

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS DE RUTÊNIO, ANÁLISE DE SUA
ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* E BIODISPONIBILIDADE ORAL**

Eduardo Sinesio de Freitas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

CO-ORIENTADORA: Dra. Patricia Bento da Silva

ARARAQUARA – SP

2015

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

**NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS DE RUTÊNIO, ANÁLISE DE SUA
ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* E BIODISPONIBILIDADE ORAL**

EDUARDO SINESIO DE FREITAS

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN
ORIENTADOR

ARARAQUARA – SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F866n

Freitas, Eduardo Sinesio de

Nanoencapsulação de compostos de Rutênio, análise de sua atividade anti-
Mycobacterium tuberculosis e biodisponibilidade oral / Eduardo Sinesio de Freitas –
Araraquara, 2015
61 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Fernando Rogério Pavan

Coorientador: Patricia Bento da Silva

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose. 3. Microemulsão lipídica.
4. Citotoxicidade. 5. Biodisponibilidade oral. I. Pavan, Fernando Rogério, orient.
II. Silva, Patricia Bento da, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho

Em memória de meu pai Sinesio de Freitas e em agradecimento a minha mãe Maria Aparecida Ferreira de Freitas, pelo carinho e motivação, por chegar aonde cheguei, devo tudo a ela.

Ao meu irmão Paulo que sempre foi minha inspiração, e ao Rodrigo, um irmão extra que Deus me presenteou.

À minha namorada Jéssika Ramos, pelo carinho, suporte, paciência e apoio durante este trabalho.

À minha Co-orientadora Patrícia Bento por todo o suporte, me orientando com muita atenção, dedicação, sempre presente em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Pavan.

Muito Obrigado

A minha amiga Ana Paula Borges Oliveira pela amizade, companheirismo, suporte e motivação mesmo à distância, você está sempre presente e sempre estará no meu coração.

Às minhas eternas amigas Patricia Akemi Asato e Juliana Vendramini.

Aos companheiros do laboratório Érica, Paula, Leonardo, Miyata, Débora, Isabel, César, João, Camila, Naila, Leticia e Meire.

Ao Prof Alzir e aos seus alunos Monize, Adriana e João, pelo suporte no trabalho.

Ao Prof. Marlus pelo apoio e pela excelente contribuição com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário, ao mestrando Carlos Eduardo Gismann, a doutoranda Ana Marta e ao pós-doutorando Carlos Alfredo Suárez pela parceria.

À Jessica Bernegossi, pela sua disponibilidade, atenção e suporte nos ensaios reológicos.

Ao meu amigo e colega de profissão Euripedes Barsanulfo

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, por toda a atenção sempre que precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lavan e a minha Co-orientadora Patricia Bento pela paciência, por aceitarem me orientar com todas as dificuldades encontradas.

À Drogaria Onofre pelo suporte durante esta fase.

À Fapes, pela bolsa de mestrado.

À Fapesp - processo 2013/14957-5

A Deus e à Santa Barbara, santa de minha devoção.

Epígrafe

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa transmitida pelo ar, curável e afeta principalmente os pulmões. Nos últimos anos, a taxa de mortalidade vem reduzindo, entretanto, cepas resistentes e a co-infecção TB/HIV têm dificultado as tentativas de controle da doença, levando ao aumento da mortalidade. Outro fator preocupante é que um terço da população mundial está infectada com o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em estado de latência, o qual serve como reservatório para TB ativa. No esforço de sanar esta falha, é crescente a importância da Química Bioinorgânica como um aliado na pesquisa de novos fármacos anti-TB. O Rutênio (Ru) é um elemento químico que apresenta capacidade de mimetizar o Ferro (Fe) em nosso organismo, apresentando baixa toxicidade e capaz de formar complexos estáveis, este elemento vem sendo estudado desde a década de 80 como possível substituto da Platina (Pt), metal central da estrutura da cisplatina utilizada em tratamentos antineoplásicos. Em estudos anteriores envolvendo os complexos heterolepticos de rutênio: [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) e [Ru(pic)(dppe)(phen)] PF₆ (SCAR7), foi observada excelente atividade anti-TB, uma moderada toxicidade celular e a falta de biodisponibilidade oral em modelo *in vivo* desses complexos, desse modo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a toxicidade e biodisponibilidade oral desses complexos nanoencapsulados. Estes sistemas nanoestruturados foram desenvolvidos utilizando diferentes proporções de tensoativo (fosfatidilcolina de soja, Emulgin® e oleato de sódio), fase aquosa (tampão fosfato pH 7,4) e oleosa (colesterol), afim de se obter um sistema para incorporação dos compostos de rutênio. O sistema foi caracterizado através das análises de reologia, tamanho de partículas e potencial zeta. A atividade anti-TB dos compostos foi determinada pelo Ensaio de Microdiluição com Resazurina (REMA), frente às linhagens de *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos resistentes, bem como ensaios de citotoxicidade utilizando células VERO (ATCC CCL81) e macrófagos (ATCC TIB-67), nesse trabalho realizou-se ainda o ensaio de biodisponibilidade oral, utilizando camundongos fêmeas BALB/C, no qual o sangue foi coletado, o plasma separado, congelado e analisado via Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) para quantificação do íon rutênio. Os complexos emulsionados mantiveram a atividade *in vitro* e a toxicidade foi reduzida em comparação com os compostos não incorporados na microemulsão lipídica. Compostos incorporados na microemulsão apresentaram atividade anti-TB em isolados clínicos resistentes nos quais os compostos não incorporados não apresentaram atividade.

