravermelho da QS despolimerizada mostrou bandas largas de absorção a 3362 cm^{-1} correspondendo a OH. Além da banda 1678 cm^{-1} do grupamento NH com associação polimérica das amins alifáticas da banda observada em 2903 cm^{-1} , que representa a presença de estiramento de vibrações alifáticas C-H. Três bandas que aparecem em 1712 , 1565 e 1454 cm^{-1} são atribuídos à amida-I, amida-II e amida-III (Figura 10 - linhas vermelhas e pretas tracejadas), respectivamente de acordo com a literatura (LUO et al., 2015).

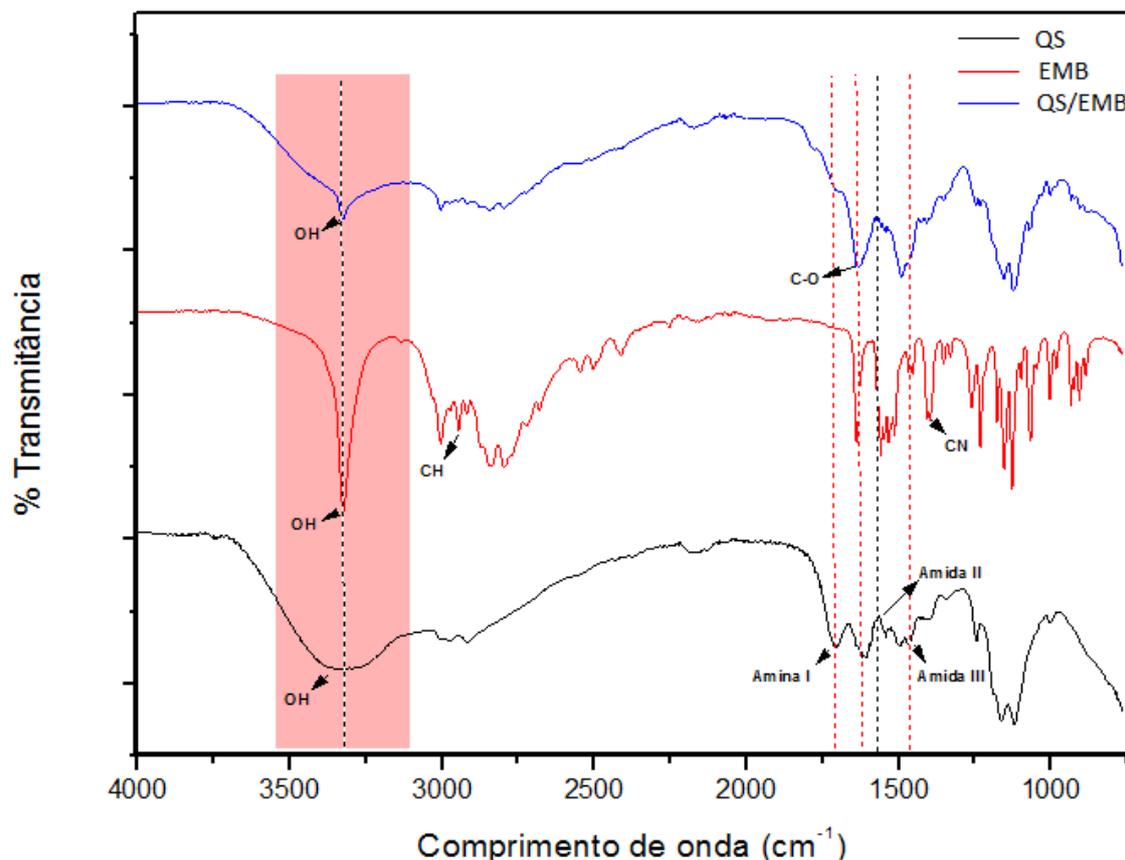


Figura 10. Espectro de FTIR da quitosana despolimerizada (QS), etambutol isolado (EMB), e o nanocompósito QS/EMB respectivamente.

O espectro FTIR do EMB mostrou uma ligação forte de O-H com alongamento em 3320 cm^{-1} (Figura 10 - região destacada com linha branca tracejada), devido à sua natureza cristalina, N-H alongado em 2225 cm^{-1} , um alongamento C-N em 1280 cm^{-1} , além de um C-H com vibração em 2926 cm^{-1} , resultados semelhantes foram encontrados por Ahmad et al., 2014 em seus estudos. O espectro da formulação QS/EMB 1:1 apresentou o alongamento N-H do EMB em 3265 cm^{-1} e o alongamento C-O da quitosana em 1609 cm^{-1} . O FTIR do nanocompósito mostrou que as ligações C-O e O-H, deslocaram-se para um valor inferior (Figura 10 - região destacada com linha branca tracejada), o que indica uma interação entre a quitosana e a droga.

