



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA KEIZO-ASAMI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

LUANNA DE ÂNGELIS CORREIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS  
COM FUCANA CONTRA CEPA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
SENSÍVEL E RESISTENTE**

Recife  
2022

LUANNA DE ÂNGELIS CORREIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS  
COM FUCANA CONTRA CEPA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
SENSÍVEL E RESISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em biologia aplicada a saúde Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador (a): Dr. José António Couto Teixeira

Coorientador (a): Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto e Dra. Lilian Maria Lapa Montenegro Pimentel

Recife

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Sousa, Luanna de Ângelis Correia de

Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas revestidas com fucana contra cepa de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e resistente / Luanna de Ângelis Correia de Sousa– 2022.

56 f. : il., fig., tab.

Orientador: José António Couto Teixeira

Coorientadoras: Ana Lúcia Figueiredo Porto e Lilian Maria Lapa  
Montenegro Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndice.

1. Nanotecnologia 2. Tuberculose 3. Agentes antiinfecciosos I. Teixeira, José António Couto (orient.) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo(coorient.) III. Pimentel, Lilian Maria Lapa Montenegro (coorient.) IV. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -057

LUANNA DE ÂNGELIS CORREIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS  
COM FUCANA CONTRA CEPA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
SENSÍVEL E RESISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Ciências Biológicas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em aplicada a saúde Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 25/02/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dr. José António Couto Teixeira  
Universidade do Minho Braga/Portugal

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga  
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz-PE

Dedico este trabalho a minha mãe que  
sempre acreditou em mim e nunca me  
deixou desistir dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e me dar forças no caminho até chegar aqui, principalmente nos momentos em que duvidei de mim. Agradeço ainda por me proporcionar encontros com pessoas tão importantes na minha vida e aprender muito com elas.

Agradeço a minha família por todo ensinamento e educação que me deram. Educação sempre foi imposto em primeiro lugar, principalmente pelo meu pai, Paulo. Em especial gostaria de agradecer a minha mãe Solange, essa mulher guerreira e exemplo de pessoa que se desdobrou em mil para me dar a oportunidade de conseguir alcançar cada sonho e por sonhar, chorar e vibrar junto comigo em cada momento. Gostaria de agradecer ainda ao meu irmão Luan, por me distrair e me divertir nos momentos em que eu mais precisei, mesmo sem perceber.

Agradeço ao meu marido Anderson por toda compreensão, apoio e paciência durante toda esta trajetória, principalmente nos últimos meses.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores o Professor Teixeira e a professora Ana porto por me aceitarem e acolherem no programa de pós de graduação, por todo suporte e auxílio que me deram. Em especial gostaria de agradecer a Dra. Lilian que me orienta desde de 2016 e me proporcionou ingressar no grupo de pesquisa com tuberculose. Agradeço por confiar e apostar em mim, por me dar apoio e auxiliar sempre que precisei, seja com ideias ou com uma simples conversa, obrigada Lilian por deixar sempre suas portas abertas para me ajudar a trilhar este caminho pela pesquisa.

Obrigado a todos os colaboradores que proporcionaram o desenvolvimento deste projeto, pesquisa nunca é feita por um indivíduo e sim por uma equipe. Gostaria de deixar meu agradecimento especial ao laboratório de imunioepidemiologia que faço parte desde a iniciação científica, cada membro que passou ou que continua lá são pessoas extremamente especiais, acolhedoras, sempre dispostas a ajudar independentemente de qualquer coisa, ali temos a oportunidade de criar laços profundos de amizade. Mas gostaria de agradecer principalmente a Leonardo e Aline que no início me ensinaram grande parte do que sei hoje, se esse projeto aconteceu foi por tudo que aprendi com vocês e a Jaqueline, que chegou para me treinar e ensinar a nanotecnologia e me ensinou coisas muito além disto, muito obrigado por todo suporte e conhecimento passados.

A ciência e o laboratório me proporcionaram grandes amigos, eles que suportaram cada surto meu, cada fraqueza, eles que estavam sempre ali para me dar todo suporte emocional. João Paulo, Romário, Larissa e Danyele. Talvez vocês não tenham ideia do quanto me ajudaram, não só me auxiliando nos experimentos, mas as conversas, discursões, brincadeiras, aquele cafezinho para distrair. Muito obrigado por tudo e principalmente por fazerem parte da minha vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Ao Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami (LIKA) e ao Instituto Aggeu Magalhães pela disponibilidade da infraestrutura, funcionários e suporte dado a este trabalho.

A FACEPE órgão financiador do projeto maior e a CAPES pelo apoio financeiro, através de bolsa de estudos, durante a elaboração desse trabalho.

## RESUMO

Nanossistemas representam atualmente grande avanço para o tratamento de diversas doenças. Modificações de novos e antigos fármacos vem sendo foco nas pesquisas, sobretudo para superar a resistência atrelada a alguns deles. Além disto, nanossistemas podem melhorar a eficácia e segurança, bem como aumentar o tempo de circulação de algum fármaco e/ou torná-lo sítio-específico. Com isso neste trabalho produzimos um nanossistema partir do polímero PIBCA, contendo rifampicina, antibiótico utilizado no tratamento de microbactérias e revestido com fucana, polissacarídeo sulfatado, com propriedades distintas como a não ativação do sistema complemento e afinidade por receptores de macrófagos. Assim, os nanossistemas foram caracterizados a partir de tamanho médio, carga de superfície, índice de polidispersão (PDI), morfologia, estabilidade, bem como taxa de encapsulação. Analisamos ainda a atividade bacteriana do sistema contra cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) sensível e resistente. A Mtb é uma micobactéria causadora da tuberculose, uma doença antiga ainda considerada problema grave de saúde pública mundial, principalmente pela sua capacidade de resistir aos antibióticos usados em seu tratamento, como a rifampicina. A atividade bacteriana foi analisada pela taxa de concentração mínima (MIC), índice de concentração fracionada (FIC) e cinética de morte. Afim de avaliar a ação citotóxica, o nanossistema foi testado em linhagem celular J774A.1, células de macrófagos de murinos. Desta forma, obtivemos um nanossistema com tamanho variando entre 400nm e 480nm, carga de supercie negativa (-47,9), PDI de  $\pm 0,6$  mV, de morfologia arredondada, estável em temperatura de 4°C por até 32 dias e taxa de encapsulação variando entra 40 e 50%. O nanossistema apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,412µg/ml e 1,238µg/ml contra cepas sensível e multirresistente melhor atividade que Rifampicina livre. A viabilidade celular foi mantida entre 80% e 96%. Quando combinado com alguns dos fármacos utilizados no tratamento da doença (Rifampicina, Etambutol, Amicacina e Levofloxacino) a Concentração Inibitória Fracionada se mostrou indiferente (FIC = 0,5 a 4) contra *M. tuberculosis* sensível e resistente. Através destes achados demostramos o potencial das nanopartículas revestidas com fucana e que este sistema pode ser um candidato a otimização e continuação de ensaios pré-clínicos como proposta a um agente anti-tuberculose.

**Palavras-chave:** Tuberculose; Tratamento; Nanotecnologia; Agente Antituberculose; Nanopartícula.

## ABSTRACT

Nanosystems currently represent a great advance for the treatment of several diseases. Modifications of new and old drugs have been the focus of research, especially to overcome the resistance linked to some of them. In addition, nanosystems can improve efficacy and safety, as well as increase the circulation time of a drug and/or make it site-specific. In this work, we produced a nanosystem from the PIBCA polymer, containing rifampicin, an antibiotic used in the treatment of microbacteria and coated with fucan, a sulfated polysaccharide, with distinct properties such as non-activation of the complement system and affinity for macrophage receptors. Thus, the nanosystems were characterized based on average size, surface charge, polydispersity index (PDI), morphology, stability, as well as encapsulation rate. We also analyzed the bacterial activity of the system against sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) strains. Mtb is a mycobacterium that causes tuberculosis, an ancient disease still considered a serious public health problem worldwide, mainly due to its ability to resist the antibiotics used in its treatment, such as rifampicin. Bacterial activity was analyzed by the minimum concentration rate (MIC), fractional concentration index (FIC) and death kinetics. In order to evaluate the cytotoxic action, the nanosystem was tested in J774A.1 cell line, murine macrophage cells. In this way, we obtained a nanosystem with a size varying between 400nm and 480nm, negative surface charge (-47.9), PDI of  $\pm 0.6$  mV, with a rounded morphology, stable at a temperature of 4°C for up to 32 days and an encapsulation rate varying between 40 and 50%. The nanosystem showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.412µg/ml and 1.238µg/ml against sensitive and multidrug-resistant strains, better activity than free Rifampicin. Cell viability was maintained between 80% and 96%. When combined with some of the drugs used in the treatment of the disease (Rifampicin, Ethambutol, Amikacin and Levofloxacin) the Fractional Inhibitory Concentration proved to be indifferent (FIC = 0.5 to 4) against sensitive and resistant *M. tuberculosis*. Through these findings we demonstrate the potential of fucan-coated nanoparticles and that this system can be a candidate for optimization and continuation of pre-clinical trials as a proposed anti-tuberculosis agent.

**Keywords:** Tuberculosis; Treatment; Nanotechnology; Antituberculosis Agent; Nanoparticle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – | Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil, por 100 mil habitantes de 2009 a 2019 (Brasil, 2021)                                                                                                                                                                                                                    | 14 |
| Figura 2 – | Comparação do (A) z-average (nm) e (B) potencial zeta (mV) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana vazias (Nano_Vazia) e carregadas com Rifampicina (Nano_RIF). As amostras foram diluídas 1:20 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).                                                  | 30 |
| Figura 3 – | Avaliação da estabilidade de (A) Z-Ave (diâmetro hidrodinâmico) e (B) potencial zeta (carga de superfície) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana armazenada a temperatura de 4 °C. As amostras foram diluídas 1:100 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).                            | 31 |
| Figura 4 – | Avaliação da estabilidade de (A) Z-Ave (diâmetro hidrodinâmico) e (B) potencial zeta (carga de superfície) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana carregadas com Rifampicina armazenada a temperatura de 4 °C. As amostras foram diluídas 1:100 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA). | 32 |
| Figura 5 – | Morfologia e distribuição de nanopartículas de PIBCA revestida de fucana líquidas, Nano_Vazia (A) e Nano_RIF (B) por microscopia eletrônica de varredura                                                                                                                                                                      | 33 |
| Figura 6 – | Morfologia e distribuição de nanopartículas de PIBCA revestida de fucana secas, Nano_Vazia (A) e Nano_RIF (B) por microscopia eletrônica de varredura.                                                                                                                                                                        | 33 |
| Figura 7 – | CC <sub>50</sub> de Nano_RIF, Rifampicina e Nano_Vazia frente a linhagem celular J774A.1 num período de 24h                                                                                                                                                                                                                   | 35 |
| Figura 8 – | Influência da Nano_RIF na cinética de morte do <i>M. tuberculosis</i>                                                                                                                                                                                                                                                         | 37 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                   |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Fármacos de primeira linha e seus efeitos colaterais.             | 16 |
| Tabela 2 – | Antimicrobianos de primeira e segunda linha e doses recomendadas. | 18 |
| Tabela 3 – | Avaliação concentração inibitória mínima (CIM).                   | 34 |
| Tabela 4 – | FIC entre Nano_Rifa e antimicrobianos contra cepa H37Rv           | 36 |
| Tabela 5 – | FIC entre Nano_Rifa e antimicrobianos contra MDR 551              | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| CC <sub>50</sub> | Concentração citotóxica que reduz cinquenta por cento da viabilidade celular |
| CIM              | Concentração Inibitória Mínima                                               |
| DLS              | Dynamic Light Scattering                                                     |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo                                    |
| HCL              | Ácido clorídrico                                                             |
| IBCA             | Isobutilcianoacrilato                                                        |
| INH              | Isoniazida                                                                   |
| InhA             | Enoil-ACP redutase                                                           |
| KatG             | Catalase-peroxidase                                                          |
| LACEN/PE         | Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco                           |
| LJ               | Löwenstein-Jensen                                                            |
| MEV              | Microscópio eletrônico de varredura                                          |
| Mtb              | Mycobacterium tuberculosis                                                   |
| Nano_Rifa        | Rifa Nanoformulação de PIBCA revestido com Fucana contendo Rifampicina       |
| Nano_Vazia       | Vazia Nanoformulação de PIBCA revestido com Fucana                           |
| OADC             | Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase                                  |
| OMS              | Organização Mundial de Saúde                                                 |
| PBS              | Tampão fosfato-salino                                                        |
| PZA              | Pirazinamida                                                                 |
| RIF              | Rifampicina                                                                  |
| RNA              | Ácido ribonucleico                                                           |
| SR               | Scavenger receptors                                                          |
| TB               | tuberculose                                                                  |
| TB-MDR           | Tuberculose multidroga resistente                                            |
| TB-RR            | Tuberculose Rifampicina Resistente                                           |
| TB-XDR           | Tuberculose Extensivamente Droga Resistente                                  |