Palavras-chave: *Mycobacterium tubeculosis*, tuberculose, microemulsão lipídica, citotoxicidade e biodisponibilidade oral.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious airborne disease, curable and mainly affects the lungs. In recent years, the death rate has been decreasing, however, resistant strains and co-infection TB / HIV have hampered the disease control efforts, leading to increased mortality. Another troubling factor is that one third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in a state of latency, which serves as a reservoir for active TB. In an effort to remedy this failure, it is increasing the importance of bioinorganic chemistry as an ally in the new anti-TB drug research. The Ruthenium (Ru) is a chemical element that has the capacity to mimic the iron (Fe) in our body, with low toxicity and able to form stable complexes, this element has been studied since the 80's as a possible substitute for platinum (Pt), the central metal structure of cisplatin used in anticancer treatments. In previous studies involving heteroleptic ruthenium complexes: [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); cis-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); cis[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) and [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7), we observed an excellent anti-TB activity, moderate cell toxicity and lack of oral bioavailability in vivo model of these complexes thus the main objective of this study was to evaluate the toxicity and oral bioavailability of those nano-coated complexes. These nanostructured systems have been developed using different ratios of surfactant (soybean phosphatidylcholine, Emulgin® and sodium oleate), aqueous phase (phosphate buffer pH 7.4) and oil (cholesterol) in order to obtain a system for incorporating the compounds of ruthenium. The system was characterized by analyzes rheology, particle size and zeta potential. The anti-TB activity of the compounds was determined by the microdilution assay with Resazurin (REMA) compared to strains of *M. tuberculosis* H37Rv and clinical isolates resistant and cytotoxicity assays using VERO cells (ATCC CCL81) and macrophages (ATCC TIB-67), this work is still performed the oral bioavailability assay using mice Female BALB / C, in which the blood was collected, plasma was separated, frozen and analyzed via Mass Spectrometry Inductively Coupled Plasma (ICP-MS) quantification of the ruthenium ion. The emulsified complex maintained in vitro activity and the toxicity was reduced as compared with the compounds not incorporated in the lipid microemulsion. Incorporated in the microemulsion compounds showed anti-TB activity in resistant clinical isolates in which the unincorporated compounds showed no activity.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, lipid microemulsion, cytotoxicity and oral bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos compostos SCARs	17
Figura 2. Representação esquemática da configuração das microemulsões.....	20
Figura 3. Estrutura química dos componentes do sistema nanoestruturado.....	21
Figura 4. Representação esquemática do preparo da microplaca, exemplo de um resultado de CIM (visual) através da técnica do Rezasurin Microtiter Assay (REMA) e da coluna de controle de esterilidade dos compostos (coluna 1).	30
Figura 5. Administração da dose oral por gavagem.	32
Figura 6. Coleta do sangue da veia submandibular.....	34
Figura 7. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema ME3.	36
Figura 8. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema ME4.	38
Figura 9. Complexos SCARs solubilizados em DMSO, antes e depois de serem sonicados.	39
Figura 10. Reogramas das formulações ME3 e ME4 na temperatura de 25°C.	42
Figura 11. Reogramas das formulações ME3-SCAR1 e ME4-SCAR1 na temperatura de 25°C.....	42
Figura 12: Quantificação de Ru e Pt (fármaco controle) em plasma de camundongos BALB/C após administração dos compostos SCARs e cisplatina nos tempos de 20 minutos, 1, 2 e 4 horas.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes dos sistemas lipídicos nanoestruturados desenvolvidos.	25
Tabela 2. Grupos dos camundongos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade.	33
Tabela 3. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e índice de polidispersão para a microemulsão (base) e para os compostos incorporados na ME3 após 24hs e após 3 meses.....	40
Tabela 4. Análise do potencial Zeta do sistema ME3, base e compostos SCARs incorporados.....	41
Tabela 5. Índice de escoamento (η) e índice de consistência (k) dos sistemas selecionados, analisados em.....	43
Tabela 6. Atividade anti-TB (CIM), Citotoxicidade (IC50) utilizando células VERO (ATCC CCL81) e Índice de seletividade (IS) dos compostos de Rutênio (II) incorporados e não incorporados na ME3.	44
Tabela 7. Atividade anti-TB (CIM), Citotoxicidade (IC50) utilizando macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e Índice de seletividade (IS) dos compostos de Rutênio (II) incorporados e não incorporados na ME3.	45
Tabela 8. Atividade anti-TB do composto SCAR1 nos diferentes sistemas lipídicos.....	46
Tabela 9. Painel de isolados clínicos com perfil de resistência fenotípica determinada pela metodologia do REMA e resistência genotípica através do sequenciamento de genes detectados inicialmente pelo polimorfismo no DNA PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism).....	48
Tabela 10. Atividade anti-TB dos compostos SCARs solubilizados em DMSO, incorporados na ME3 e dos fármacos já utilizados na terapia anti-TB frente aos isolados clínicos provenientes do Hospital Clemente Ferreira. CF46, 158 e 169 resistentes a R e I, CF100 e C F110 resistentes a I.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O – microemulsão tipo água em óleo

AM – amicacina

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes

bipy – 2,2' Bipyridina

Brij[®] 58 - polioxietileno 20 cetil éter

Brij[®] 98 - polioxietileno 20-oleil éter

CAP – capreomicina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

Cl-bipy – 4,4'-Dicloro-2,2'-bipyridina

DMSO - Dimetilsulfóxido

dppb – 1,4-Bis(difenilfosfina)butano

dppe – 1,2-Bis(difenilfosfina)etano

EMB - Etambutol

Epikuron[®] 200 - fosfatidilcolina de soja

EST - Estreptomicina

Eumulgin[®] HRE 40 - óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado

GAT – gatifloxacino

ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente

IZN – isoniazida

KAN - kanamicina

ME – microemulsão

Me-bipy – 4,4'-Dimetil-2,2'-bipyridina

MOX - moxifloxacino

MTB - *Mycobacterium tuberculosis*

O/A – microemulsão tipo óleo em água

OADC – Oleic, Albumin, Dextrose, Catalase enrichment

OFL - ofloxacin

PBS - Solução salina tamponada com fosfato à 1% em pH $\approx$ 7,0

phen – 1,10-Fenantrolina

pic - picolinato

PZA - Pirazinamida

REA - Relação estrutura atividade

REMA - Resazurin Microtiter Assay

RIF - rifampicina

RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute medium

Ru - Rutênio

SCAR1 – $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

SCAR2 – $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]\text{PF}_6$

SCAR4 – $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$

SCAR5 – $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$

SCAR6 – $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$

SCAR7 – $\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})(\text{phen})$

SFB - Soro Fetal Bovino

TB - Tuberculose

TB-MDR - TB Multi-Droga-Resistente

TB-XDR - TB Extensivamente-Droga-Resistente

Sumário

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A Tuberculose	14
1.2 Compostos inorgânicos.....	15
1.3 Nanotecnologia Farmacêutica.....	17
1.4 Nanotecnologia e TB.....	19
1.5 Microemulsões.....	20
1.5.1 Os componentes das microemulsões	20
1.6 Reologia.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
3 MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 Síntese dos compostos heterolépticos de fosfinas/diiminas/ácido picolínico contendo rutênio(II)	24
3.1.1 Síntese dos complexos do tipo $[Ru(pic)(N-N)(dppb)]PF_6$ (N-N= bipy (SCAR 1), Me-bipy (SCAR 2), Cl-bipy (SCAR 6) ou phen (SCAR 7))	24
3.1.2 Síntese dos complexos $[Ru(pic)(phen)(dppe)]PF_6$ (SCAR 5) e $[Ru(pic)(dppe)_2]PF_6$ (SCAR 4).....	25
3.2 Desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados	25
3.2.1 Incorporação dos compostos de rutênio	27
3.3 Caracterização dos Sistemas Nanoestruturados.....	27
3.3.1 Dispersão de luz dinâmica	27
3.3.2 Análise do Potencial Zeta	28
3.3.3 Análise reológica contínua.....	28
3.4 Ensaios Biológicos	28
3.4.1 Preparo da suspensão bacilar de MTB H ₃₇ Rv ATCC 27294 e Isolados Clínicos Resistentes	28
3.4.2 Culturas celulares J774A.1 (ATCC TIB-67) e VERO (ATCC CCL81).....	29