5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas dos compostos QS, EMB e QS/EMB 1:1, revelaram perfis diferentes, característicos das substâncias isolados já referidas na literatura (Figura 11). O EMB apresentou uma estabilidade até 227 °C , ocorrendo uma sublimação, perdendo sua massa em seguida nessa temperatura (ELSEVIER LTD., 2008). O perfil da QS, mostrou dois eventos importantes de perda de massa, o primeiro

em 30 °C até 231 °C, podendo ser atribuídas a evaporação da água e início da decomposição do QS, na temperatura a acima de 231 °C a uma perda de 22 % da massa. Pode ser aferido também a decomposição do QS, acima de 300 °C até 527 °C onde foi decomposto 19 % da massa (Figura 11).

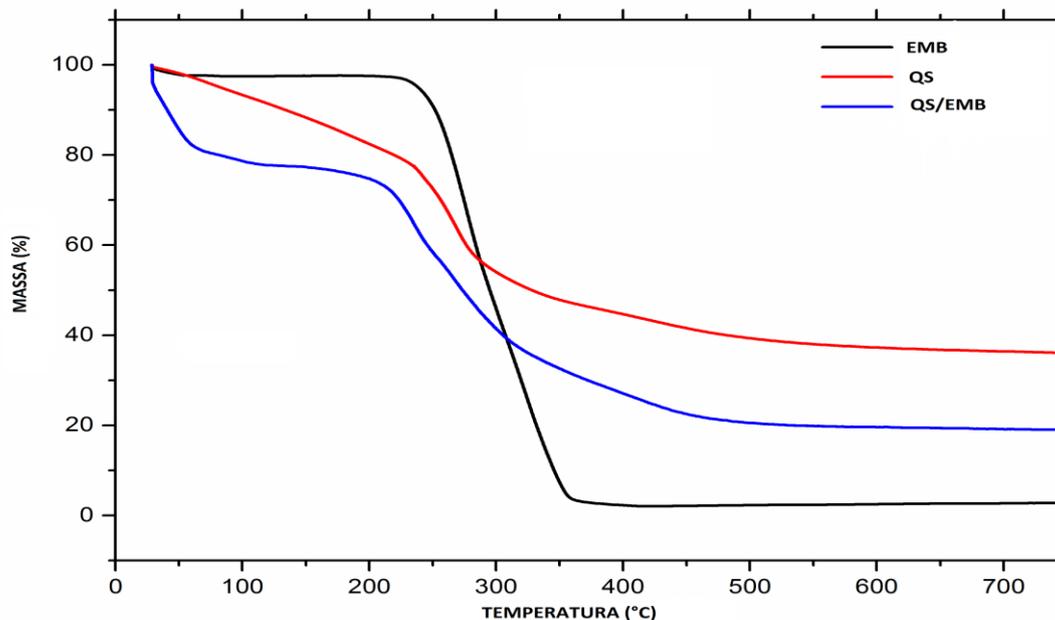


Figura 11. Análise termogravimétrica da QS, EMB, e do nanocompósito QS/EMB respectivamente, em atmosfera de nitrogênio no intervalo de 10°/min.

O nanocompósito QS/EMB 1:1, revelou perfis atribuídos a QS e EMB, nas primeiras temperatura até 123 °C, na qual, apresentou decomposição de 23 % em massa, esse evento é atribuído ao mesmo perfil da QS, devido a perda de água e a decomposição da QS, em 207 °C que ocorre o início da decomposição do EMB. As observações anteriores não foram visualizadas no perfil termogravimétrico do EMB isolado, sugerindo que no nanocompósito a droga isolada se decompõe juntamente com a QS, havendo uma massa residual de 19% da massa atribuído aos produtos da decomposição da QS mencionado anteriormente, confirmando novamente uma interação entre os compostos (Figura 11).

6 DISCUSSÃO

A tuberculose continua a ser a principal causa de mortes por doenças infecciosas em todo o mundo. Um dos principais fatores para esse problema é a terapia sem sucesso em muitos casos, principalmente devido ao não cumprimento total do tratamento, que é prolongado e muitas vezes associados a efeitos colaterais graves (DHEDA et al., 2017). A pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações e fármacos para o tratamento da TB são considerados urgentes, visto que há necessidade de medicamentos mais efetivos contra a micobactéria, liberação do medicamento de forma direta e sustentada, e possibilitando tratamentos mais acessíveis (GROSSET; SINGER; BISHAI, 2012; HOAGLAND et al., 2016; SOSNIK et al., 2010).

Os polímeros naturais associados aos antibióticos tradicionais utilizados na terapia da tuberculose são candidatos fortes como materiais para formação de nanocompósitos antituberculose, por possuírem propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, potencial antibacteriano, não tóxico e algumas vantagens tecnológicas em comparação com os compostos sintéticos atuais. Dessa forma, podem prevenir o desenvolvimento de resistência antimicobacteriana, resistentes a múltiplos fármacos (MDR) e com baixa toxicidade ao paciente (FELDMAN, 2016; MATHEW; OKSMAN, 2012).