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                 | <b>13</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                      | <b>14</b> |
| 2.1 EPIDEMIOLOGIA .....                                                                                   | 14        |
| 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E FISIOPATOLOGIA .....                                                              | 15        |
| 2.3 TRATAMENTO E PRINCIPAIS DROGAS DO ESQUEMA DE TERAPÊUTICO .....                                        | 16        |
| 2.4 TUBERCULOSE RESISTENTE .....                                                                          | 19        |
| 2.5 NANOTECNOLOGIA.....                                                                                   | 20        |
| 2.6 FUCANA.....                                                                                           | 21        |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                                   | <b>22</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                                  | 22        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                           | 22        |
| <b>4. MATERIAIS E METÓDOS .....</b>                                                                       | <b>23</b> |
| 4.1 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE RIFAMPICINA....                                            | 23        |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULAS - DETERMINAÇÃO DO<br>DIÂMETRO, CARGA DE SUPERFÍCIE E MORFOLOGIA..... | 23        |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA RIFAMPICINA<br>.....                                  | 24        |
| 4.4 MICRORGANISMOS.....                                                                                   | 25        |
| 4.5 ANTIMICROBIANOS DE REFERÊNCIA.....                                                                    | 25        |
| 4.6 MEIO DE CULTURA BACTERIANO .....                                                                      | 25        |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....                                    | 25        |
| 4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (CC <sub>50</sub> ) .....                                                    | 26        |
| 4.9 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....                                         | 27        |
| 4.10 CINÉTICA DE MORTE MICOBACTERIANA.....                                                                | 28        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                     | <b>29</b> |
| 5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA .....                                                                             | 33        |
| 5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....                                    | 33        |
| 5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (CC <sub>50</sub> ) .....                                                    | 34        |
| 5.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....                                         | 36        |
| 5.6 CINÉTICA DE MORTE MICOBACTERIANA.....                                                                 | 37        |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                                       | <b>38</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                 | <b>39</b> |
| <b>APÊNDICE A .....</b>                                                                                   | <b>45</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), considerada problema grave de saúde pública mundial. No ano de 2020 foram registrados cerca de 9,9 milhões de novos casos, dentre os quais 1,5 milhões foram a óbito. Mesmo sendo totalmente tratável é crescente os números de casos resistentes. No Brasil, em 2020, foram notificados 1.171 casos de tuberculose resistente. (Brasil, 2021)

A resistência a doença está interligada a diversos fatores como, tempo de tratamento, variando de 6 a 24 meses, efeitos colaterais causados pela medicação, não adesão correta do paciente ao esquema determinado, além da capacidade mutável e adaptável do Mtb. Variar a permeabilidade da membrana para impedir a entrada de algum antimicrobiano, produzir enzimas capazes de degradar ou modificar os fármacos, bombas de efluxo que expulsam medicação, bem como causar mutações genéticas espontâneas no alvo ou em algum gene de ativação dos antimicrobianos, são alguns caminhos usados pelo *M. tuberculosis* para resistir ao tratamento. (Dheda et al., 2017; Rabahi, 2017; Schito; Hanna; Zumla, 2017)

Desta forma, é urgente a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de alternativas eficazes contra o Mtb, sobretudo aquelas que utilizem fármacos com baixa toxicidade, com capacidade de encurtar o tratamento, e com maior taxa de cura, para serem utilizadas como estratégia no controle dessa endemia (WHO, 2004). Atualmente as pesquisas neste sentido estão focadas em vários caminhos distintos. Um deles é a utilização de novas tecnologias como formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos do tipo nanopartículas (Huh e Kwon, 2011, Dube et al, 2012).

Os nanosistemas do tipo sítio-específicos caracterizam-se por serem revestidos com um polissacarídeo sulfatado como a fucana (Lira, et al., 2011) portador de importantes propriedades biológicas, principalmente a capacidade de se ligar a receptores encontrados nos macrófagos do tipo Scavenger Receptor (SRA) (Kim et al, 2003). Tendo em vista que o Mtb se reproduz em macrófagos. Além de sua capacidade de não ativar o sistema complemento (Zvyagintseva et al, 2003), diminuindo, portanto, o reconhecimento dos sistemas revestidos com este material e proporcionando um maior tempo de circulação.

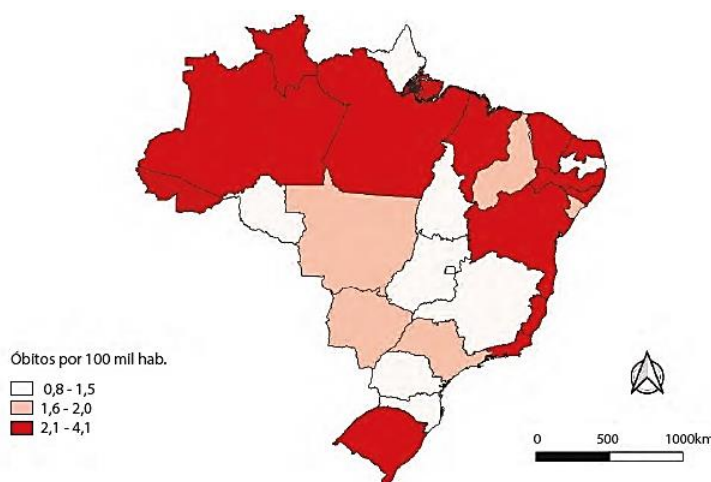
Assim, elaboramos a hipótese de que os nanossistemas sítio-específicos podem ser capazes otimizar os resultados previamente obtidos com sistemas convencionais. Neste sentido, avaliamos a ação dos nanossistemas sítio-específicos revestidos com fucana, contendo fármacos antimicobactericidas frente ao Mtb como alternativa eficaz no tratamento da doença.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose (TB) apesar de ser uma doença antiga com casos históricos registrados a mais de 5.000 anos continua sendo um problema grave de saúde pública mundial. Em 2020 a organização mundial de Saúde (OMS) chegou a registrar cerca de 9,9 milhões de novos casos da doença, destes 1,5 milhões foram a óbito. (Maciel et al., 2012; WHO, 2021)

O Brasil faz parte do panorama de 30 países com maior carga de TB no mundo, considerado pela OMS prioritário para o controle da doença. No ano de 2020 o país chegou a notificar cerca de 66.819 novos casos e em 2019 em torno de 4,5 mil óbitos foram ocasionados pela doença. Desde 2010 o coeficiente de mortalidade tem variado entre 2,3 a 2,2 óbitos por 100 mil habitantes. (Brasil, 2021)



**Figura 1** Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil, por 100 mil habitantes de 2009 a 2019 (Brasil, 2021)

Na Figura 1 Pernambuco faz parte das Unidades Federativas com maiores coeficientes de mortalidade do Brasil, junto a Amazonas, Rio de Janeiro, Rio Grande

do Sul, Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Roraima, Ceará, Acre, Alagoas, Bahia e Espírito Santo. Além disto São Paulo e Pernambuco juntos detêm 50% do total de notificações de morte no país. (Brasil, 2021)

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E FISIOPATOLOGIA

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) foi isolado a primeira vez no ano de 1882, pelo médico Robert Koch, por isso também é conhecido por bacilo de Koch. O Mtb é uma microbactéria pertencente ao grupo de microbactérias patogênicas conhecidas pela sua espessa parede celular, composta por ácidos micólicos resistentes a coloração comum utilizadas para outras espécies de bactérias, classificando as micobactérias como álcool-ácido resistentes. (Koch, 1891; Lee et al., 2010)

O Mtb é um bacilo fino aeróbio estrito, de crescimento lento, com taxa de divisão celular entre 20 e 24 horas. A transmissão ocorre através da tosse, fala ou espirro de um indivíduo baculífero, com sítio de infecção principal pulmonar. É característico da doença a formação de granulomas no pulmão. Entretanto, o Mtb pode atingir as vias linfáticas ou hematogênica, se alojar em outros órgãos e causar a tuberculose extrapulmonar. (Dangerfield et al., 2010; Shleeva et al., 2011; Orgeur and Brosch, 2018)

Apesar de ser um microrganismo intracelular facultativo, o ciclo de reprodução e infecção do bacilo acontece em fagócitos do hospedeiro e no granuloma. Após o contato e inalação, o Mtb é fagocitado por macrófagos presentes nos alvéolos pulmonares, o que gera uma resposta inflamatória. Além disto quando estes macrófagos infectados chegam aos pulmões eles invadem o tecido, ampliando assim a resposta pró-inflamatória. A partir daí o sistema imunológico pode conter a proliferação da doença, tornando a infecção latente, ou o bacilo pode driblar este sistema e evoluir para forma ativa da doença. (Ehrt et al, 2018; Huang et al, 2019; Sai and Rengarajan, 2019)

O *M. tuberculosis* consegue ainda expressar resistência a diversos antibióticos. Mecanismos comuns à bactéria, como o ácido micólico presente na membrana do bacilo ou até mesmo bombas de efluxo de drogas, são algumas maneiras que o microrganismo encontrou de resistir aos fármacos. Contudo, a resistência aos antibióticos e antimicrobianos que compõe a terapia medicamentosa são derivadas também, de mutações espontâneas nos genes que codificam o alvo de ação

farmacológico, ou até mesmo enzimas envolvidas na ativação de alguma pró-droga. A TB demonstra resistência a diversos fármacos simultaneamente a mais de uma droga ou a todos os medicamentos. (Spies, 2011; Gangadharam; Jenkins, 2012; Kieser and Rubin, 2014)

### 2.3 TRATAMENTO E PRINCIPAIS DROGAS DO ESQUEMA DE TERAPÊUTICO

O tratamento tradicional da tuberculose é composto por quatro drogas, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, administradas por via oral num período de seis meses a um ano. O objetivo é a cura do paciente, bem como prevenir a propagação da doença e evitar o surgimento da tuberculose resistente. Para isso, é necessário um diagnóstico precoce, triagem de resistência a fármacos e tratamento assistindo, para garantir que a terapia medicamentosa será seguida corretamente. Tendo em vista que além de longo, o tratamento é oneroso. Os antimicobacterianos apresentam diversos efeitos adversos (Tabela 1) como hepatotoxicidade, neuropatias, toxicidade ocular, etc., dificultado assim a não aderência do paciente ao esquema proposto. (Zumla; Nahid; Cole, 2013; Kaur et al., 2014)

**Tabela 1** Fármacos de primeira linha e seus efeitos colaterais

| Fármacos           | Efeitos colaterais                   |
|--------------------|--------------------------------------|
| Isoniazida (INH)   | Hepatotoxicidade e neuropatias       |
| Rifampicina (RIF)  | Hepatotoxicidade                     |
| Pirazinamida (PZA) | Hepatotoxicidade                     |
| Etambutol (EMB)    | Hepatotoxicidade e toxicidade ocular |