3.4.3	Determinação da atividade in vitro contra o M. tuberculosis H ₃₇ Rv e isolados clínicos resistentes	29
3.4.4	Determinação da citotoxicidade (IC ₅₀)	31
3.4.5	Ensaio de biodisponibilidade oral.....	32
3.4.5.1	Coleta do plasma para a avaliação da biodisponibilidade oral, através do <i>screening</i> farmacocinético em camundongos BALB/c	32
3.4.5.2	Preparo das amostras e quantificação via ICP-MS	34
4	Resultados e discussão.....	35
4.1	Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados.....	35
4.2	Incorporação dos compostos de Ru (II).....	39
4.3	Caracterização dos Sistemas Nanoestruturados.....	39
4.3.1	Tamanho de partícula e índice de polidispersão	39
4.4	Ensaio Biológicos	44
4.4.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Citotoxicidade (IC ₅₀) e Índice de Seletividade (IS).....	44
4.4.2	Comparação da CIM com sistemas nanoestruturados utilizando Ác. Micólico como constituinte da fase oleosa.....	46
4.4.3	Determinação da CIM frente aos 5 isolados clínicos sensíveis, MDR à INH e RMP com perfil fenotípico e genotípico de resistência determinados	47
4.5	Quantificação via ICP-MS.....	50
5	CONCLUSÕES.....	52
6	REFERÊNCIAS.....	54
	CAPÍTULO II.....	61

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

Causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), a Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que mais frequentemente afeta os pulmões. O bacilo foi identificado em 1882 por Robert Kock e, apesar dos recursos tecnológicos utilizados para o seu controle, sua erradicação é um objetivo distante de ser alcançado (ANIL et al., 2011). Em 2013 1,5 milhões de pessoas morreram e 9 milhões ficaram doentes (WHO, 2015)

A TB foi declarada emergência sanitária mundial pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1993. A iniciativa chamada Stop TB veio em 2000, com a meta de reduzir drasticamente o ônus global da TB até 2015, de acordo com as metas de Desenvolvimento do Milênio, estabelecendo metas para 2005 (detecção de 70% e cura de 85% dos casos), para 2015 e para 2050. O objetivo de reverter a incidência foi alcançado em todas as seis regiões da OMS, e na maior parte dos 22 países com carga de TB elevadas. No mundo todo, a incidência caiu a uma taxa média de 1,5% ao ano entre 2000 e 2013, a mortalidade foi reduzida em aproximadamente 45% entre 1990 e 2013 e a taxa de prevalência da TB 41% durante o mesmo período (WHO, 2014).

O Brasil encontra-se entre estes 22 países que juntos, concentram cerca de 80% dos casos da doença no mundo. No país, a TB é prioridade em saúde pública, ela está entre as doenças que mais emblematicamente caracterizam a determinação social no processo saúde e doença e demonstra relação direta com a pobreza e a má distribuição de renda. No Brasil ela afeta, principalmente, as periferias urbanas, como as favelas e as áreas degradadas dos grandes centros e geralmente está relacionada com as más condições de moradia e saneamento básico, ao uso e abuso de álcool, drogas e às doenças imunossupressoras, como a SIDA (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida) (SVS, 2014).

Nos últimos anos, tem aumentado o número de pacientes com TB multi-drogas-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR). A MDR-TB é causada por MTB resistente a pelo menos rifampicina (RIF) e isoniazida (IZN), e XDR-TB que é definida como MTB resistente a R, H, uma fluoroquinolona e, a pelo menos, um dos três fármacos injetáveis de segunda linha (isto é, capreomicina, canamicina ou amicacina) (Alves, 2011).

A doença pode resultar de uma infecção recentemente adquirida ou reativação de uma primo-infecção (TB latente). A predisposição de um indivíduo para desenvolver a doença, deve-se a uma interação de fatores genéticos e ambientais (FERREIRA et al., 2005). Com isso, a pandemia da Human Immunodeficiency Virus (HIV) associada com a TB, tem caracterizado esta como a maior causa de morte entre os pacientes co-infectados (ROSALBA et al., 2010). Com o HIV, a consequente imunodebilidade das pessoas infectadas aumentou drasticamente os riscos de desenvolvimento da TB. Em 2013, a incidência da TB esteve próxima de 9 milhões de novos casos, dos quais 1,1 milhão co-infectados com o HIV e 1,5 milhão de mortes decorrentes da doença, incluindo 360.000 mortes entre as pessoas HIV-positivas (WHO, 2014).

Há mais de 50 anos, pós-introdução da rifampicina (R) em 1960, não tínhamos nenhum novo medicamento contra a TB (LALLOO et al, 2011). Toda essa necessidade de um novo medicamento, fez com que o TMC-207 que era um dos compostos promissores dentro de um universo de apenas 5 (SQ-109 (Sequella Inc.), OPC-67583 (Otsuka Pharmaceutical Company), LL3858 (Lupin Ltd), TMC 207 (Johnson & Johnson) e PA-824 (TB Alliance and Novartis) (LALLOO et al., 2011; LIENHARDT et al., 2010), entrasse em um programa de aceleração de aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e concluíram rapidamente todas as etapas, tornando-se hoje o primeiro fármaco contra TB resistente desde 1960, recebendo o nome comercial de “Sirturo”. O FDA concedeu aprovação de forma acelerada, um tipo de aprovação temporária liberada quando uma determinada doença não possui opções viáveis de tratamento. Esta aprovação foi baseada em dois estudos nos quais foram obtidos 77,6% de sucesso no grupo de doentes tratados com o Sirturo, comparado com 57,6% do grupo placebo. Porém, o FDA exigiu que fosse colocado um aviso em destaque na bula do medicamento informando que houve aumento da mortalidade nos pacientes tratados com o novo fármaco. Cerca de 11,4% dos pacientes tratados com o novo fármaco morreram durante os ensaios clínicos em comparação com o placebo, com 2,5% de mortes durante os ensaios clínicos (FDA, 2015).

1.2 Compostos inorgânicos

Ao longo das últimas décadas, o uso de metais em drogas terapêuticas vem se mostrando cada vez mais importante: ouro em antiartríticos, prata em antibacterianos,

vanádio em antidiabéticos e bismuto para o tratamento de úlceras, são alguns exemplos de metalofármacos (AHMAD et al, 2006). Quanto à atividade antimicobacteriana da maioria das substâncias orgânicas, sabe-se que elas não possuem ação puramente orgânica. Algumas são ativadas ou biomodificadas por íons metálicos, incluindo metaloenzimas, enquanto outras têm um efeito direto ou indireto sobre o metabolismo do íon metálico no organismo (OLIVEIRA et al, 2006). A relação estrutura-atividade (REA) evidencia que a atividade anti-TB é aumentada quando ocorre a complexação do metal ao ligante, principalmente se este já for um fármaco, e também indica que o metal desempenha um papel relevante por si só (BERNHARDT et al, 2008; ZHANG et al, 2011).

A atividade anti-TB de compostos metálicos vem sendo demonstrada através de diversos estudos. No trabalho de Oliveira (OLIVEIRA, 2013) Foi demonstrada a atividade anti-TB de complexos metálicos da primeira série de transição com ligantes tridentados do tipo 2-acetilpiridina-N(4)-R-tiossemicarbazona. Seus compostos que apresentaram melhores resultados foram os compostos de manganês (Mn) e níquel (Ni) com CIM frente ao MTB H₃₇RV de 0,78 µg/mL.