Estudos realizados por Palomino (2002) com *M. avium*, descreveram que a QS seria um polímero natural promissor para o tratamento de micobactérias, onde foi observado um CMI de 540 µg/mL. De acordo com outros pesquisadores (DU et al., 2009), atividade antibacteriana da QS deve-se a carga positiva da mesma que pode ligar-se a superfície das células bacterianas, que estão carregadas negativamente e assim causar uma perturbação nas funções normais da membrana, por exemplo, por promover a fuga de componentes intracelulares ou inibição do transporte de nutrientes da célula. Contudo, em nossos experimentos com a quitosana não apresentou ação antimicobacteriana frente ao *M. tuberculosis*.

Assim como a QS, a Isoniazida e o Etambutol atuam sobre a parede bacteriana causando uma alteração na permeabilidade da parede celular das micobactérias (AHMAD; UNGPHAIBOON; SRICHANA, 2014). Por sua vez, a INH possui uma elevada atividade contra *M.tuberculosis*, mas é rapidamente consumida por sua molécula ser extremamente pequena o que permite a sua entrada e saída com facilidade das células eucarióticas, necessitando assim de concentrações elevadas de uma INH para se obter um baixo CMI. Na formulação dos compósitos de QS/INH as

concentrações testadas são 84% menores do que utilizadas nos ensaios com a droga isolada e provavelmente devido a esse fato estes compósitos não apresentaram atividade antimicobacteriana. Na formulação dos compósitos QS/INH as concentrações testadas são a metade da quantidade utilizadas nos ensaios com a droga isolada, provavelmente devido a esse fato somado com a não interação química entre a QS e a INH, estes compósitos não apresentaram atividade antimicobacteriana.

Ao analisar os resultados da CMI do compósito QS/EMB na proporção 1:1 percebemos que houve um aumento do potencial antibacteriano do EMB quando associado a QS, onde o resultado obtido foi menor que a droga isolada. Uma hipótese para justificar esse resultado seria que a QS ao se ligar com o EMB, aumente a disponibilidade de $-NH_3$ (a presença do íon da amônia), que é responsável pela atividade antibacteriana da quitosana (SOTELO-BOYÁS et al., 2017), devido a possíveis interações físico-química entre a quitosana e o etambutol demonstrado nos resultados da ressonância magnética nuclear (RMN).

Em ambos compostos, a determinação do mecanismo de ação e ensaios frente a cepas multidroga resistente, foi realizada de forma a garantir a eficácia e segurança desses novos protótipos de fármacos antituberculose. O compósito QS/EMB 1:1 teve uma ação antimicobacteriana igual ao fármaco isolado na cepa clínica multidroga resistente, porém com a droga EMB reduzida pela metade em sua composição. Em vista dos resultados apresentados, entendemos que o compósito QS/EMB na proporção 1:1 possivelmente possa ser utilizado como uma nova forma de terapia para a TB utilizando menos droga para obter o mesmo resultado da droga isolada, possibilitando uma diminuição da dose diária e com isso diminuindo a toxicidade.

A utilização de fármacos antituberculosos menos tóxicos para as células do sistema imune inato podem constituir uma quimioterapia mais eficiente e com menos efeitos colaterais (SOSNIK et al., 2010). A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose é incapaz de atravessar a membrana celular, devido ao tamanho e as afinidades químicas. A popularidade das nanopartículas na terapia da TB se dá pelo fato de que eles podem entrar nos macrófagos alveolares através de mecanismos de endocitose ou fagocitose, combatendo o bacilo intercelular (PARK et al., 2013a).

O estudo de citotoxicidade realizado neste presente trabalho verificou que a quitosana não apresenta toxicidade em macrófagos murinos, isso pode ser devido às interações da molécula de QS com os receptores de manose da membrana dos

Macrófagos, o que resulta na fagocitose da molécula sem causar danos a célula, fato importante para o tratamento da tuberculose (GONZÁLEZ-JUARRERO; O'SULLIVAN, 2011; PARK et al., 2013a; PEI; YEO, 2016). A citotoxicidade do EMB observada nas células testadas foi maior do que a QS isolada e que o compósito QS/EMB 1:1.

Os resultados de citotoxicidade em macrófagos da linhagem RAW 264.7, estavam de acordo com nossa hipótese, onde ao associar o EMB a QS a toxicidade da droga diminui, como foi observado nos resultados da IC50 e IS maior no compósito do que na droga EMB isolada. O índice de seletividade (IS), que mede o quanto um composto é ativo contra o bacilo sem causar danos à viabilidade celular dos macrófagos (NAKAMURA et al., 2006). Em relação a IS o maior resultado foi do compósito QS/EMB 1:1, e quanto maior esta razão da IC50/CMI, mais seletiva é a droga sobre o bacilo e, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre a célula testada, ou seja, o compósito QS/EMB 1:1 é mais seletivo que os compostos isolados. A interação eletrostática entre a carga positiva de quitosana e negativa da membrana celular pode ter potencializado a fagocitose do compósito pelos macrófagos (PARK et al., 2013a).