Fonte: KAUR et al., 2014

A isoniazida é um antimicrobiano com capacidade bactericida, formado por um anel de pirimidina e um grupo hidrazida análogo a nicotinamida. A INH penetra na célula do hospedeiro e difunde-se através da membrana do Mtb. Trata-se de uma pró-droga, ou seja, necessita de ativação, realizada através da ação oxidativa da catalase-peroxidase da enzima *KatG*. (Kolyva e Karakousis, 2012)

Há relatos de que a isoniazida também é capaz de inibir diversas vias celulares. O seu mecanismo de ação é bastante complexo, entretanto, sabe-se que a

INH tem capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios e o metabolismo do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD). O caminho primário responsável pela atividade da droga é a síntese de ácido micólico, em sequência o fármaco liga-se covalentemente ao anel de nicotiamida da cadeia de NAD, ligando-se a redutase *InhA* e formando a coenzima NADH capaz de dissociar *InhA*. (Dessen, et al. 1995; Rozwarski, et al. 1998)

A rifampicina (RIF) é um antibiótico de amplo espectro mais utilizado para o tratamento da TB. Demonstra atividade bactericida rápida, junto a isoniazida são os agentes esterilizantes mais potentes disponíveis contra o bacilo. Estruturalmente a RIF contém núcleo aromático ligado em ambos os lados por uma ponte alifática. O mecanismo de ação é descrito pela capacidade da rifampicina em ligar-se a subunidades  $\beta$  da RNA polimerase codificada pelo gene *rpoB*, com capacidade de inibir a etapa de transcrição da microbactéria (Rossetti, et al. 2002).

A RIF foi descoberta no ano de 1957 a partir a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* *mediterranei*. e tem capacidade de eliminar bacilos persistentes ao longo da terapia, além de reduzir o tempo de tratamento que antes chegava a 18 para 9 meses. A droga dispõe ainda de perfil lipofílico, o que facilita a entrada do antibiótico através da membrana plasmática do Mtb auxiliando a difusão do fármaco (Grosset, et al. 1998).

A pirazinamida (PRZ) assim como a isoniazida é um pró-fármaco convertido para forma ativa pela enzima pirazinamidase (PZase), codificada pelo gene *pncA* produzida pelo Mtb. Trata-se de um análogo estrutural da nicotinamida capaz de interromper a produção de energia da membrana bacteriana, inibindo a síntese de ácidos graxos, impedindo assim o transporte realizado através membrana plasmática. A PRZ foi introduzida ao esquema terapêutico da tuberculose em 1980 e contribuiu para diminuição no tempo de tratamento, de 9 para 6 meses graças a sua capacidade de inibir bacilos semi-dormentes que resistem a ambientes ácidos (Silva e Palomino, 2011).

A pró-droga PRZ denota influência em bacilos semi-dormentes graças a elevada atividade demonstrada pelo antibiótico em ambientes ácidos com PH de 5,5. Meios ácidos são característicos de foco inflamatórios gerados no pulmão durante os estágios iniciais de infecção pelo Mtb. Contudo, a atividade esterilizante do medicamento se restringe aos primeiros meses de terapia. (Rossetti et al. 2002)

A pirazinamida entra na bactéria por difusão passiva através do sistema de transporte de membrana, o acúmulo intracelular da droga é possível graças a um sistema ineficiente de efluxo exclusivo do MTb, o que torna o fármaco específico apresentando pouca ou nenhuma atividade frente a outras micobacterias (Kolyva e Karakousis, 2012).

O etambutol (EMB) é um agente anti-tuberculose que junto com a isoniazida, rifampicina e pirazinamida constitui o esquema de tratamento de seis meses utilizado no combate ao Mtb. Quimicamente nomeado de destro-etileniodiâmido-di-1-butanol-dihidroclorido atua diretamente na síntese de arabinose. Dispondo de alvo principal o gene *embB* e é capaz de impedir a incorporação do ácido micólico comum a membrana da micobactéria (Vasava, et al. 2017).

O mecanismo de ação exato do EMB ainda é pouco elucidado, entretanto, sabe-se que a via primária da droga é a biossíntese de arabinogalactano afetada através da inibição da polimerização da parede celular. Há relatos ainda que o EMB seria capaz de inibir outras vias celulares como o metabolismo do RNA, transferência de ácido micólico, biossíntese da espermidina, bem como, a síntese de fosfolipídios (Kolyva e Karakousis, 2012).

Apesar do tratamento ser eficaz, é crescente o surgimento de cepas resistentes. Desta forma, o tratamento é dividido em duas linhas (Tabela 2), dependendo do tipo de cepa atribuída ao paciente. O esquema terapêutico de primeira linha é a forma tradicional de tratar a tuberculose sensível e o de segunda linha, utilizado contra estipes resistentes. As drogas de segunda linha são administradas algumas por via oral e outras por injetáveis num período de até 24 meses. (WHO, 2016)

**Tabela 2** Antimicrobianos de primeira e segunda linha e doses recomendadas

| <b>Linha de tratamento</b> | <b>Fármaco</b> | <b>Dose diária e variação (mg/Kg peso corporal)</b> |
|----------------------------|----------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Primeira linha</b>      | Isoniazida     | 5 (4 - 6)                                           |
|                            | Rifampicina    | 10 (8 - 12)                                         |
|                            | Pirazinamida   | 25 (20 - 30)                                        |
|                            | Etambutol      | 15 (15 - 20)                                        |

---

|                               |                                                      |                                                                                   |
|-------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Injetável:</b>             |                                                      |                                                                                   |
|                               | Estreptomicina, canamicina, amicacina, capreomicina. | 15 (12 - 18)                                                                      |
| <b>Fluoroquinolonas:</b>      |                                                      |                                                                                   |
|                               | Ofloxacina, levofloxacina.                           | 750 - 1000 mg/dia                                                                 |
| <b>Bacteriostáticos oral:</b> |                                                      |                                                                                   |
| <b>Segunda linha</b>          |                                                      | 500 mg/dia (peso corporal < 50 Kg); 750 mg/dia (> 50 Kg) ou 1000 mg/dia (> 70 Kg) |
|                               | Etionamida, protionamida                             |                                                                                   |
|                               | Cicloserina                                          | Mesma dose da etionamida                                                          |
|                               | Ácido para-aminossalicílico                          | 8 g/dia (peso corporal < 70 Kg); 8 - 12 g/dia (>70 kg)                            |

---

Fonte: WHO, 2016

A cura é alcançada quando há o uso adequado e combinado destes fármacos, afim de eliminar os bacilos ativos e persistentes. Desta forma o regime terapêutico é dividido em duas fases. Na fase inicial ou intensiva, os antimicobacterianos terão a função de reduzir rapidamente a carga micobacteriana e melhorar os sintomas. Já a fase de manutenção ou continuação, vai eliminar os bacilos persistentes e evitar a recidiva da doença. A não aderência adequada, junto a capacidade mutável e adaptável do Mtb resultam no surgimento de cepas resistentes e as vezes até na morte do paciente. (Grange; Zumla, 2008; Duarte et al., 2010)

## 2.4 TUBERCULOSE RESISTENTE

A forma resistente de tuberculose que mais cresceu nos últimos anos foi a multidroga resistente (TB-MDR). No ano de 2016 foram registrados 490.000 novos casos de TB-MDR, dos quais, 110.000 tratam-se de pessoas que evoluíram do quadro rifampicina resistente (TB-RR). Estima-se que 6,2% do total de acometidos por multidroga resistência desenvolveram a tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR), a forma mais difícil de tratar de TB. no Brasil em 2020 foram registrados 1.171 novos casos de tuberculose resistente. (WHO, 2018; Brasil, 2021).

A tuberculose droga resistente é atribuída a pacientes resistentes a pelo menos um fármaco do esquema terapêutico, sendo a Isoniazida e a Rifampicina os mais comuns. A multidroga resistente é caracterizada pela resistência simultânea a Rifampicina e Isoniazida. A MDR-TB é tratada pelo esquema de segunda linha, ainda assim os registros de falha no tratamento são preocupantes, no Brasil em 2018 apenas 51,1% dos pacientes portadores desta forma de tuberculose alcançaram a cura. (Farhat et al, 2017; Brasil 2021)

A XDR-TB é reconhecida por ser uma evolução da MDR-TB. Além da resistência simultânea a Rifampicina e Isoniazida o bacilo será resistente a pelo menos uma Fluoroquinolona ou um dos injetáveis, sendo considerada uma falha terapêutica ao esquema de segunda linha. O tratamento para esta variante não é pré estabelecido e muitas vezes fármacos em fase testes são utilizados. (Zaw et al, 2017; Reta et al, 2021)

O portador de uma dessas variações da doença precisa ser monitorado pela unidade de saúde responsável, afim de reduzir a complacência do paciente. Os efeitos adversos causados pelo esquema de segunda linha são ainda mais colaterais que os de primeira linha, além de necessitarem de tempo mais extenso, dificultando ainda mais a aderência adequada a terapia. (Xu et al, 2021)

Tendo em vista dificuldade em combater a TB, e o crescente surgimento de cepas resistente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas seja através de novos fármacos, seja por novas formas de tecnologias farmacêuticas. buscar formas de melhorar a ação de novas e antigas moléculas, revolucionando a nanomedicina através dos sistemas nanoparticulados com propriedades únicas são o que a nanotecnologia farmacêutica traz de melhor.

## **2.5 NANOTECNOLOGIA**

A nanotecnologia tem proporcionado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada com habilidade de transportar uma variedade de fármacos para um alvo específico no organismo, incluindo o trato respiratório. Estudos relatam significativos progressos farmacológicas desde melhoramento na biodisponibilidade da droga, redução de efeitos colaterais e até mesmo a possibilidade de encurtar o tratamento de algumas doenças. Pesquisas neste sentido estão focadas em vários caminhos distintos utilizando diversas tecnologias tais como lipossomas, polímeros,

micelas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, nanopartículas metálicas entre outros. (Marcela A., et al. 2015; Kalambate et al. 2016; Yuan et al. 2018)

Nanopartículas do tipo polimérica possuem ampla aplicação na nanomedicina. Dependendo da morfologia podem ser nanocápsulas ou nanoesferas, entretanto ambas apresentaram escala nanométrica. Nanocápsulas possuem um núcleo oleoso, onde o fármaco será dissolvido e envolvido por uma capsula polimérica. Já em nanoesferas há uma rede polimérica continua onde o fármaco será retido no interior ou adsorvido na superfície do polímero. (Solto et al., 2020; Sabliov et al., 2021) Estes sistemas se destacam pelo seu uso como potencial carreador, para liberação controlada, além de proteger o fármaco contra o meio ambiente, bem como conseguir melhorar a biodisponibilidade e o índice terapêutico. Tornando assim nanopartículas do tipo poliméricas, promissoras para o melhoramento de novas e antigas drogas. (Al-Japairai et al., 2020)

Possuindo forma, tamanho, mobilidade e carga de superfície ideais, nanopartículas do poliméricas vêm sendo propostas contra doenças respiratórias, incluído a tuberculose. Alguns polímeros já foram utilizados em estudos com objetivo de melhorar o tratamento da tuberculose, provando que estes nanosistemas aumentaram o tempo de meia vida e reduziam o intervalo médio de resistências de algum antimicrobiano (Garbuzenko et. al, 2014; Luo et. al, 2021; Mitchel et. al, 2021)