Já é conhecido que compostos de cobre (Cu) apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas, baseando-se neste conhecimento e no fato de ser o terceiro elemento de transição mais presente no corpo humano, Silva avaliou a atividade anti-TB de complexos de Cu II com moléculas bioativas tais como: rifampicina, pirazinamida (PZA), etambutol, ácido nicotínico, diaminas e aminoácidos. Os complexos [Cu(NCO)₂].4H₂O e [CuI₂(PZA)₂] apresentaram CIM frente ao MTB H₃₇RV de 0,39 e 0,78 µg/mL respectivamente (SILVA, 2012).

Os compostos de rutênio (Ru) tem demonstrado atividade anti-tumoral desde 1970. Nosso grupo testou a atividade anti-MTB de compostos de rutênio e o resultado foi alta atividade e baixa citotoxicidade. Os compostos com melhores resultados foram os complexos heterolépticos de Ru(II) com fosfinas, diiminas e picolinatos como ligantes os quais denominamos compostos SCARs: [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) e [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7), cuja as estruturas estão apresentadas na **Figura 1**. Dentro dos resultados encontrados, os compostos apresentam algumas características às quais um novo fármaco contra TB deve apresentar, como atividade em bactérias latente, atividade em isolados MDR, além de não interagirem negativamente com outros fármacos

do atual tratamento. Os ensaios *in vivo* garantiram a segurança dos compostos e sua baixa citotoxicidade, porém no ensaio de biodisponibilidade, estes compostos não alcançaram concentrações suficientemente ativas na corrente sanguínea ou podem ter sido degradados (Pavan, 2011).

Figura 1. Estrutura geral dos compostos SCARs

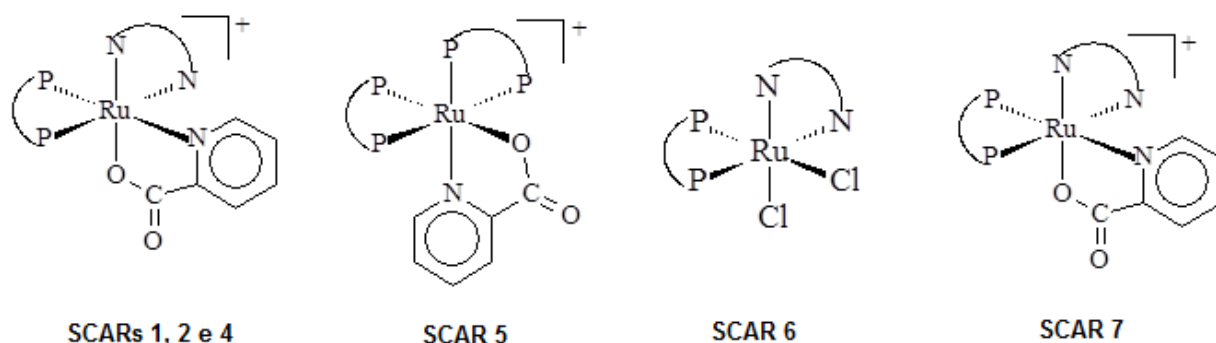


Imagem: Monize Martins

1.3 Nanotecnologia Farmacêutica

A baixa solubilidade dos compostos metálicos em água inviabiliza os estudos da atividade biológica em animais. Por este motivo, têm se buscado alternativas para veiculação destes compostos metálicos através de estratégias tecnológicas que visam compartimentalizar, de maneira efetiva, diversos grupos de moléculas e modificar seu comportamento no organismo. No início da década de 80 aumentaram os estudos envolvendo a nanotecnologia para liberação controlada de fármacos, esta surgiu como um método comercialmente atrativo, visto que o custo para lançar um novo fármaco no mercado é muito alto e levam-se muitos anos para liberação da sua comercialização. Assim, a nanotecnologia passou a ser uma alternativa para contornar estes problemas, utilizando princípios ativos já disponíveis, o que tem permitido aumentar a eficiência de vários fármacos já utilizados, a reintrodução de ativos não mais utilizados por suas propriedades indesejadas e aprimoramento de novas substâncias que sejam lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES et al., 2006).

Durante os últimos anos têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo não só de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, permitir a redução da dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, além de permitir o controle de liberação (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009)

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se interessado no desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ et al., 2006; GUTARRE et al., 2007)

Dentre os sistemas lipídicos nanoestruturados, destacam-se as microemulsões (MEs), que podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável e apresentando gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm). As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2002).

Os sistemas de administração de fármacos baseados em nanotecnologia têm um potencial considerável para o tratamento de TB. Estes sistemas apresentam diversas vantagens tecnológicas como: transportadores de fármacos, elevada estabilidade, possibilidade de incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, diferentes possibilidades de vias de administração, incluindo a administração oral e por inalação. Estas propriedades permitem a melhoria da biodisponibilidade do fármaco e a redução da frequência de administração, e pode resolver o problema da não aderência à terapia pré-estabelecida, um obstáculo importante no controle da epidemia de TB (SILVA et al, 2012).

Em relação a outros sistemas de dispersão (soluções, emulsões e lipossomas), as microemulsões apresentam vantagem em relação a sua estabilidade termodinâmica e consequentemente, sua vida útil é maior. As microemulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), excelentes veículos para a dispersão de fármacos lipofílicos, que se dissolvem melhor em meio oleoso, melhorando sua solubilidade em água e protegendo-o contra hidrólise enzimática. Também podemos obter microemulsões do tipo água em óleo (A/O), adequadas para dispersão de fármacos hidrofílicos, estes sistemas apresentam outras vantagens tais como: transparência, fácil preparação e capacidade de incorporar fármacos com diferentes propriedades físico-químicas (FORMARIZ et al, 2010).

No desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, há um grande problema que é escolher os constituintes do sistema. Deve-se levar em consideração alguns fatores extremamente importante, tais como, atoxicidade, não irritabilidade e capacidade de formar o sistema esperado (LAWRENCE E RESS, 2000).

1.4 Nanotecnologia e TB

Na busca de substâncias ativas anti-TB, encontra-se relatos na literatura de sistemas nanoestruturados utilizados para incorporação de substâncias ativas já utilizadas na terapia. (SILVA, et al 2001) Silva e colaboradores sintetizaram um conjugado de polietilenoglicol-poli(ácido aspártico) contendo INH para prolongar a liberação do fármaco, este demonstrou ser de cinco a seis vezes mais ativo em ensaios *in vitro* frente ao MTB, quando comparado ao pró-fármaco livre.

A moxifloxacina (MOX) é um antibiótico da classe das fluorquinolonas, também utilizado na terapia anti-TB, apresenta atividade intracelular em macrófagos. Kisich e colaboradores desenvolveram nanopartículas poliméricas (NP) de poli (cianoacrilato de butila) para avaliar se a MOX incorporada (MOX-NP) aumentaria sua atividade intracelular em macrófagos. O resultado foi que a MOX-NP se mostrou 3 vezes mais eficiente comparada com a MOX livre. Para inibição do crescimento de MTB intracelular foi necessário 1mg/mL de MOX, ao passo que para MOX-NP foi necessário apenas 1 µg/mL (KISICH et al, 2007).