Em alguns estudos de toxicidade realizados com QS, verificou-se que ela diminuía a toxicidade de vários compostos tóxicos e drogas antituberculosas como a isoniazida e rifampicina (BEREZIN; SKORIK, 2015a; GARG; RATH; GOYAL, 2015; OZCELIK et al., 2014; VAVŘÍKOVÁ et al., 2011a). Estratégias alternativas capazes de reduzir o número de medicamentos administrados diariamente e reduzir a toxicidade das drogas utilizadas seria vantajoso para uma quimioterapia mais eficiente, inclusive para pacientes com o sistema imune debilitado como é no caso dos portadores do vírus do HIV.

Os macrófagos alveolares são as células mais relevantes para infecção *por M. tuberculosis*, contudo não são facilmente acessíveis. Aplicações de compostos que podem ser também utilizados como receptores podem induzir a internalização via endocitose da partícula, o que facilitará o fornecimento de agentes terapêuticos específicos (PARUMASIVAM et al., 2016). A alta afinidade do receptor e a captação celular é um passo importante para melhorar a administração de fármacos antituberculosos, já que o bacilo sobrevive dentro da célula (DUBE; AGRAWAL; VYAS, 2012), porém a gama do tamanho das partículas a serem administradas como liberação controlada em macrófagos é uma característica importante.

Sabe-se que para que as partículas sejam fagocitadas pelos macrófagos, as mesmas precisam estar na escala de ≤ 500 nm, e para serem liberadas diretamente por via pulmonar deverá ter aproximadamente > 5 μm (KUSONWIRIYAWONG et al., 2013; PARK et al., 2013b; TAO; HAN; DOU, 2012; YUE et al., 2010). Em um estudo realizado com macrófagos murinos, as células foram incubadas com partículas de quitosana fluorescentes de diferentes tamanhos (430 nm, 4,8 μm e 1,9 μm), a extensão de captação celular foi da ordem de $1,9 \mu\text{m} > 430$ nm (PEI; YEO, 2016).

Nas análises morfológicas realizadas no presente trabalho, o compósito QS/EMB 1:1 apresentava uma superfície mais homogênea do que das partículas isoladas, o que pode facilitar a sua capturada pelos macrófagos nos alvéolos dos pulmões, a qual também poderá aumentar a eficiência do tratamento contra a Tuberculose (DUBE; AGRAWAL; VYAS, 2012; GARG; RATH; GOYAL, 2015). Observar-se que o diâmetro médio das partículas do compósito QS/EMB 1:1 apresentaram tamanhos médio de 145 nm, e além disso, a distribuição do tamanho das partículas e a morfologia foi bastante homogênea. O índice de polidispersidade (PDI) fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, e em nosso estudo ficou abaixo de <0.3 , indicando a formação de um sistema monodisperso (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

Baseado nos resultados obtidos na caracterização morfológica, o baixo PDI e o tamanho das partículas do nanocompósito QS/EMB 1:1, sugere que o mesmo possa ser fagocitado pelos macrófagos alveolares (CIPOLLA et al., 2014; COSTA et al., 2016a; GARG; RATH; GOYAL, 2015; PARK et al., 2013b). Assim, é possível que possamos atingir um aumento e melhor eficácia do tratamento da tuberculose, bem como o combate intracelular ao bacilo multirresistente (GONZÁLEZ-JUARRERO; O'SULLIVAN, 2011; YUE et al., 2010). Isso torna a administração do nanocompósito QS/EMB 1:1 como uma possível abordagem para o tratamento de infecções pulmonares.

Os nanocompósitos e as nanopartículas estão sendo cada vez mais aplicadas em diversas áreas, como na nanobiotecnologia como carreador de fármacos de liberação controlada (HULE; POCHAN, 2007; KUMAR; POORNACHANDRA; POMBALA, 2017; YU et al., 2009), e no auxílio de biomarcadores visando o diagnóstico e tratamento de diversas doenças (CUI et al., 2011). Os compostos estudados no presente trabalho foram avaliados quanto a sua fotosensibilidade no Microscópio Confocal e no fluorímetro afim de ampliar novas possibilidades de uso do compósito QS/EMB 1:1. A

QS possui propriedades naturais de fluorescência, comumente utilizada como um biomarcador celular em pesquisas de liberação controlada (PARK et al., 2013a; SCHMITT et al., 2010b; YUE et al., 2010). O EMB até o presente momento não foi estudado sobre suas propriedades de luminescência, e em nosso estudo o mesmo não apresentou fluorescência natural, apenas quando está associada a QS é observado uma intensa fotosensibilidade, o que também indica uma possível interação química entre os compostos.

Os perfis de emissão de luminescência do nanocompósito QS/EMB 1:1 são promissores na aplicação em imagiologia por fluorescência, pois de acordo com os resultados é possível monitorar em tempo real da distribuição do compósito em pHs fisiológicos, como por exemplo nos pulmões (pH 7,4) posto que foi observado pela análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que o compósito é estável em pHs na faixa entre 6,5 a 7,5. O nanocompósito também poderá ser utilizado na visualização da internalização do fármaco em macrófagos. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade já utilizada na clínica para o tratamento de doenças humanas, incluindo artrite reumatoide (AMARJI et al., 2013).