## 2.6 FUCANA

A fucana é um polissacarídeo sulfatado presente em algas marinhas. É bastante estudado devido as suas diversas propriedades seja para microbiomas, cosméticos, uso clínico na oncologia e até mesmo para o melhoramento e direcionamento de algum fármaco. Há diversos espécimes de fucana, entretanto as que mais se destacam são as *Fucus vesiculosus*; *Laminaria japonica* e *Undaria pinnatifida*, principalmente no uso clínico. A *Fucus vesiculosus* é encontrada facilmente em algas marinhas marrons do bioma do Brasil. (Fitton et al, 2019; Khan et al, 2019)

A *Fucus vesiculosus* já é bem descrita na literatura e sua estrutura química bem elucidada, sendo composta por L-fucose e grupos sulfatados, que conferem carga negativa a esta molécula. Os monossacarídeos como manose, galactose, glicose,

xilose, assim como ácidos glucurônicos também fazem parte da estrutura, porém em menor quantidade. (Li et al., 2008)

A fucana se destaca quanto ao uso clínico devido as suas diversas propriedades biológicas como anticoagulante, antiinflamatória, antituberculosa, gastroprotetora, entre outras. Duas propriedades são essenciais quando associada a proposta de melhoramento de algum fármaco, principalmente para doenças como a tuberculose. A não ativação do sistema complemento e a afinidade por se ligar a *scavenger receptors* (SR), de classe A tipos I e II presentes na superfície de macrófagos, são essências para melhorar o tempo de meia vida e direcionar algum antimicrobiano a um alvo específico. (Kim; Ordija; Freeman, 2003; Karpinić et al, 2019)

Na literatura encontramos alguns estudos que utilizaram a fucana junto a outras drogas contra o Mtb. Atrelados a novas e antigas drogas resultados promissores foram descritos quanto ao uso da fucana. Direcionamento de novas drogas, melhoramento de antigas drogas e vias alternativas de administração, antimicrobianos já utilizados no tratamento da doença, como a inalatória foram relatados nestes estudos. (Lira et al, 2009; Grenha et al, 2018; Salviano et al, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver, caracterizar e analisar o potencial *in vitro* de nanopartículas revestidas com fucana contendo a rifampicina, contra cepa de *Mycobacterium tuberculosis* sensível e droga resistente como estratégia para o melhoramento do tratamento da doença.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar as nanopartículas obtidas por medidas do tamanho médio, carga de superfície, índice de polidispersão, taxa de encapsulação e aspectos macro e microscópicos;
- Determinar o potencial antimicrobiano *in vitro* das nanopartículas frente a cepa sensível H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* e isolados clínicos resistente e multidroga resistente.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas obtidos em culturas de macrófagos J774.

- Determinar a interação farmacológica *in vitro* entre as nanopartículas e os antimicrobianos utilizados no esquema terapêutico usual.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

A fucana com peso molecular de 30 kDa g. mol<sup>-1</sup>, foi sintetizado no setor de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), pelo grupo Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel). O Isobutylcyanoacrylate (IBCA) foi gentilmente fornecido também pelo grupo NanoBioCel. A rifampicina (RIFA) foi comprada da SIGMA-USA e todos os outros reagentes químicos utilizados são de qualidade e para uso em pesquisa.

##### **4.1 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE RIFAMPICINA**

As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsificação e polimerização aniônica de acordo com estudos anteriores descritos por Lira et al., 2011. Resumidamente, a solução de fucana foi preparada dissolvendo 0,050 g de fucana em 5 mL de água sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 10 minutos, o pH da solução foi ajustada para 2,5 com uma solução de HCl 0,1M. Depois disso, o monômero IBCA foi adicionado (0,05 mL) sob forte agitação magnética e a reação de polimerização foi iniciada. A mistura foi mantida a temperatura ambiente sob a mesma condição por 3 horas. Depois disso, suspensão de nanopartículas foi adicionada em saco de dialise (membrana espectro por com xur fora 100.000 g/mol MWCO, Biovalley, Marne la Vallée-France) com água como meio externo por 18 horas, neste tempo o meio externa foi trocado por quatro vezes. As nanopartículas carregadas de RIFA foram preparadas pela adição de 0,100 mL da solução da droga em etanol (194 µg/mL) após 5 minutos de polimerização do IBCA. Após as diálises, a suspensão das nanopartículas foi mantida a 4 °C até sua aplicação.

A estabilidade de cada formulação (variações de tamanho e carga) foi avaliada ao longo de 30 dias após armazenamento na geladeira (4 °C).

##### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULAS - DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO, CARGA DE SUPERFÍCIE E MORFOLOGIA**

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (Z-Ave), o índice de polidispersidade (PDI) e a carga de superfície (potencial zeta) foram analisados utilizando dispersão dinâmica de luz (Dynamic Light Scattering - DLS). As dispersões de nanopartículas foram diluídas com água deionizada (1:20- v/v) e medidas em ZetaSizer SZ90

(Malven, EUA), utilizando um cubeta de poliestireno (1cm<sup>2</sup>) em um ângulo fixo de 90 graus. A morfologia de cada formulação foi examinada usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, Modelo JSM-5600LV/ Marca Loel ) do Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ/PE; para esta análise, amostras de nanopartículas foram adicionadas em uma fita dupla face de carbono, colocadas em um *stub* e mantidas a temperatura ambiente para secagem; após 24h foram metalizadas (Modelo DESK II/Denton Vacuum) e observada no MEV.

Para determinar se secagem por liofilização altera a forma das nanopartículas, 1 mL de cada preparação foi adicionado em um tubo de vidro, congelado em freezer -120°C overnight e após congelamento levadas ao liofilizador por 48h; após secagem as amostras foram adicionadas em uma fita de carbono de dupla face e analisadas no MEV, como descrito acima.

#### **4.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA RIFAMPICINA**

A quantificação da rifampicina foi adaptada de Swamy et.al., 2018 e baseada na medição da absorbância em ácido clorídrico de 0,1 M (HCl) a 337 nm, utilizando um Spectrophotometer Utrospec 300 PRO, (Amersham Pharmaceutic Biotech-France). O padrão da rifampicina foi preparado dissolvendo 100 mg em 1 mL de HCl 0,1 M (concentração final de 100 mg /mL), e a curva padrão foi realizada pela adição de alíquotas da solução do fármaco padrão em tubos de 5 mL para termos diferentes concentrações do fármaco (1,5, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL) diluído com HCl 0,1 M. A absorção de cada solução foi então medida em 337 nm contra 0,1 M HCl como o branco.

A eficiência de encapsulação da rifampicina foi determinada então por espectroscopia como descrito acima, após as nanopartículas serem quebradas / abertas e a rifampicina liberada. Para a realização da quebra, 0,050 mL de cada suspensão de nanopartículas foi misturada com DMS (0,500 mL), misturada vigorosamente com um vórtex por 5min e mantida 37 °C overnight; uma alíquota de 0,100 mL foi coletada e diluída em HCl 0,1 M para um volume final de 1,0 mL, a absorbância das amostras foi então determinada a 337 nm, e a concentração do fármaco calculada utilizando a curva padrão da rifampicina.

#### 4.4 MICRORGANISMOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas o *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) e *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618), cepas de referência ATCC obtidos a partir da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. Também foi utilizado um isolado clínico (Mtb 551) com perfil multidroga resistente (isoniazida e rifampicina) fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN – PE).

#### 4.5 ANTIMICROBIANOS DE REFERÊNCIA

Os seguintes antibióticos foram utilizados como controle positivo de atividade: rifampicina, etambutol, levofloxacina, amicacina (Sigma Aldrich), solubilizados em solventes apropriados e padronizados a uma solução estoque de 10 mg/mL. Após solubilização, os fármacos e compostos foram aliquotados e congelados a – 20 °C.

#### 4.6 MEIO DE CULTURA BACTERIANO

As micobactérias foram cultivadas em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), com 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80. O tempo de incubação variou de 7 a 10 dias para a 37°C. Para contagem de colônias foi utilizado o meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC e 0,5% de glicerol, com tempo de incubação de 21 a 28 dias.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA *IN VITRO*

A atividade antimicobacteriana das nanopartículas foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima pelo método colorimétrico de microdiluição em placas de 96 poços, descrito por Palomino et al. (2002).

Com o propósito de evitar a evaporação do sistema de meio de cultura e amostras testes, devido ao longo período de incubação de até 15 dias, foram adicionados 200 µL de água destilada nos poços do perímetro externo da microplaca. Em microtubos de 1,5 ml foram preparadas separadamente 9 concentrações (8,25; 4,125; 3,3; 2,062; 1,238; 0,412; 0,206; 0,103 e 0,051 µg/mL) das amostras a serem testadas (Nano\_Vazia, Nano\_RIF e Rifampicina livre), misturadas ao caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol, 100 µL de cada concentração foi depositada nos poços referidos como testes restantes. Poços de controle positivo de crescimento do inóculo e controle de esterilidade do meio de cultura foram incluídos em todas as placas. A Rifampicina foi utilizada como controle de crescimento negativo, na

concentração de 8,25 µg/mL e no inóculo em meio como controle positivo de crescimento.

A cultura de Mtb H37Rv e MDR 1576, em fase logarítmica de crescimento, foi transferida para um tubo cônico contendo pérolas de vidro e PBS com 0,05% de Tween 80 e agitada em vórtex por dois minutos. Em seguida mantida em repouso vertical por quinze minutos, para permitir a deposição de grumos e redução de aerossol. O sobrenadante foi aspirado para outro tubo e padronizado com a escala nº 01 de Mc Farland. Posteriormente, foi realizado uma diluição de 1:20 (v/v) e 100 µL dessa suspensão ( $\sim 1,5 \times 10^7$  UFC/mL) adicionada nos poços apropriados. As placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias. Após o período de incubação, 30 µL de uma solução estéril de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% foi adicionada em todos os poços e mantidas overnight a 37°C, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. A CIM foi definida como a menor concentração da droga que preveniu a mudança de coloração de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido).

#### **4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (CC<sub>50</sub>)**

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado em placa de 96 poços de acordo com Mosmann (1983) e modificações. Foi utilizada a linhagem celular de macrófago murino J774A.1 (ATCC TIB-67). As células foram cultivadas em meio DMEM enriquecidos com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/mL e penicilina 100 U/mL). O cultivo foi mantido em incubadora a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular. As células foram retiradas da garrafa de crescimento e realizada a contagem das células com o auxílio do azul de Tripán em câmara de Neubauer. Em seguida foi realizado o ajuste no número de células para que no semeio houvesse  $2 \times 10^5$  células por poço. Após a adição das células nos poços, a placa foi levada para incubadora por 24h nas mesmas condições iniciais de cultivo para permitir a adesão celular. As 9 concentrações (8,25; 4,125; 3,3; 2,062; 1,238; 0,412; 0,206; 0,103 e 0,051 µg/mL) das amostras testes foram preparadas em meio de cultura celular e 100 µL de cada concentração foi depositada nos poços contendo células aderidas e levadas a incubadora mais 24h. Poços controle foram utilizados apenas com células e meio de cultura, bem como o controle do DMSO em meio (1%). Após 24h de exposição foi adicionado 50 µL da

solução de MTT em PBS (5mg/mL), incubadas a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por três horas e protegida de luz direta. Após esse período o meio foi aspirado, e 100 µL de DMSO foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT em células viáveis. A absorbância de cada poço foi medida através do filtro de 540nm em leitor de placas.