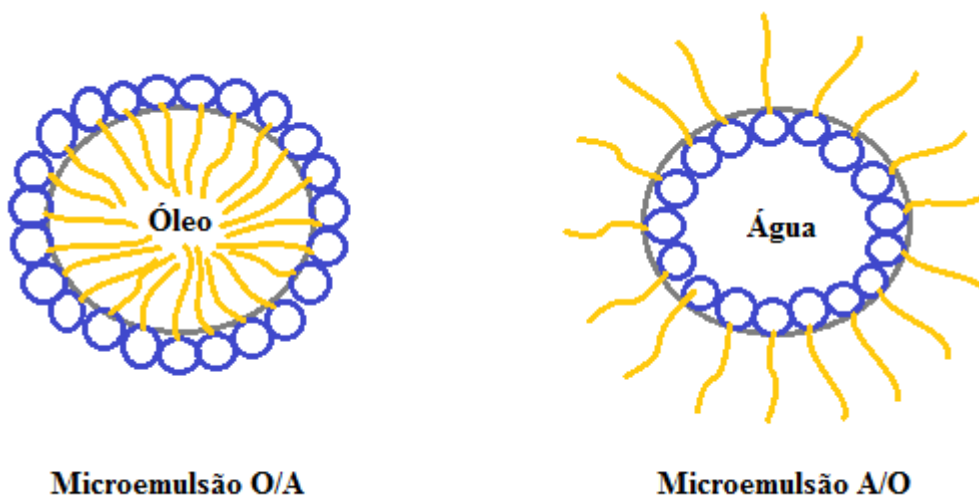
Em um estudo de atividade biológica realizado por El-Ridy (EL-RIDY et al, 2008), foram preparadas lipossomas contendo pirazinamida, as quais denominara pirazinamidas lipossomais, utilizando dipalmitoilfosfatidilcolina e colesterol na proporção 7:2 (neutro) e fosfatidilcolina dipalmitoil, colesterol e fosfato de dicetilo na proporção 7:2:1 (com carga negativa). Camundongos *Mus Musculus* machos foram infectados com injeção de 0,1 mL de suspensão de MTB H₃₇RV via intravenosa. Duas semanas após a infecção, 5 grupos de 10 camundongos foram separados aleatoriamente e receberam diferentes tratamentos. O resultado obtido mostrou que a pirazinamida lipossomal pôde diminuir significativamente a contagem bacteriana (UFC / g de pulmão) 10, 20 e 30 dias após a ultima dose do tratamento. O exame histopatológico dos pulmões dos camundongos apresentou maior gravidade da infecção nos que receberam a pirazinamida livre comparado com os camundongos que receberam a lipossomal.

1.5 Microemulsões

As microemulsões são sistemas dispersos de gotículas com tamanhos que variam de 100 a 1000 nm. São misturas isotrópicas, um sistema termodinamicamente estável e ópticamente transparente. A dispersão de gotículas é estabilizada por um filme interfacial obtido geralmente por um tensoativo ou uma mistura de tensoativo e co-tensoativo, geralmente álcoois de cadeia curta ou de cadeia média, normalmente não iônicos (SURMAN et al, 2009).

Os agentes tensoativos são substâncias que possuem em sua estrutura molecular uma região polar e uma apolar. Podem formar estruturas bicontínuas, microemulsões do tipo água em óleo ou óleo em água (**Figura 2**), as quais são determinadas pelo equilíbrio entre a parte polar e apolar do tensoativo empregado, denominado como Equilíbrio-Hidrófilo-Lipófilo (EHL). Numericamente representado por uma escala que vai de zero a vinte, deve-se escolher o tensoativo com EHL ideal para o preparo da microemulsão que se deseja obter. Valores inferiores a 8 indicam predomínio da cadeia apolar, sendo adequados para preparações de microemulsões do tipo A/O analogamente, tensoativos com valores de EHL superiores a 8, são utilizados para preparações de microemulsões do tipo O/A, devido ao predomínio da cadeia polar (FORMARIZ, 2008).

Figura 2. Representação esquemática da configuração das microemulsões.



Fonte: Autor

1.5.1 Os componentes das microemulsões

Foram desenvolvidos diferentes sistemas nanoestruturados no decorrer deste trabalho. Inicialmente, foram preparados sistemas com ácido micólico como constituinte da fase oleosa com o intuito de aumentar a atividade anti-TB dos complexos de Ru (II), visto que o composto é parte integrante da parede celular do MTB. Devido ao seu custo elevado e como não houve aumento significativo da atividade dos complexos, não foi mais utilizado o ácido micólico nas preparações.

O colesterol foi escolhido como fase oleosa do sistema devido ser o esterol que possuímos em maior quantidade no corpo humano. Buscamos um componente que não apresentasse toxicidade para preparo de uma formulação para uso oral.

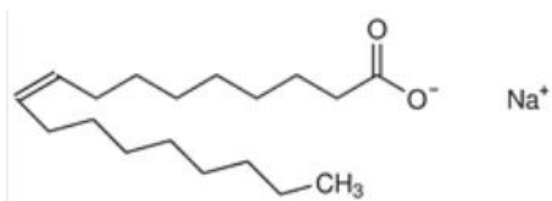
O óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado (Emulgin[®]) é um tensoativo não iônico, não interfere nas propriedades reológicas das microemulsões obtidas. A fosfatidilcolina de soja é um tensoativo anfótero que apresenta baixa toxicidade, sendo muito utilizado na preparação de microemulsões. O oleato de sódio é utilizado como agente solubilizante, impedindo a elevação da viscosidade do sistema, é utilizado como co-tensoativo (OLIVEIRA, 2012).

O poloxamer 407 é um copolímero de bloco de polioxietileno-polioxipropileno, vem sendo estudado nos últimos anos devido as suas propriedades de formar géis de liberação controlada, muco-adesão, estabilidade, alta capacidade solubilizante e funciona como excelente carreador (KREIDEL, 2009)

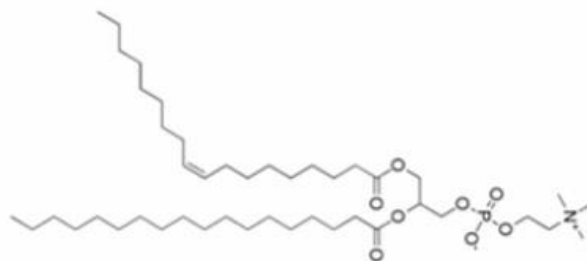
O Brij 98 (Polioxietileno (20) oleil éter) é um tensoativo com extensa cadeia carbônica, amplamente utilizado para preparações farmacêuticas devido a sua estabilidade frente a mudanças de pH, alteração de força iônica e baixa toxicidade (FORMARIZ, 2005)

Na **Figura 3** encontram-se os componentes do sistema nanoestruturado escolhido para o desenvolvimento do trabalho:

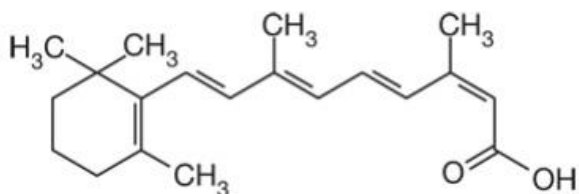
Figura 3. Estrutura química dos componentes do sistema nanoestruturado.