Os macrófagos são responsáveis pelo aumento da permeabilidade nos tecidos, observados em locais de inflamação, incluindo articulações inflamadas em patologias como a artrite reumatoide (JIA et al., 2014), sugerindo que sua eliminação seletiva pode ser benéfica também para tratamento de distúrbios inflamatórios. Assim, a terapia fotodinâmica podem abrir novas rotas para utilização do nanocompósito QS/EMB 1:1 no tratamento de uma vasta gama de doenças. A PDT envolve uma terapia não tóxica, um fotossensibilizador (FS), que no nosso estudo é a QS, em combinação com uma luz visível inofensiva de comprimento de onda definido, que excita o FS a um estado tripleto de alta energia (SCHMITT et al., 2010b).

Os compostos QS, EMB e o nanocompósito QS/EMB 1:1 também foram avaliados quanto a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), que é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. O grupamento NH_2 , presente no espectro FTIR da QS, tem atraído atenção crescente em aplicações farmacêuticas e biomédicas por ter sido citado como responsável pela atividade antimicrobiana da quitosana (MANIVASAGAN, 2016). Essas propriedades da QS são particularmente adequadas para o desenvolvimento de nanocompósitos polímero-fármaco devido à sua disponibilidade para acoplamento com os grupos amino

primários e grupos hidroxilo de cada subunidade polimérica e a natureza catiônica que permite a reticulação iônica com a droga.

As análises termogravimétricas (TGA), a espectrometria de FTIR e RMN dos compostos, revelaram perfis diferentes no nanocompósito QS/EMB 1:1 distintos dos compostos isolados, confirmando as características originais das substâncias isoladas e sugerindo uma nova interação entre os compostos isolados na formulação do nanocompósito, sugerindo a formação de um novo composto.

7 CONCLUSÕES

- A quitosana isolada e os compósitos QS/INH 1:1 e 2:1, QS/EMB 2:1 não apresentaram atividade antimicobacteriana, nas condições testadas contra a cepa de referência ATTCC H37Rv e a cepa clínica MDR-1576 da *Mycobacterium tuberculosis*.
- O compósito QS/EMB 1:1 demonstrou que a quitosana associada com a droga etambutol na proporção 1:1, resultou em um aumento do potencial antimicobacteriano do fármaco contra *M. tuberculosis*.
- A atividade citotóxica do nanocompósito QS/EMB 1:1 apresentou baixo percentual de inibição para as linhagens de macrófagos murinos RAW, quando comparado ao etambutol isolado.
- As caracterizações físico-químicas do QS/EMB 1:1, confirmaram a formação de um nanocompósito de matriz polimérica com novas propriedades diferentes de cada constituinte isolado.

Em vista dos resultados discutidos, o nanocompósito QS/EMB 1:1 pode ser utilizado como uma abordagem a ser usada para terapia de doenças pulmonares, como TB, ampliando também o espectro de eficácia da quimioterapia direta nas células do sistema imune inato. Assim, devido ao seu papel no sistema imune, com afinidade direta com as células de defesa do corpo, o presente estudo fornece um excelente recurso para desenvolvimento futuro de fármacos na terapia não tóxica da TB e na terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

- A.C.L BATISTA, G.C DANTAS, J. S. AND R. . S. Antimicrobial effects of native chitosan again opportunistic gram-negative bacteria. **Microbiology Journal**, 2011.
- AHMAD, M. I. .; NAKPHENG, T. .; SRICHANA, T. . B. The safety of ethambutol dihydrochloride dry powder formulations containing chitosan for the possibility of treating lung tuberculosis. **Inhalation Toxicology**, v. 26, n. 14, p. 908–917, 2014.
- AHMAD, M. I.; UNGPHAIBOON, S.; SRICHANA, T. The development of dimple-shaped chitosan carrier for ethambutol dihydrochloride dry powder inhaler. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, p. 1–10, 2014.
- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589–601, 1 fev. 1988.
- ALMATAR, M. et al. New drugs for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 546–558, 2017.
- AMARJI, B. et al. In vivo study of clobetasol propionate loaded nanoemulsion for topical application in psoriasis and atopic dermatitis. **Polymers and Polymer Composites**, v. 12, n. 1, p. 449–456, 2013.
- ANGADI, S. C.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Interpenetrating polymer network blend microspheres of chitosan and hydroxyethyl cellulose for controlled release of isoniazid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 171–179, 2010.
- ARBEX, M. A. et al. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. **J Bras Pneumol.**, v. 36, n. June, p. 626–640, 2010a.
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 641–656, 2010b.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.
- BAGHAEI, P. et al. Risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis. **Tanaffos**, v. 8, n. 3 PG-17-21, p. 17–21, 2009.
- BEREZIN, A. S.; SKORIK, Y. A. Chitosan-isoniazid conjugates: Synthesis, evaluation of tuberculostatic activity, biodegradability and toxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 309–315, 2015a.
- BEREZIN, A. S.; SKORIK, Y. A. Chitosan-isoniazid conjugates: Synthesis, evaluation of tuberculostatic activity, biodegradability and toxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 309–315, 2015b.