#### **4.9 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VITRO***

Foi utilizado o método clássico checkerboard de microdiluição bidimensional para avaliar a interação entre fármacos antimicrobianos e os compostos sintéticos selecionados (LORIAN, 2005). Rifampicina e etambutol foram utilizados como antibióticos de primeira linha; amicacina e levofloxacina como antibióticos de segunda linha. No eixo X da placa de 96 poços foi distribuído, através de concentrações pré-estabelecidas (4,125; 3,3; 2,062; 1,238; 0,412; 0,206; 0,103 µg/mL), o antimicrobiano de referência e no eixo Y as nanopartículas (Nano\_RIF). Em seguida, 100 µL da suspensão das cepas de Mtb sensível (H37Rv) e multidroga resistente (551) foram ajustadas em  $1 \times 10^7$  UFC/mL e adicionadas em todos os poços. Foram reservados poços de controle de crescimento positivo do inóculo (meio 7H9 suplementado e bactéria) e controle de esterilidade do meio (apenas caldo 7H9 suplementado). As placas foram cobertas por suas tampas, seladas com plástico filme e incubadas a 37 °C, em atmosfera normal, por 7 a 10 dias. Após o período de incubação, 30 µL da solução de resazurina a 0,02% foi adicionada em todos os poços da microplaca. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24h. A mudança da coloração de azul para rosa (resazurina reduzida pela presença de viabilidade celular) indicou o crescimento micobacteriano. Os resultados foram interpretados pelo índice de concentração inibitória fracionado (FICI) (conforme a fórmula 1), onde FIC A é o quociente entre a concentração inibitória mínima do antibiótico “A” na presença do composto “B” e a concentração inibitória mínima do antibiótico “A” isolado. Valores de  $FICI \leq 0.50$  foram considerados como compostos sinérgicos;  $> 0.50$  a 4.0, indiferentes; e  $> 4$ , antagônicos. Resultados sinérgicos foram representados graficamente através de isobogramas (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013).

$$\sum FICI = FIC A + FIC B \quad (1)$$

Onde:  $FIC A = CIM A$  na presença de  $B / CIM A$

$FIC B = CIM B$  na presença de  $A / CIM B$

#### 4.10 CINÉTICA DE MORTE MICOBACTERIANA

O método de avaliação de cinética de morte tem como objetivo caracterizar a atividade de um determinado agente antimicrobiano ao longo do tempo, ou seja, indicar uma ação bactericida ou bacteriostática da substância avaliada. (GÓMARA; RAMÓN-GARCÍA, 2019). Neste sentido, um inóculo padronizado com uma densidade de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL de *M. smegmatis* na fase logarítmica de crescimento foi ressuspenso em caldo 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,2% de glicerol. Alíquotas dessa suspensão foram distribuídas em tubos cônicos de 50 mL contendo caldo 7H9-suplementado e nas seguintes condições: controle (sem inibidor); 1 x CIM de rifampicina; 1 x CIM Nano\_Rifa. Todos os tubos foram colocados em incubadora a 37 °C e agitação de 120 rpm (LORIAN, 2005). Para quantificar o número de bactérias viáveis ao longo do tempo, amostras de 100 µL foram retiradas de todos os tubos, a partir do tempo 0h, e realizado diluições seriadas decimais em PBS com 0,05% de Tween 80. As alíquotas foram coletadas no tempo 0, 5 e 10 dias para *Mtb*. Essas amostras foram plaqueadas em ágar Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC e 0,5% de glicerol e colocadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 21 a 28 dias (*Mtb*) (GARIMA et al., 2015). Após esse período foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônia e resultado plotado em gráfico em escala logarítmica de base 10 versus tempo. O experimento foi realizado em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

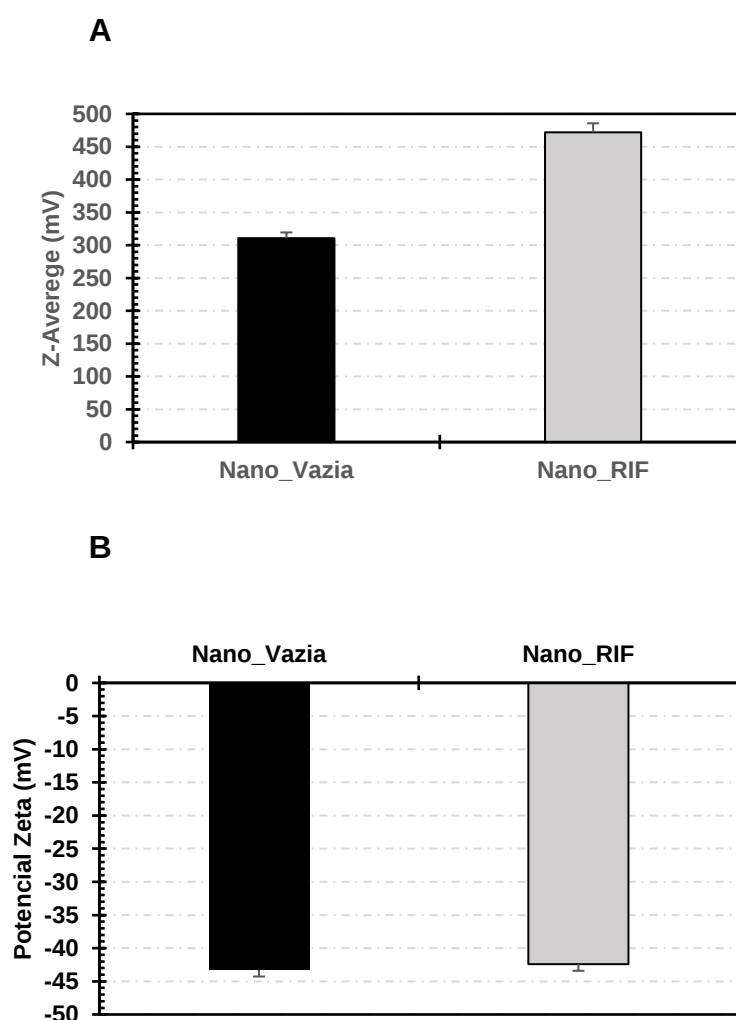
O regime de tratamento da tuberculose sensível atualmente usado em alguns países em desenvolvimento é uma combinação de dose fixa e comprimido único de quatro medicamentos: RIF, INH, PZA e etambutol (EMB) por 2 meses, seguido por 4 meses de INH-RIF e/ou EMB. A combinação multidrogas é empregada na fase intensiva do tratamento na tentativa de reduzir a resistência primária à combinação INH-RIF. As drogas antituberculares (ATT) são conhecidas por serem majoritariamente metabolizadas e desintoxicadas no fígado por ambos os grupos Fase I e Fase II de enzimas metabolizadoras de drogas. Essas drogas, assim como seus metabólitos, são tóxicas e durante esse processo causam lesões no fígado (Singh et al., 2011).

A Rifampicina é um antimicrobiano com potente poder bactericida, no qual ao longo dos anos, vem sendo atribuído ao crescente número de cepas droga resistentes de tuberculose. Apesar de sua importância no tratamento da doença, devido a via de administração oral, a baixa solubilidade e ao processo de metabolização até a excreção do antimicrobiano, muito dele se desfaz no organismo até alcançar o sítio de infecção. Junto a isso, a dosagem e o tempo de utilização da Rifampicina durante o tratamento ocasionam efeitos colaterais como cefaléia, fadiga, confusão mental e até mesmo hepatotoxicidade. Este é um dos parâmetros, que levam o paciente a abandonar o tratamento, contribuindo assim na falha da terapia e o surgimento de cepas droga resistentes (Trousil e Hrubý, 2017; Prabhu et al, 2021; ).

Novas estratégias de tecnologias farmacêuticas eficazes, através da nanomedicina buscam melhorar o índice terapêutico de novas e antigas drogas. Tendo em vista que nanopartículas apresentam melhor tempo de meia vida que fármacos livres, podem ser direcionadas a um alvo específico, muitas vezes não ativam o sistema complemento e em alguns casos driblam a resistência atrelada a algum medicamento. Desta forma, este estudo buscou desenvolver nanopartículas poliméricas de PIBCA, revestidas com fucana, encapsulando a Rifampicina, antimicrobiano já usado contra tuberculose, buscando assim melhorar seu índice terapêutico, bem como a resistência atrelada ao fármaco.

### 5.1 TAMANHO, CARGA DE SUPERFÍCIE E TAXA DE ENCAPSULAMENTO

É descrito na literatura que para o desenvolvimento de uma nanopartícula polimérica é necessária uma metodologia de aprisionamento, bem como análises que comprovem a construção deste nanoparticulado (Zielińska et al. 2020). Para isso podemos observar que a metodologia aplicada promoveu a formação de nanopartículas que apresentaram tamanhos diferente quando da presença da rifampicina na preparação, onde a diferença de z-average entre a nano vazia e contendo rifampicina foi superior a 100nm (Figura 2A); a cobertura de fucana pode ser confirmada pela alta carga negativa presente na superfície das duas preparações (Figura 2).

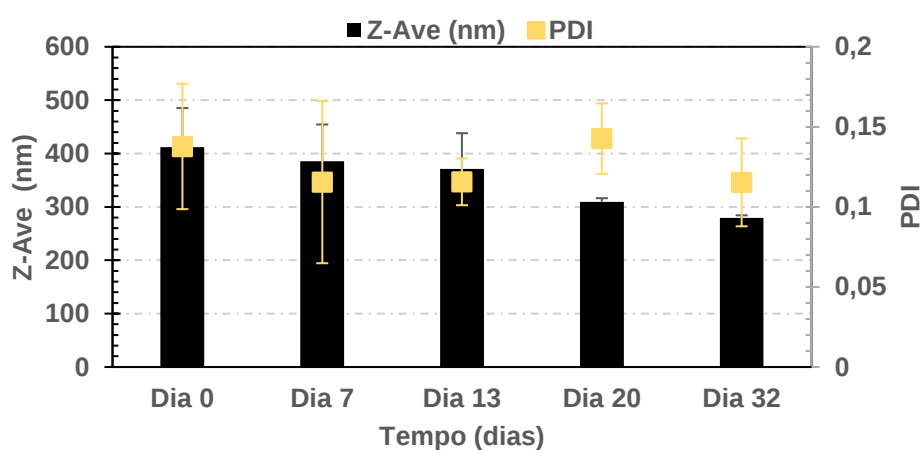


**Figura 2** Comparação do (A) z-average (nm) e (B) potencial zeta (mV) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana vazias (Nano\_Vazia) e carregadas com Rifampicina (Nano\_RIF). As amostras foram diluídas 1:20 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).

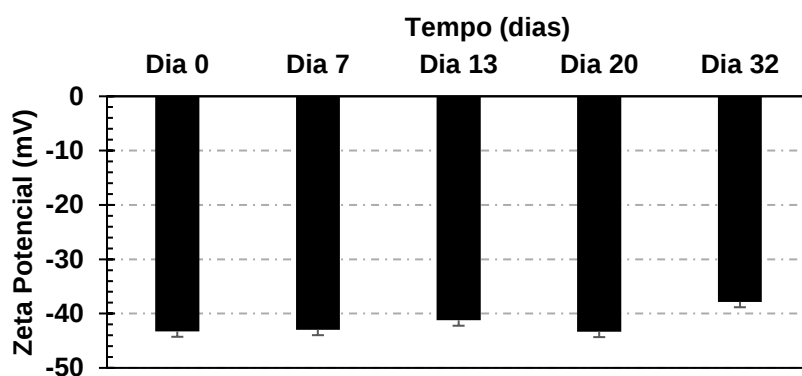
Podemos observar na Figura 3A que o armazenamento das Nano\_Vazia a 4 °C promoveu uma redução no seu tamanho ao longo de 30 dias, variando de 400 nm

a 280 nm, indicando uma instabilidade do sistema em meio aquoso; o mesmo não foi observado nas Nano\_RIF (Figura 3B) que manteve a faixa de 450 nm. A carga negativa demonstrada através do potencial zeta pelas formulações, onde Nano\_Vazia apresentou  $-44,3 \pm 0,6$  mV e Nano\_RIF  $-47,9 \pm 0,6$  mV, corrobora com achados na literatura. De acordo Lira et al. 2011 e Cavalcanti et al. 2021, nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana possuem tamanho em torno de  $399 \pm 0,70$  nm e carga de superfície negativa ( $-44,20 \pm 1,00$  mV). Esta carga de superfície negativa, segundo os estudos é o que comprova a presença da fucana na superfície da partícula.