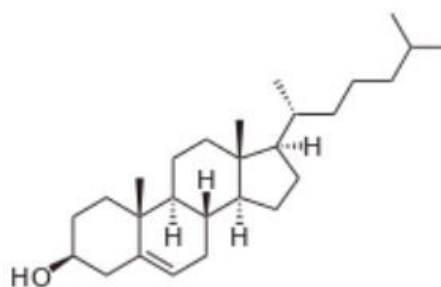
Oleato de sódio



Fosfatidil colina de soja



Emulgin®



Colesterol

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/>

1.6 Reologia

A Reologia é o estudo do escoamento e fluidez dos materiais quando submetidos a uma tensão, do grego *rheos* (escoamento) e *logos* (conhecimento). Dentre as diversas aplicações da Reologia, é importante na área cosmética e farmacêutica para a elaboração, fabricação e caracterização de novos produtos, sendo muito importante por exemplo, para determinar a estabilidade e consequentemente, o prazo de validade de um produto (MARTINI, 2011). O estudo das características reológicas na área farmacêutica apresenta diferentes finalidades, tais como: analisar a facilidade com que o medicamento escoar de um frasco; no processo industrial, o bombeamento de um produto através de um equipamento; análise da viscosidade de um produto, para sua passagem através de uma agulha; o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele (PESTANA, 2009).

Os modelos reológicos podem apresentar dois tipos de comportamento: newtoniano e não newtoniano. O fluxo newtoniano é caracterizado por possuir partículas simétricas e não apresenta alteração da viscosidade independente da variação da tensão aplicada. Analogamente, o fluxo não newtoniano apresenta como características partículas assimétricas e a viscosidade altera, aumentando (dilatantes) ou diminuindo

(plásticos ou pseudoplásticos), dependendo da tensão aplicada sobre o material. A maioria das formulações cosméticas e farmacêuticas apresenta comportamento não newtoniano (CAMARGO JR, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar a nanotecnologia como ferramenta de abordagem para melhorar a atividade anti-TB, diminuir a citotoxicidade e melhorar a biodisponibilidade oral dos compostos heterolepticos de Rutênio.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Desenvolvimento de diferentes sistemas lipídicos nanoestruturados:

- ME1 - colesterol e ácido micólico (9:1) como fase oleosa, oleato de sódio (OS), óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (ORPH – Eumulgin® HRE 40) e fosfatidilcolina de soja (FS – Epikuron® 200) na proporção 6:8:3, como tensoativo e tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa;
- ME2 - sistema idêntico ao ME1, variando apenas a proporção de ácido micólico e colesterol para 19:1;
- ME3 - sistema idêntico ao ME1 usando apenas colesterol como fase oleosa;
- ME4 - colesterol como fase oleosa, mistura de polioxietileno 20-oleil éter (Brij® 98) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo e solução contendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 10% como a fase aquosa.

2.2.2 Incorporar nas formulações preparadas os compostos heterolépticos de Ru(II): Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) e [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7);

2.2.3 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente ao MTB H₃₇Rv (ATCC 27294) dos compostos de Ru (II) solubilizados em DMSO e incorporados no sistema ME3;

2.2.4 Determinar a CIM frente a isolados clínicos resistentes provenientes do Hospital Clemente Ferreira (CF46, CF100, CF110, CF156 e CF169) dos compostos de Ru (II) solubilizados em DMSO e incorporados no sistema ME3;

2.2.5 Determinar a citotoxicidade (IC₅₀) frente à linhagem celular epitelial VERO (ATCC CCL81) e macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) dos compostos de Ru (II) solubilizados em DMSO e incorporados na ME3;

2.2.6 Avaliar a biodisponibilidade oral em camundongos BALB/C dos compostos SCARs solubilizados em óleo de girassol e incorporados na ME3.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Síntese dos compostos heterolépticos de fosfinas/diiminas/ácido picolínico contendo rutênio(II)

A síntese dos complexos: Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) e [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pavan et al., 2010, 2011 (PAVAN et al, 2010; PAVAN et al, 2011) no departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) dentro do grupo coordenado pelo Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista.

3.1.1 Síntese dos complexos do tipo [Ru(pic)(N-N)(dppb)]PF₆ (N-N= bipy (SCAR 1), Me-bipy (SCAR 2), Cl-bipy (SCAR 6) ou phen (SCAR 7))

Adicionou-se 0,12 mmol de ácido picolínico e 0,15 mmol de trietilamina a uma solução de 0,10 mmol *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppb)] dissolvido em 30 mL de metanol. A mistura reacional foi aquecida sob-refluxo no período de 24 horas mantendo-se agitação magnética e atmosfera inerte, adicionou-se a essa solução 0,15 mmol NH₄PF₆ e deixou-se reagir por mais 1 hora. A solução foi concentrada reduzindo-se o volume para aproximadamente 2 mL, em seguida precipitou-se o complexo com água (~15 mL) e lavou-se com água (2x10 mL) e éter etílico (2x10 mL).

3.1.2 Síntese dos complexos [Ru(pic)(phen)(dppe)]PF₆ (SCAR 5) e [Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR 4)

Adicionou-se 0,12 mmol de ácido picolínico e 0,15 mmol de trietilamina a uma solução de 0,10 mmol *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppb)] dissolvido em 30 mL de diclorometano. Deixou a mistura reagir por 24 horas e adicionou-se 0,15 mmol NH₄PF₆ e deixou-se reagir por mais 1 hora. Reduzindo-se o volume para aproximadamente 2 mL, em seguida precipitou-se o complexo com éter etílico (~15 mL) e o lavou com éter etílico (2x10 mL) e água (2x10 mL).

3.2 Desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados

Em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli do grupo de pesquisa “Sistemas de liberação de fármacos para tratamento de doenças tropicais e emergentes” do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP foi realizado experimentos de formulação de microemulsão lipídica e incorporação dos compostos Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1); [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2); [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4); *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5); *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR6) e [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7) nas formulações preparadas.

A **Tabela 1** apresenta os constituintes dos sistemas lipídicos nanoestruturados desenvolvidos.

Tabela 1. Constituintes dos sistemas lipídicos nanoestruturados desenvolvidos.

Sistema	Constituintes		
	Tensoativo	Fase aquosa	Fase oleosa

ME1	Oleato de sódio : Epikuron® 200 : Eumulgin® HRE 40 (6:3:8)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (9:1)
ME2	Oleato de sódio : Epikuron® 200 : Eumulgin® HRE 40 (6:3:8)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (19:1)
ME3	Oleato de sódio : Epikuron® 200 : Eumulgin® HRE 40 (6:3:8)	tampão fosfato pH 7,4	Colesterol
ME4	Brij®98 : Epikuron® 200 (2:1)	tampão fosfato pH 7,4 : dispersão polimérica de poloxamer 407 a 10% (9:1)	Colesterol

Fonte: autor

As microemulsões foram desenvolvidas baseando-se na metodologia utilizada por Formariz (FORMARIZ et al, 2010), com algumas adaptações. As formulações foram preparadas da seguinte forma: A mistura semi-sólida (2,0 g) contendo o tensoativo (S) e a fase oleosa (O) foi agitada constantemente, e o tampão fosfato pH=7,4 (fase aquosa – W) foi adicionado lentamente com uma bureta de precisão (8,0 g). As formulações foram sonicadas em modo semi-descontínuo por 10 minutos com pausa de 30 segundos a cada 2 minutos, com amplitude de 15% e rodeadas por banho de gelo utilizando um sonicador de haste (Q700 da Qsonica®). As transições de mistura semi-sólida para microemulsão opticamente clara, microemulsão clara para suspensão coloidal translúcida ou separação de fases foram nítidas e reproduzíveis. As microemulsões foram preparadas em uma sala com temperatura controlada a $25 \pm 0,1$ °C e 24 horas antes dos experimentos e mantidas a $25 \pm 0,1$ °C para permitir que o sistema atinja o equilíbrio completo. Foi construído o diagrama de fases das formulações ME3 e ME4.