BIVAS-BENITA, M. et al. Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 22, n. 13–14, p. 1609–1615, 2004.

BOUCHARD, H.; VISKOV, C.; GARCIA-ECHEVERRIA, C. Antibody–drug conjugates—A new wave of cancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 23, p. 5357–5363, 2014.

BOULANGER SCEMAMA, E.; TOUITOU, V.; LE HOANG, P. [Bitemporal hemianopia as presenting sign of severe ethambutol toxicity]. **Journal français d’ophtalmologie**, v. 36, n. 9, p. e163-7, nov. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica: Dados. Ministério da Saúde [Internet]. 2016.** Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/27/taxa-incidencia-tuberculose-1990-2015-MAIO-2016-corrigida.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 14–27, 2014.

CARUSO, G.; MERLO, L.; CAFFO, M. **Nanoparticles potential: types, mechanisms of action, actual in vitro and animal studies, recent patents.** [s.l: s.n.].

CHANG, K. C.; YEW, W. W. Management of difficult multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Update 2012. **Respirology**, v. 18, n. 1, p. 8–21, 2013.

CHAUBEY, P.; MISHRA, B. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1101–1108, jan. 2014.

CHEN, S. C.; LIN, M. C.; SHEU, S. J. Incidence and prognostic factor of ethambutol-related optic neuropathy: 10-year experience in southern Taiwan. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 7, p. 358–362, 2015.

CHOI, W.-I. et al. Acute lung injury caused by ethambutol. **Respiratory Medicine Extra**, v. 2, n. 2, p. 55–57, 2006.

CIPOLLA, D. et al. Lipid-based carriers for pulmonary products: Preclinical development and case studies in humans ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, p. 53–80, 2014.

COLANGELI, R. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1829–1840, 2005.

COSTA, A. et al. The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016a.

COSTA, A. et al. The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 102–115, 2016b.

COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. Prepara????o e caracteriza????o de blendas de quitosana/poli(??lcool vin??lico) reticuladas quimicamente com glutaralde??do para aplica????o em engenharia de tecido. **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008.

CUI, W. et al. Fluorescent nanoparticles of chitosan complex for real-time monitoring drug release. **Langmuir**, v. 27, n. 13, p. 8384–8390, 2011.

DAHL, J. L. Electron microscopy analysis of Mycobacterium tuberculosis cell division. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 1, p. 15–20, 2004.

DESAI, N. C. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1776–1783, 2016.

DHEDA, K. et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2017.

DIXIT, P. et al. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of M. tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 1, p. 122–126, 2012.

DU, W. L. et al. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 385–389, 2009.

DUBE, D.; AGRAWAL, G. P.; VYAS, S. P. Tuberculosis: From molecular pathogenesis to effective drug carrier design. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 13–14, p. 760–773, 2012.

DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet**, v. 367, n. 9514, p. 938–40, 18 mar. 2006.

EL-ZOWALATY, M. E. et al. The ability of streptomycin-loaded chitosan-coated magnetic nanocomposites to possess antimicrobial and antituberculosis activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3269–3274, 2015.

ELSEVIER LTD. Ethambutol. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 88, p. 102–105, 2008.

Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/sci-hub.cc/S0006291X16301711/1-s2.0-S0006291X16301711-main.pdf?_tid=3a73d6f2-2675-11e6-a573-00000aab0f26&acdnat=1464619742_6420bf720d20dec22de169540415f351>. Acesso em: 30 maio. 2016.

Ethambutol Sensory systems Optic neuropathy. p. 2016, 2016.

FELDMAN, D. Polymer nanocomposites in medicine. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 53, n. 1, p. 55–62, 2016.

GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, n. January, p. 1–5, 2015.

Global tuberculosis report 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf>. Acesso em: 30 maio. 2016.

GONZÁLEZ-JUARRERO, M.; O’SULLIVAN, M. P. Optimization of inhaled therapies for tuberculosis: The role of macrophages and dendritic cells. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 86–92, 2011.

GROSSET, J. H.; SINGER, T. G.; BISHAI, W. R. New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality [State of the Art Series. New tools. Number 2 in the series]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 8, p. 1005–1014, 1 ago. 2012.

GUILLET, V. et al. Ethambutol-induced optic neuropathy linked to OPA1 mutation and mitochondrial toxicity. **Mitochondrion**, v. 10, n. 2, p. 115–124, 2010.

HEIFETS, L. B.; ISEMAN, M. D.; LINDHOLM-LEVY, P. J. Ethambutol MICs and MBCs for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 6, p. 927–932, 1986.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 89, n. 2, p. 151–65, 29 abr. 2003.

HOAGLAND, D. T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 55–72, 2016.

HU, Y. et al. Formation and optimization of chitosan-nisin microcapsules and its characterization for antibacterial activity. **Food Control**, v. 72, p. 43–52, 2017.