**A**

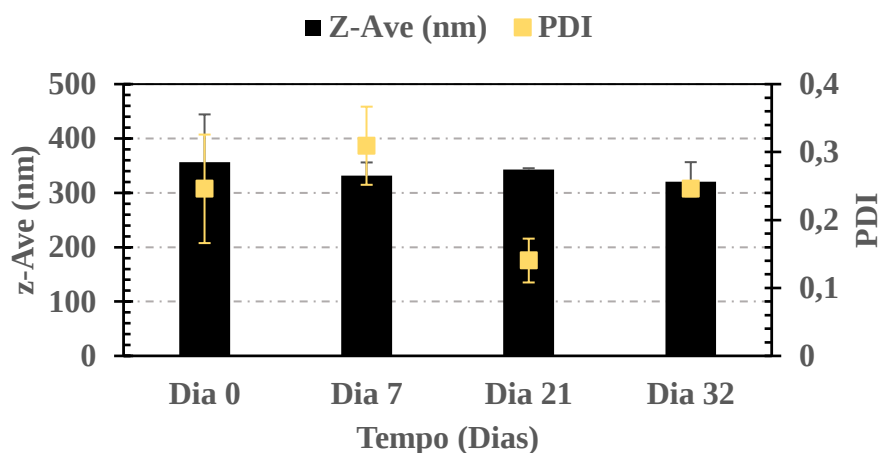


**B**

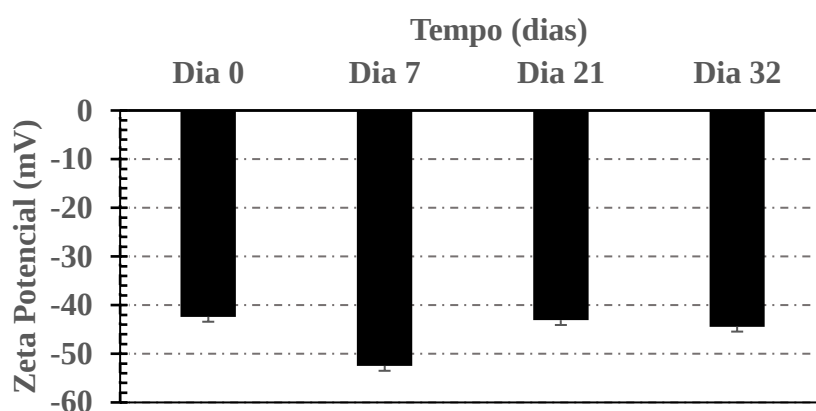


**Figura 3** Avaliação da estabilidade de (A) Z-Ave (diâmetro hidrodinâmico) e (B) potencial zeta (carga de superfície) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana armazenada a temperatura de 4 °C. As amostras foram diluídas 1:100 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).

A



B

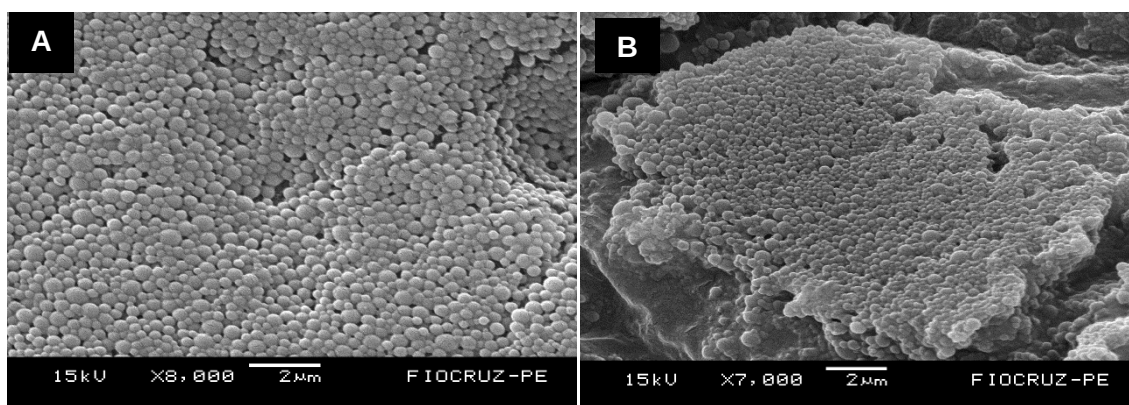


**Figura 4** Avaliação da estabilidade de (A) Z-Ave (diâmetro hidrodinâmico) e (B) potencial zeta (carga de superfície) das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana carregadas com Rifampicina armazenada a temperatura de 4 °C. As amostras foram diluídas 1:100 e analisadas em triplicatas usando um ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).

Para quantificação da Rifampicina utilizando espectroscopia de UV-Vis foram realizadas curvas padrão do fármaco e a taxa de encapsulação variou entre 40 e 50%. Tendo em vista o método de preparação do nanoparticulado, a perda é atribuída a capacidade lipofílica do antimicrobiano (Choksh et al, 2021).

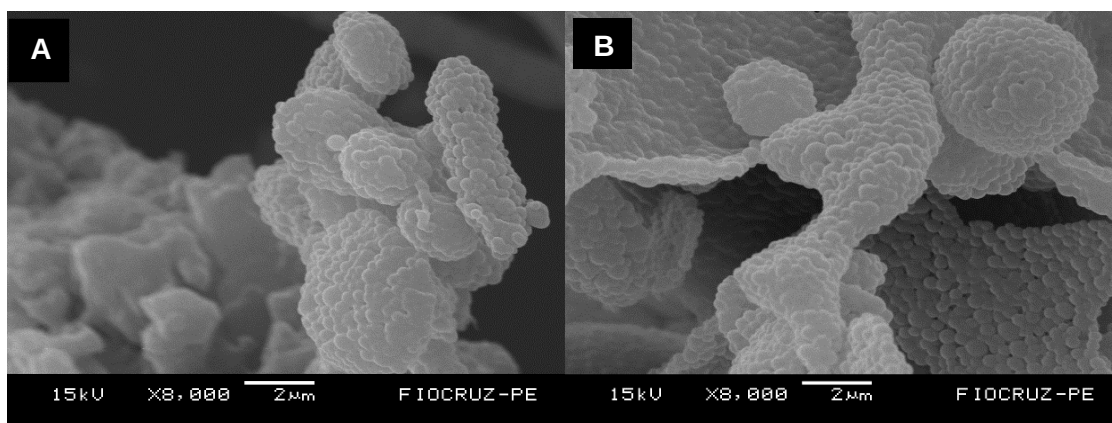
## 5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido amplamente utilizada para análise morfológica de nanopartículas, principalmente poliméricas (Bohrey et al, 2016). Assim como Chauvierre et al., Lira et al. e Cavalcanti et al. as Nano\_Vazia e Nano\_RIF apresentaram forma arredondadas e distribuição homogênea (Figura 5).



**Figura 5** Morfologia e distribuição de nanopartículas de PIBCA revestida de fucana liquidas, Nano\_Vazia (A) e Nano\_RIF (B) por microscopia eletrônica de varredura.

A fim de verificar se o processo de liofilização poderia interferir no tamanho ou forma, também foi realizado MEV deste do material seco, onde podemos observar que em ambas as formulações (Figura 6) as características se mantiveram.



**Figura 6** Morfologia e distribuição de nanopartículas de PIBCA revestida de fucana secas, Nano\_Vazia (A) e Nano\_RIF (B) por microscopia eletrônica de varredura.

## 5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA *IN VITRO*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é uma das abordagens, baseadas em células bacterianas, mais utilizadas para análise de atividade antimicrobiana, principalmente em triagem de novas drogas. (COOPER,

2013). Desta forma analisamos o potencial antimicobacteriano das nanopartículas em cepas de referência ATCC H37Ra e H37Rv. A fim de analisar a resposta do sistema contra cepas resistentes de tuberculose, também utilizamos isolado clínico de uma paciente MDR-TB 551, com perfil resistente a Isoniazida e Rifampicina (Tabela 1).

**Tabela 3** Avaliação concentração inibitória mínima (CIM).

| Composto    | CIM H37Ra    | CIM H37Rv   | CIM MDR 551 |
|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Nano_RIF    | 0,103µg/ml   | 0,412µg/ml  | 1,238µg/ml  |
| Rifampicina | < 0,051µg/ml | 0,103µg/ml  | 8,25µg/ml   |
| Nano_Vazia  | > 8,25µg/ml  | > 8,25µg/ml | > 8,25µg/ml |

**Fonte:** Pelo autor, 2022

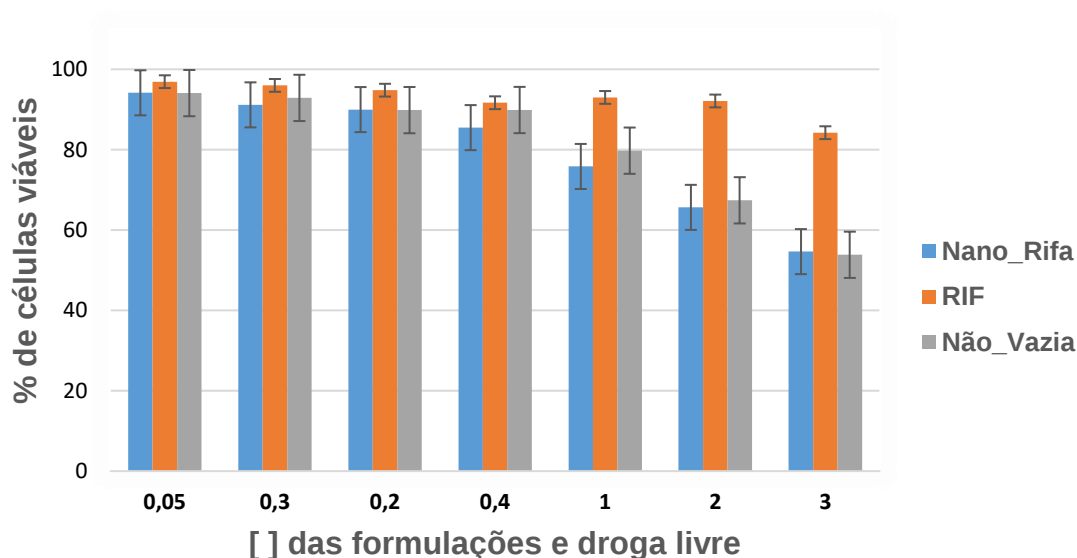
Como exposto na tabela 3 a Rifampicina livre manteve atividade antimicobacteriana menor que a formulação, com CIM de 0,103µg/ml para cepa sensível, resultado que corrobora com a literatura. Entretanto o CIM demonstrado pela Nano\_Rifa (CIM = 0,412µg/ml) é considera satisfatório quando falamos de inibição do Mtb (Kumarasingam et al, 2018). Contra cepa resistente observamos CIM menor em Nano\_RIF (CIM = 1,238µg/ml) com relação ao fármaco livre (CIM = 8,25µg/ml), tendo em vista que esta cepa é resistente a Rifampicina, podemos sugerir que a encapsulação driblou a resistência atribuída ao fármaco.

Para o melhoramento do uso da RIF na clínica, encontramos diversos estudos que utilizaram outros polímeros para formar as nanopartículas como: a quitosana e monose (Prabhu et al, 2021), a albumina de Soro Bovino (Joshi et al, 2021) entre outros. Estudos realizados por Cunha et al, 2018, utilizando a fucana da espécie *Focus vesiculosus* para encapsular uma combinação de dois fármacos (isoniazida e rifabutina) em microcápsulas conseguiu obter um CIM na ordem de 0,008 µg/ml contra cepa sensível de tuberculose. Utilizando a fucana e o PIBCA contra o Mtb temos estudos principalmente com intuito de diminuir a citotoxicidade do composto testado, como estudos de Carvalho et al. 2016 e Saviano et al, 2021.