O diagrama de fases é construído preparando-se as formulações de acordo com cada um dos 36 pontos do diagrama. Cada ponto varia as concentrações das fases aquosa, oleosa e tensoativo, obtendo sistemas com diferentes características. O ponto que possuir as características necessárias para a formulação que se deseja obter é escolhido para incorporação dos compostos e análises posteriores. Neste trabalho, buscou-se um sistema líquido transparente para incorporação dos complexos heterolépticos de Ru (II).

As Formulações contendo ácido micólico em diferentes proporções, foram preparadas para testar sua atividade anti-TB utilizando apenas um composto SCAR (SCAR1), para avaliar se haveria aumento considerável da atividade do composto em

comparação com o sistema contendo apenas colesterol como fase oleosa. Devido ao alto custo do ácido micólico, os diagramas de fases destas formulações não foram construídos.

3.2.1 Incorporação dos compostos de rutênio

Os compostos heteroléticos de fosfinas/diiminas/ácido picolínico contendo rutênio(II) foram adicionados após obter-se as MEs. Em um tubo de vidro adequado contendo 4mL da base das MEs, foi adicionado 0,002g do composto. Para homogeneização, a mistura foi levada ao sonificador por 4 minutos, amplitude de 15% em modo semi-descontínuo com banho de gelo, para incorporação dos compostos a 5000 µg/mL na ME lipídica.

Os complexos de Ru (II) foram solubilizados em DMSO a uma concentração de 10.000 µg/mL e levados ao sonificador também por 4 minutos, amplitude de 15% em modo semi-descontínuo com banho de gelo. Este teste foi realizado para verificar se haveria alteração na coloração das soluções, o que poderia indicar uma alteração na estrutura dos compostos causada pelo equipamento.

3.3 Caracterização dos Sistemas Nanoestruturados

3.3.1 Dispersão de luz dinâmica

O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram medidos através de um aparelho analisador de gotículas, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser – Light Scattering – Zetasizer Nano NS, Malvern Instrumentals, Malvern, UK. As análises foram realizadas logo após o preparo das formulações e após três meses para análise da estabilidade. As amostras foram previamente diluídas (1:9) com água destilada e foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda sua extensão. O comprimento de onda do laser foi de 532nm, a temperatura do sistema mantida em 20°C e o índice de refração foi de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas 10

determinações do diâmetro e Índice de Polidispersão (IPD) das gotículas de cada amostra (n=3).

3.3.2 Análise do Potencial Zeta

A determinação do potencial Zeta foi realizada utilizando o equipamento Zetasizer Nano NS, Malvem Instrumentals, Malvem, UK, a partir da mobilidade eletroforética. As formulações foram colocadas na célula eletroforética e realizadas 3 determinações do potencial de superfície para cada amostra. Estas foram previamente diluídas com solução de KCl a 10 µg/mL, para manter a força iônica constante durante a análise.

3.3.3 Análise reológica contínua

Foram obtidos os reogramas das formulações ME3 e ME4 através do reômetro AR200 – TA Instruments® utilizando geometria steel plate com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 µm. O teste foi realizado em triplicata à 25°C. Para avaliar o comportamento reológico entre as formulações, foram selecionadas as bases das Microemulsões e o composto SCAR1 foi incorporado nos dois sistemas nanoestruturados diferentes.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Preparo da suspensão bacilar de MTB H₃₇Rv ATCC 27294 e Isolados Clínicos Resistentes

As cepas foram cultivadas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco™) enriquecido com OADC (Oleic Acid, Albumin, Dextrose and Catalase), incubada por aproximadamente 10 dias a 37 °C até obtenção de uma grande quantidade de massa bacilar. Após, foi realizado colheita da suspensão de micobactérias e lavagem através de centrifugação por 15 minutos à 3150 g (≈3000 rpm) por 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato à 1% (tampão PBS - pH = 7,0), acrescido de Tween 80 à 0,05%. O sedimento obtido foi ressuspendido em 50 mL do mesmo tampão. Essa suspensão foi aliquoteada em microtubos e congelada a -80°C. O controle de qualidade (CQ) foi realizado após

congelamento de no mínimo 2 dias realizando semeadura de 100 µL da suspensão pura e das diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} em placas de 3 quadrantes contendo meio Middlebrook 7H11 acrescido de 10% de OADC. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por até 20 dias para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).

3.4.2 Culturas celulares J774A.1 (ATCC TIB-67) e VERO (ATCC CCL81)

As linhagens celulares J774A.1 (macrófagos de camundongos) e VERO (epiteliais normais) foram descongeladas e cultivadas em garrafas com superfície em torno de 12,50 cm² contendo 10 mL de meio DMEM (Vitrocell®) para VERO e meio RPMI para J774A.1. Ambos os meios, foram enriquecidos com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As garrafas foram incubadas à 35°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular.

3.4.3 Determinação da atividade *in vitro* contra o *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos resistentes

A CIM foi determinada empregando a metodologia padronizada por PALOMINO et al. (2002) denominada REMA. Em microplacas estéreis de 96 orifícios (KASVItm) foi depositado na coluna 12, 200 µL de água destilada estéril, para evitar a desidratação do meio de cultura durante o período de incubação. Os compostos foram solubilizados em DMSO e os fármacos padrão de acordo com as recomendações do fabricante, obtendo soluções estoques de 10 mg/mL. As microemulsões foram preparadas e os compostos incorporados para atingir a concentração de 5mg/ml. As amostras testes foram depositadas na coluna 2, onde, em seguida, foram realizadas diluições seriadas 1:2 a partir da coluna 3, de maneira a se obter concentrações variáveis de cada composto. O primeiro orifício da microplaca (coluna 1) foi utilizado para controle de contaminação do composto, conforme a **Figura 4**. Neste orifício foi adicionado apenas o meio de cultura e a amostra na diluição de 1/4, onde se esperava que não houvesse crescimento de nenhuma espécie bacteriana. Uma aliquota da cultura de MTB foi descongelada e

adicionada 100 μL em cada orifício da microplaca, permitindo um volume final de 200 μL e uma concentração bacilar inicial de 2×10^5 UFC/mL. Na coluna de controle positivo em destaque na figura se adicionou apenas meio de cultura (200 μL), não havendo crescimento bacteriano. Analogamente, na coluna de controle negativo, adicionou-se 100 μL de meio de cultura e 100 μL de suspensão bacteriana. Os experimentos foram realizados em triplicata, as microplacas foram seladas e incubadas por 7 dias a 37°C quando foi adicionado resazurina. Após a incubação à 37°C por 24 h, foi feita a leitura da fluorescência no leitor de microplacas Cytation 3 (Biotektm).