HULE, R. A.; POCHAN, D. J. Polymer Nanocomposites for Biomedical Applications. **MRS Bulletin (2007)**, v. 32, n. 4, p. 354–358, 2007.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 9, p. 1326–31, set. 1998.

JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769–2776, 20 jun. 2003.

JIA, M. et al. Development of both methotrexate and mitomycin C loaded PEGylated chitosan nanoparticles for targeted drug codelivery and synergistic anticancer effect. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 14, p. 11413–11423, 2014.

JÖNSSON, S. et al. Population pharmacokinetics of ethambutol in South African tuberculosis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4230–4237, 2011.

JÚNIOR, J. C. L.; RAMOS, R. T. T.; ROBAZZI, T. C. M. V. Treatment of latent tuberculosis in patients with juvenile rheumatic diseases: a systematic review. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, n. 3, p. 245–253, 2017.

KAUR, I. P.; SINGH, H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. **Journal of Controlled Release**, v. 184, n. 1, p. 36–50, 2014.

KUMAR, C. G.; POORNACHANDRA, Y.; POMBALA, S. **Chapter 1 - Therapeutic nanomaterials: from a drug delivery perspective**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

KUMAR, M. et al. Rapid, inexpensive MIC determination of Mycobacterium tuberculosis isolates by using microplate nitrate reductase assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, n. 2, p. 121–124, 2005.

KUSONWIRIYAWONG, C. et al. Spray-Dried Chitosan Microparticles for Cellular Delivery of an Antigenic Protein: Physico-chemical Properties and Cellular Uptake by Dendritic Cells and Macrophages. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 6, p. 1677–1697, 13 jun. 2013.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 221–229, 2015.

MANIVASAGAN, P.; OH, J. Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 315–327, jan. 2016.

MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis-Colorimetric Redox Indicator (CRI). **Procedure Manual**, p. 1–17, 2012.

MATHEW, A. P.; OKSMAN, K. Chitin Nanocomposites for Medical Applications. **Nanotechnologies for the Life Sciences**, v. 8, 2012.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; MASOUD HOSSEINI, S. Effect of chitosan molecular weight as micro and nanoparticles on antibacterial activity against some soft rot pathogenic bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 347–355, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUSTAFA, S. et al. Nanocarrier-based interventions for the management of MDR/XDR-TB. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 4, p. 287–304, 2015.

MUZAFFAR, S. et al. Study of the UV protective and antibacterial properties of aqueous polyurethane dispersions extended with low molecular weight chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 51–60, 2017a.

MUZAFFAR, S. et al. Study of the UV protective and antibacterial properties of aqueous polyurethane dispersions extended with low molecular weight chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 51–60, 2017b.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61–66, 2006.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES COLOIDAIAS DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO RESVERATROL DESTINADOS À ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 148–158, fev. 2006.

ONYEBUJOH, P. et al. Public Health Reviews Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. **Public Health Reviews**, v. 21246, n. 5, p. 857–865, 2005.

OZCELIK, E. et al. Protective effect of chitosan treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 6, p. 286–290, 2014.

PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720–2722, 2002.

PANDEY, R.; AHMAD, Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: Facts, flaws, and future. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 3, p. 259–272, 2011a.

PANDEY, R.; AHMAD, Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: Facts, flaws, and future. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 3, p. 259–272, 2011b.

PARK, J. H. et al. **Chitosan microspheres as an alveolar macrophage delivery system of ofloxacin via pulmonary inhalation** **International Journal of Pharmaceutics**, 2013a.

PARK, J. H. et al. Chitosan microspheres as an alveolar macrophage delivery system of ofloxacin via pulmonary inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 562–569, 2013b.

PARUMASIVAM, T. et al. **Dry powder inhalable formulations for anti-tubercular therapy** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187–3204, 2008.

PEI, Y.; YEO, Y. Drug delivery to macrophages: Challenges and opportunities.

Journal of Controlled Release, v. 240, p. 202–211, 2016.

PHAM, D. D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517–529, 2015.

POURSHAHAB, P. S. et al. Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 605–613, 2011.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2693–2700, 2004.

RASOOL, M. et al. Determination of potential role of antioxidative status and circulating biochemical markers in the pathogenesis of ethambutol induced toxic optic neuropathy among diabetic and non-diabetic patients. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 739–743, 2015.

SALA, M. et al. Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 43, 2016.

SANTHOSH, S. et al. Effect of chitosan supplementation on antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 219, p. 53–59, 2006.

SARKAR, S.; SURESH, M. R. An overview of tuberculosis chemotherapy - a literature review. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 14, n. 2, p. 148–61, 2011.

SCHMITT, F. et al. Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 2, p. 242–250, 2010a.

SCHMITT, F. et al. Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 2, p. 242–250, 2010b.

SCHUBERT, K. et al. The antituberculosis drug ethambutol selectively blocks apical growth in CMN group bacteria. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2017.

SHIBATA, Y. et al. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. Alveolar Macrophage Priming by Intravenous Administration of Chitin Particles, Polymers of N -Acetyl- D - Glucosamine, in Mice. v. 65, n. 5, p. 1734–1741, 1997a.