#### 5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (CC<sub>50</sub>)

O ensaio de citotoxicidade é de extrema importância, para desenvolvimento de novas drogas e consequentemente dos produtos nanotecnológicos, quando voltados para a terapia medicamentosa. Tendo em vista que o Mtb se reproduz

intracelularmente em macrófagos e o alvo das nanopartículas testadas são receptores presentes em membranas destas mesmas células, utilizamos para análise da citotoxicidade a linhagem celular J774A.1 (macrófago de murinos) (Figura 7). (Huang et al, 2019; Sai and Rengarajan, 2019)



**Figura 7** CC<sub>50</sub> de Nano\_RIF, Rifampicina e Nano\_Vazia frente a linhagem celular J774A.1 num período de 24h. Os resultados apresentados são a média de três experimentos independentes.

Como exposto no gráfico acima podemos observar que o fármaco livre mostrou maior citotoxicidade que as formulações. No entanto a concentração de Nano\_RIF capaz de inibir a atividade das cepas testadas H37Ra (0,103µg/ml), H37Rv (0,412µg/ml) e MDR 551 (1,238µg/ml) manteve viabilidade celular entre 80% e 96%. Cunha et al, 2018 também realizou ensaio de CC<sub>50</sub> porém em outras linhagens celulares (A549 e THP-1) e manteve viabilidade celular entre 65% e 76%.

Saviano et al, 2021 que testou um composto novo encapsulado por lipossomas e utilizando a fucana como molécula sinalizadora, observou que o composto com fucana mostrou uma tendência menor de citotoxicidade. Este estudo utilizou a linhagem celular RAW 264.7 que também são macrófagos de murinos. Apesar das formulações apresentarem CC<sub>50</sub> mais baixo que o fármaco livre, foram mantidos mais de 50% de células viáveis e junto a um CIM satisfatório para cepa sensível e resistente a Nano\_RIF se torna um candidato a continuação dos ensaios *in vitro*.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

Tendo em vista que o tratamento da tuberculose é composto por várias drogas que usam inúmeros caminhos para combater o bacilo, é necessário a análise da interação do nanopartículas propostas com alguns antimicrobianos (Tabela 4 e 5).

**Tabela 4** FIC entre Nano\_Rifa e antimicrobianos contra cepa H37Rv

|            | Antimicrobiano | FIC | Classificação |
|------------|----------------|-----|---------------|
| NANO_RIF + | Rifampicina    | 2,0 | indiferente   |
|            | Etambutol      | 1,0 | indiferente   |
|            | Amicacina      | 4   | indiferente   |
|            | Levofloxacino  | 3,5 | indiferente   |

Fonte: O autor, 2022

O intuito da análise de interação farmacológica é avaliar se o nanoparticulado desenvolvido pelo estudo ira se mostrar, sinérgico, indiferente ou antagônico. A sinergia está associada a capacidade de um fármaco atuar junto a outro, potencializando o efeito de um ou ambos. A indiferença implica que uma droga não potencializa, bem como não interfere na ação da outra. O antagonismo resulta na interferência prejudicial na ação dos medicamentos testados. ((BHUSAL; SHIOHIRA; YAMANE, 2005)

**Tabela 5** FIC entre Nano\_Rifa e antimicrobianos contra MDR 551

|             | Antimicrobiano | FIC | Classificação |
|-------------|----------------|-----|---------------|
| NANO_RIFA + | Etambutol      | 1,0 | indiferente   |
|             | Amicacina      | 2,0 | indiferente   |
|             | Levofloxacino  | 3,5 | indiferente   |

Fonte: O autor, 2022

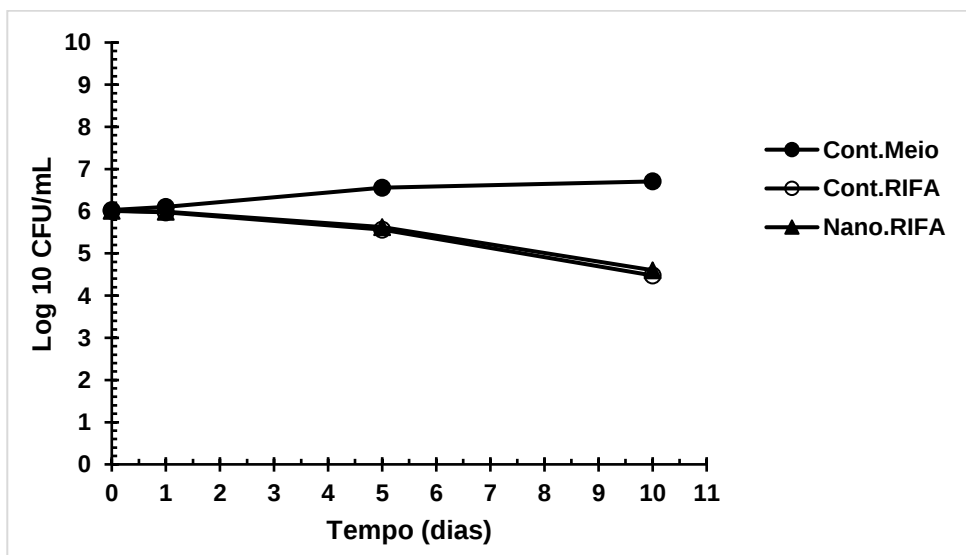
Os antimicrobianos avaliados junto as formulações foram rifampicina, etambutol, amicacina e levofloxacino, utilizados no tratamento contra cepa sensível e resistente de tuberculose. Tendo em vista que o isolado clínico MDR 551 é resistente a rifampicina, ela não entrou para esta análise. Como mostram os resultados das tabelas 4 e 5, podemos observar que a Nano\_RIF se mostrou indiferente a todos os antimicrobianos, quando utilizados em conjunto, tanto para cepa sensível quanto para

resistente. Desta forma podemos concluir que a formulação de Nano\_RIF não interfere na ação de nenhum desses antimicobacterianos, consequentemente não prejudica o tratamento da doença.

## 5.6 CINÉTICA DE MORTE MICOBACTERIANA

A rifampicina é conhecida como um dos antimicobacterianos com maior poder bactericida (Trousil and Hrubý, 2017). Para analisar se a Nano\_RIF iria manter o potencial bactericida do fármaco livre, realizamos o ensaio de cinética de morte. Assim podemos avaliar o crescimento e morte, em função do tempo, de uma determinada concentração da formulação observando o potencial bactericida ou bacteriostático. (Müller; Dela Peña; DERENDORF, 2004)

Para a realização do ensaio de cinética de morte foram utilizados a Nano\_RIF, e como controles a Rifampicina livre e a bactéria somente em meio específico, favorável a seu crescimento. O experimento foi realizado em cepa sensível H37Rv. Como exposto na figura 8 podemos observar que, a diferença de redução de colônias do fármaco livre e da nanopartícula foram semelhantes. Desta forma podemos deduzir que a capacidade bactericida do antimicobacteriano foi mantida.



**Figura 8** Influência da Nano\_RIF na cinética de morte do *M. tuberculosis*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo demostramos que foi possível realizar uma nanoformulação de PIBCA revestida com Fucana como molécula sinalizadora e encapsular a Rifampicina. Mostramos ainda que a formulação assim como na literatura, tem morfologia esférica e se mostrou estável ao longo do tempo.

A partir dos testes *in vitro* podemos constatar que a Nano\_RIF possui ação contra isolado clínico resistente ao fármaco que foi encapsulado, sugerindo assim que a formulação teria capacidade de driblar a resistência. Comprovamos ainda que, a nanopartícula não prejudica na ação dos antimicobacterianos utilizados contra cepas sensíveis e resistentes e que o potencial bactericida do fármaco foi mantido na formulação.

Além disto, foi possível observar que a formulação apresenta baixa toxicidade celular, tendo em vista manteve mais de 50% de viabilidade celular. A validação de uma formulação para este fim, vai muito além destes ensaios realizados. Mesmo assim, com os resultados obtidos podemos concluir que, a Nano\_RIF é um candidato a continuação de ensaios *in vitro* e *in vivo* como proposta de um potencial agente como opção para o tratamento da tuberculose.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA DA SILVA, Pedro Eduardo; PALOMINO, Juan Carlos. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1317-1330, 2011.
- APOSTOLOVA, Elisaveta et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 2338, 2020.
- ASHAYERIZADEH, Omid; DASTAR, Behrouz; POURASHOURI, Parastoo. Study of antioxidant and antibacterial activities of depolymerized fucoidans extracted from *Sargassum tenerrimum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1259-1266, 2020.
- BELATTMANIA, Zahira et al. Isolation and FTIR-ATR and <sup>1</sup>H NMR characterization of alginates from the main alginophyte species of the atlantic coast of Morocco. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4335, 2020.
- BOHREY, Sarvesh; CHOURASIYA, Vibha; PANDEY, Archana. Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. **Nano Convergence**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2016.
- CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R. et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660-663, 2013.
- CANO, Amanda et al. Dual-drug loaded nanoparticles of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)/Ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of EGCG in a APPswe/PS1dE9 Alzheimer's disease mice model. **Journal of Controlled Release**, v. 301, p. 62-75, 2019.
- CAVALCANTI, Iago Dillion Lima et al. Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, p. 102698, 2021.
- CHOKSHI, Nimitt V. et al. Fabrication and Characterization of Surface Engineered Rifampicin Loaded Lipid Nanoparticulate Systems for the Potential Treatment of Tuberculosis: An In Vitro and In Vivo Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 5, p. 2221-2232, 2021.
- CITKOWSKA, Aleksandra; SZEKALSKA, Marta; WINNICKA, Katarzyna. Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 458, 2019.
- COHEN, Keira A. et al. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges. **Genome Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2019.
- CRUCHO, Carina IC; BARROS, Maria Teresa. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

CUNHA, Ludmylla et al. Inhalable fucoidan microparticles combining two antitubercular drugs with potential application in pulmonary tuberculosis therapy. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 636, 2018.

CUNHA, Ludmylla et al. Spray-dried fucoidan microparticles for pulmonary delivery of antitubercular drugs. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 4, p. 392-405, 2018.

DANGERFIELD, Emma M. et al. Tuberculosis: Bugs Versus Drugs Part 1. **Chemistry in Australia**, v. 77, n. 4, p. 17-21, 2010.

DE OLIVEIRA, Valentina Nascimento Melo et al. Synthesis of alkynylated 1, 2, 4-oxadiazole/1, 2, 3-1H-triazole glycoconjugates: Discovering new compounds for use in chemotherapy against lung carcinoma and Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 220, p. 113472, 2021.

DESSEN, Andrea et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of Mycobacterium tuberculosis. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1638-1631, 1995.

DHEDA, Keertan et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The lancet Respiratory medicine**, v. 5, n. 3, p. 291-360, 2017

DOOKIE, Navisha et al. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1138-1151, 2018.

DUARTE, R. et al. Tuberculosis treatment and management of some problems related to the medication. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 16, n. 4, p. 559-572, 2010.

DUBE, Devyani; AGRAWAL, Govind P.; VYAS, Suresh P. Tuberculosis: from molecular pathogenesis to effective drug carrier design. **Drug discovery today**, v. 17, n. 13-14, p. 760-773, 2012.

EHRT, Sabine; SCHNAPPINGER, Dirk; RHEE, Kyu Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 496-507, 2018.

EMANE, Amel Kevin Alame et al. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 129, p. 102091, 2021.

FARHAT, Maha R. et al. Rifampicin and rifabutin resistance in 1003 Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 6, p. 1477-1483, 2019.

FITTON, J. Helen et al. Therapies from fucoidan: New developments. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, p. 571, 2019.