SHIBATA, Y. et al. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. **Infection and immunity**, v. 65, n. 5, p. 1734–41, maio 1997b.

SINGH, C. et al. Hepatoprotective agent tethered isoniazid for the treatment of drug-induced hepatotoxicity: Synthesis, biochemical and histopathological evaluation.

Toxicology Reports, v. 1, p. 885–893, 2014.

SLAVCHEV, G.; MICHAILOVA, L.; MARKOVA, N. L-form transformation phenomenon in *Mycobacterium tuberculosis* associated with drug tolerance to ethambutol. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 4, p. 454–459, 2016.

SOSNIK, A. et al. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 547–559, 2010.

SOTELO-BOYÁS, M. E. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 15–20, 2017.

SQUIBB, B.; INDEX, M.; INDEX, M. Isoniazid. **Tuberculosis**, v. 88, n. 2, p. 112–116, 2008.

STAMFORD-ARNAUD, T. M. Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/Quantum Dots fluorescentes. p. 142, 2012.

SUBHEDAR, D. D. et al. Quinolidene-rhodanine conjugates: Facile synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 385–399, 2017.

TAO, Y.; HAN, J.; DOU, H. Paclitaxel-loaded tocopheryl succinate-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for synergistic chemotherapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 8930, 10 abr. 2012.

TROWS, S.; SCHERLIES, R. Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug. **Powder Technology**, v. 292, p. 223–231, maio 2016.

VAVŘÍKOVÁ, E. et al. Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1901–1907, 2011a.

VAVŘÍKOVÁ, E. et al. Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1901–1907, 1 fev. 2011b.

WANG, Y. et al. Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1135–1143, fev. 2017.

WHO. Global tuberculosis report 2014 (WHO/HTM/TB/2014.08). 2014.

WU, T. et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 192–200, 2017.

XIA, Y. et al. Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. **Vaccine**, v. 33, n. 44, p. 5997–6010, nov. 2015.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215–26, 2 jan. 2003.

XUE-YIN, J. et al. Mn-doped nanometer-size ZnS clusters in chitosan film matrix prepared by ion-coordination reaction. **Journal of Crystal Growth**, v. 191, n. 4, p. 692–696, 1998.

YANG, X. et al. Self-aggregated nanoparticles from methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: Synthesis; characterization; aggregation and methotrexate release in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 125–131, 2008.

YILMAZ ATAY, H.; ÇELİK, E. Investigations of antibacterial activity of chitosan in the polymeric composite coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 102, p. 194–200, 2017.

YU, C.-Y. et al. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 2, p. 245–249, fev. 2009.

YUE, H. et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 5, p. 650–657, 2010.

ZHU, B. DONG et al. Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 318–326, 2007.

ANEXO A

Produções científicas relacionadas com a dissertação.

- Pedido de patente:



Recife, 16 de junho de 2017

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de Oliveira, portadora do RG 7.852.491 SDS/PE e do CPF 060.571.414-23, brasileira, solteira, mestranda do Programa de Pós-Graduação de Morfotecnologia, procurou a Diretoria de Inovação desta Universidade, para iniciar o procedimento de depósito do pedido de patente intitulado “Desenvolvimento de nanocompósitos de quitosana e etambutol para tratamento da tuberculose”, sendo devidamente orientada sobre os trâmites pertinentes, e recebendo a numeração provisória “COA 174” (Controle de Ordem de Atendimento, nº 174). Declaro, ainda, que este pedido de patente apresenta, como co-inventores, Severino Alves Junior, Rosa Valéria da Silva Amorim, Lilian da Lapa Montenegro, Yuri José de Albuquerque Silva, Leonardo Aquino e Leandro Azevedo.

Atenciosamente,

 **Siddhartha Gautamma**
Assistente em Administração
DINE-PROPESQ-UFPE
SIAPE: 1733458

ANEXO B

▪ Resumos publicados:

Desenvolvimento de nanocompósitos de quitosana com drogas antibacterianas contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de Oliveira; Yuri José de Albuquerque Silva; Leonardo de Aquino Linhares; Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel (Co-orientadora); Rosa Valéria da Silva Amorim (Orientadora).

52° CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIR DE MEDICINA TROPICAL, Maceió –AL, Anais 2016 – 8100.

Avaliação da atividade antimicobacteriana de protótipo de origem semissintético promissor para o tratamento da Tuberculose

Yuri José de Albuquerque Silva; Leonardo Aquino. Linhares; Maria Eduarda de Farias Albuquerque Gaspar de Oliveira; Fabiana Cristina Fulco Santos; Aline dos Santos Peixoto; Marcela Pereira Salazar; Andreza Souza do Nascimento; Maria Eduarda Bernardina de Albuquerque Silva; Ilyana Oliveira Coutinho; Jéssica de Andrade Gomes Silva; Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior; Lilian Maria Montenegro (Co-orientadora).

52° CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIR DE MEDICINA TROPICAL, Maceió –AL, Anais 2016 – 10208.