GANGADHARAM, Pattisapu RJ; JENKINS, P. Anthony. **Mycobacteria: I basic aspects**. Springer Science & Business Media, 1997.

GARBUZENKO, Olga B. et al. Biodegradable Janus nanoparticles for local pulmonary delivery of hydrophilic and hydrophobic molecules to the lungs. **Langmuir**, v. 30, n. 43, p. 12941-12949, 2014.

GÓMARA, Marta; RAMÓN-GARCÍA, Santiago. The FICI paradigm: Correcting flaws in antimicrobial in vitro synergy screens at their inception. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, p. 299-307, 2019.

GOOSSENS, Sander N.; SAMPSON, Samantha L.; VAN RIE, Annelies. Mechanisms of drug-induced tolerance in Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. e00141-20, 2020.

GRANGE, John; ZUMLA, Alimuddin. Tuberculosis. In: COOK, Gordon C.; ZUMLA, Alimuddin (org.). **Manson's Tropical Diseases**. [s.l.] : Elsevier Health Sciences, 2008. p. 1800. ISBN: 070204332X.

GROSSET, Jacques et al. Once-weekly rifapentine-containing regimens for treatment of tuberculosis in mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 5, p. 1336-1330, 1998

HAUCK, T. S.; GIRI, S.; GAO, Y.; CHAN, W. C. W. Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries. **Advanced Drug Delivery Review**. v. 62, p. 438-448, 2010.

HUANG, Lu; NAZAROVA, Evgeniya V.; RUSSELL, David G. Mycobacterium tuberculosis: bacterial fitness within the host macrophage. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 7.2. 04, 2019.

JOSHI, Monica; YADAV, Khushwant S.; PRABHAKAR, Bala. Quality by Design Approach for Development and Optimization of Rifampicin Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles and Characterization. **Current Drug Delivery**, v. 18, n. 9, p. 1338-1351, 2021.

KAMALY, Nazila et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. **Chemical reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

KAUR, Indu Pal; SINGH, Harinder. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. **Journal of Controlled Release**, v. 184, p. 36-50, 2014.

KHAN, Fazlurrahman et al. Fucoidan-stabilized gold nanoparticle-mediated biofilm inhibition, attenuation of virulence and motility properties in Pseudomonas aeruginosa PAO1. **Marine drugs**, v. 17, n. 4, p. 208, 2019.

KIESER, Karen J.; RUBIN, Eric J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 550-562, 2014.

KIM, K.Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 103–110, 2007.

KIM, W. S.; ORDIJA, C. M.; FREEMAN, M. W. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, p. 542–549, 2003.

KIM, Woojin Scott; ORDIJA, Christine M.; FREEMAN, Mason W. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 310, n. 2, p. 542-549, 2003.

KOCH, Robert. A further communication on a remedy for tuberculosis. **British medical journal**, v. 1, n. 1568, p. 125, 1891.

KOLYVA, Anastasia S.; KARAKOUSIS, Petros C. Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance. **Understanding Tuberculosis-New approaches to fighting against drug resistance**, 2012.

KUMARASINGAM, Kalaiselvi et al. Enhancing antimycobacterial activity of isoniazid and rifampicin incorporated norbornene nanoparticles. **International journal of mycobacteriology**, v. 7, n. 1, p. 84, 2018.

LEE, Woo J. et al. Non-tuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 29 cases. **The Journal of dermatology**, v. 37, n. 11, p. 965-972, 2010.

LI, Bo et al. Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1671-1695, 2008.

LIM, Young H. et al. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 6, p. 842-871, 2016.

LIMA SALVIANO, Taciana et al. Fucoidan-Coated Liposomes: A Target System to Deliver the Antimicrobial Drug Usnic Acid to Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 17, n. 8, p. 1699-1710, 2021.

LIRA, M. C. B. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 162-170, 2011.

LIRA, Mariane CB et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2009.

LIU, Philip T.; MODLIN, Robert L. Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 4, p. 371-376, 2008.

LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine, Lippincott. **Williams and Wilkins, Philadelphia, PA**, 2005.

LUO, Ming-Xin; HUA, Shan; SHANG, Qi-Yun. Application of nanotechnology in drug delivery systems for respiratory diseases. **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 5, p. 1-17, 2021.

MACIEL, Marina de Souza et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revista da Sociedade Brasileira de**, v. 10, n. 3, p. 226-30, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Boletim epidemiológico Tuberculose 2021**, 2022. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-tuberculose-2021> > Acesso em fevereiro de 2022.

MIOTTO, Paolo et al. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. **Respirology**, v. 23, n. 12, p. 1098-1113, 2018.

MITCHELL, Michael J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 2, p. 101-124, 2021.

MOSMANN, Tim. 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, 1983.

ORGEUR, Mickael; BROSCH, Roland. Evolution of virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. **Current opinion in microbiology**, v. 41, p. 68-75, 2018.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PRABHU, Pratiksha et al. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles for delivery of Rifampicin to Osteoarticular tuberculosis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 4, p. 1509-1519, 2021.

RABAHI, Marcelo Fouad et al. Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 372-386, 2017.

RAJESHKUMAR, S. et al. Anticancer, Enhanced Antibacterial, and Free Radical Scavenging Potential of Fucoidan-(Fucus vesiculosus Source) Mediated Silver Nanoparticles. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

RAMAN, Subashini et al. Polymeric nanoparticles for brain drug delivery-a review. **Current drug metabolism**, v. 21, n. 9, p. 649-660, 2020.

RETA, Melese Abate et al. Prevalence of drug resistance-conferring mutations associated with isoniazid-and rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 26, p. 207-218, 2021.

ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 525-532, 2002.

ROZWARSKI, Denise A. et al. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. **Science**, v. 279, n. 5337, p. 98-102, 1998

SALEHI, Bahare et al. Current trends on seaweeds: Looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4182, 2019.

SHLEEVA, Margarita O. et al. Dormant ovoid cells of Mycobacterium tuberculosis are formed in response to gradual external acidification. **Tuberculosis**, v. 91, n. 2, p. 146-154, 2011.

SIA, Jonathan Kevin; RENGARAJAN, Jyothi. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, p. 7.4. 6, 2019.

SPIES, Fernanda Sá. Determinação do custo biológico em isolados de Mycobacterium tuberculosis com mutações nos genes rpsL, rrs, gidB, rpoB e katG. 2011.

SWETLEDGE, Sean et al. Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: Implications in ocular disease therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2021.

TROUSIL, Jiří; HRUBÝ, Martin. Novel nanoparticle delivery systems for rifampicin: an effective strategy against tuberculosis?. **Nanomedicine**, v. 12, n. 12, p. 1359-1361, 2017.

VASAVA, Mahesh S. et al. Drug development against tuberculosis: past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 63, n. 3, p. 252-275, 2017.

WANG, Yu et al. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. **Marine Drugs**, v. 17, n. 3, p. 183, 2019.

WHO. **Treatment of Tuberculosis: Guidelines**. Geneva: World Health Organization, 2010.

XU, Ge et al. Mechanisms and detection methods of Mycobacterium tuberculosis rifampicin resistance: The phenomenon of drug resistance is complex. **Tuberculosis**, v. 128, p. 102083, 2021.

ZAW, Myo T.; EMRAN, Nor A.; LIN, Zaw. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 605-610, 2018.

ZHANG, Jianling et al. Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. **Microbiology and immunology**, v. 49, n. 9, p. 845-852, 2005.

ZIELIŃSKA, Aleksandra et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 388-404, 2013.



Copyright © 2021 American Scientific Publishers  
All rights reserved  
Printed in the United States of America

## APÊNDICE A

Article

Journal of  
Biomedical Nanotechnology  
Vol. 17, 1–12, 2021  
[www.aspbs.com/jbn](http://www.aspbs.com/jbn)

# Fucoidan-Coated Liposomes: A Target System to Deliver the Antimicrobial Drug Usnic Acid to Macrophages Infected with *Mycobacterium tuberculosis*

Taciana Lima Salviano<sup>1</sup>, Daniel Charles dos Santos Macedo<sup>1</sup>, Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho<sup>1</sup>, Marcela Araújo Pereira<sup>1</sup>, Vanessa Santos de Arruda Barbosa<sup>3</sup>, Jaciana dos Santos Aguiar<sup>3</sup>, Fabrício Oliveira Souto<sup>1,4</sup>, Maria da Paz Carvalho da Silva<sup>1</sup>, Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel<sup>5</sup>, Luanna de Ângelis Correia de Sousa<sup>5</sup>, Sidicleia Bezerra Costa Silva<sup>6</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>3</sup>, Alexandre José da Silva Góes<sup>3</sup>, Nereide Stela Santos Magalhães<sup>1,\*</sup>, and Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

<sup>2</sup>Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 55608-680, Brazil

<sup>3</sup>Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

<sup>4</sup>Agreste Academic Center, Federal University of Pernambuco, Caruaru, 55014-900, Brazil

<sup>5</sup>Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Institute, Recife, 50670-901, Brazil

<sup>6</sup>Department of Fundamental Chemistry, Hybrid Interface and Colloid Compound Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

The present study describes the use of fucoidan, a negative sulfated polysaccharide, as a coating material for the development of liposomes targeted to macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. First, fucoidan was chemically modified to obtain a hydrophobized-fucoidan derivative (cholesteryl-fucoidan) using a two-step microwave-assisted ( $\mu$ W) method. The total reaction time was decreased from 14 hours to 1 hour while maintaining the overall yield. Cholesteryl-fucoidan was then used to prepare surface-modified liposomes containing usnic acid (UA-LipoFuc), an antimicrobial lichen derivative. UA-LipoFuc was evaluated for mean particle size, polydispersity index (PDI), surface charge ( $\zeta$ ), and UA encapsulation efficiency. In addition, a cytotoxicity study, competition assay and an evaluation of antimycobacterial activity against macrophages infected with *M. tuberculosis* (H37Ra) were performed. When the amount of fucoidan was increased (from 5 to 20 mg), vesicle size increased (from  $168 \pm 2.82$  nm to  $1.18 \pm 0.01$   $\mu$ m). Changes in  $\zeta$  from  $+20 \pm 0.41$  mV for uncoated liposomes to  $-5.41 \pm 0.23$  mV for UA-LipoFuc suggested that the fucoidan was placed on the surface of the liposomes. UA-LipoFuc exhibited a lower  $IC_{50}$  ( $8.26 \pm 1.11$   $\mu$ M) than uncoated liposomes ( $18.37 \pm 3.34$   $\mu$ M), probably due to its higher uptake. UA-LipoFuc<sub>s</sub> was internalized through the C-type carbohydrate recognition domain of the cell membrane. Finally, usnic acid, both in its free form and encapsulated in fucoidan-coated liposomes (UA-LipoFuc<sub>s</sub>), was effective against infected macrophages. Hence, this preliminary investigation suggests that encapsulated usnic acid will aid in further studies related to infected macrophages and may be a potential option for tuberculosis treatment.

**KEYWORDS:** Nanocarriers, Polysaccharide, Fucoidan, Usnic Acid, Macrophages, Tuberculosis.

## INTRODUCTION

Treatments for intracellular diseases result from the combination of new strategies aimed at improving the therapeutic

efficacy of drugs and advances that decrease their possible undesirable systemic effects [1, 2]. A remarkable approach to improving the treatment of infectious diseases has been the use of drug delivery systems, which have significant advantages compared to treatments using nonencapsulated drugs [3, 4]. Liposomes, an example drug delivery system, are sphere-shaped vesicles consisting of one or more phospholipid bilayers that can encapsulate hydrophilic and

\*Authors to whom correspondence should be addressed.  
Emails: [nereide.magalhaes@ufpe.br](mailto:nereide.magalhaes@ufpe.br), [mariane.lira@ufpe.br](mailto:mariane.lira@ufpe.br)  
Received: 20 March 2021  
Accepted: 21 June 2021