Figura 4. Representação esquemática do preparo da microplaca, exemplo de um resultado de CIM (visual) através da técnica do Rezaurin Microtiter Assay (REMA) e da coluna de controle de esterilidade dos compostos (coluna 1).

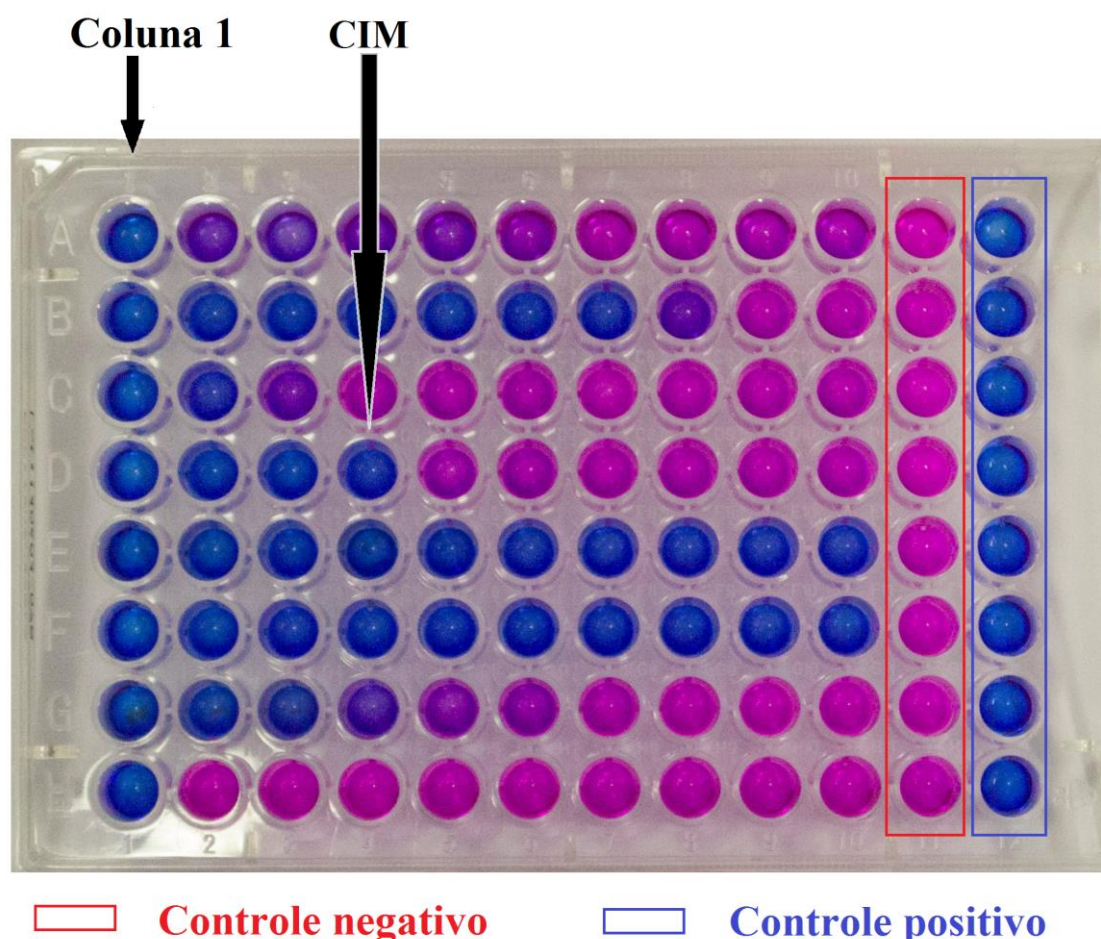


Foto: Débora Leite

A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de MTB. A porcentagem de inibição da multiplicação

bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com bactéria e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

$$100 \left(1 - \frac{b}{a} \right) = \% \text{ de Inibição da multiplicação bacteriana}$$

3.4.4 Determinação da citotoxicidade (IC₅₀)

A citotoxicidade (IC₅₀) foi determinada como recomendado por PAVAN et al. (2010) (Pavan, *et al.*, 2010). Após a confluência celular como descrita no item **3.4.** as células VERO foram retiradas utilizando solução de tripsina/EDTA (Vitrocell®) e contadas. Para cada ensaio de IC₅₀, 3,4 x 10⁵ cels/mL (VERO / Macrófagos), foram semeadas em microplaca de 96 orifícios permitindo um volume final de 200 µL e incubadas por 24 h à 37 °C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular antes da análise com os compostos. Soluções dos compostos em concentrações de 10 mg/mL foram preparadas em DMSO à 5% e submetidas à diluição seriada em meio RPMI com intervalo de 1250 à 3,9 µg/mL. No caso das microemulsões, estas foram adicionadas diretamente à placa na concentração de 10 mg/mL. As células foram expostas aos compostos nas diferentes concentrações por 24 h e então aplicados 30 µL de resazurina em cada orifício na concentração de 0,01% e incubadas por 6 h. Após a incubação, realizou-se a leitura da fluorescência no leitor de microplacas Cytation 3 (Biotektm) e o IC₅₀ foi definido como a maior concentração do composto no qual 50% das células permaneceram viáveis. Como controle, o IC₅₀ do DMSO e da base da microemulsão, foram determinados em cada ensaio. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.5 Ensaio de biodisponibilidade oral

3.4.5.1 Coleta do plasma para a avaliação da biodisponibilidade oral, através do *screening* farmacocinético em camundongos BALB/c

Os camundongos com idade entre 4-8 semanas foram divididos em grupos de 2 animais cada e receberam uma dose oral por gavagem (**Figura 5**) de cada composto incorporado ou não na ME3, 300 mg/Kg (Gruppo et al, 2006).

Figura 5. Administração da dose oral por gavagem.



Foto: Débora Leite

Os compostos Scars 1, 2, 4, 5 e 7 quando não incorporados na ME3 foram administrados solubilizados em óleo de girassol, pois o mesmo não apresentou toxicidade. Os compostos foram administrados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Grupos dos camundongos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade.

Grupo	Composto
1	Scar1
2	Scar2
3	Scar4
4	Scar5
5	Scar7
6	Óleo de girassol
7	ME3-Scar1
8	ME3-Scar2
7	ME3-Scar4
9	ME3-Scar5
10	ME3-Scar7

Fonte: autor.

Nos tempos de 20 min, 1, 2, 4 h, realizou-se a coleta do sangue da veia submandibular, Figura 4, de acordo com as metodologias descritas na literatura (GRUPPO et al 2006, GOLDE et al, 2005). A coleta inicial foi realizada escolhendo-se aleatoriamente um lado da face. Passado o tempo para a realização de nova coleta, o mesmo procedimento foi realizado do lado oposto, alternando a cada coleta para facilitar o uso da lanceta e evitar machucar o animal utilizado. O plasma foi separado e armazenado a -70 °C para quantificação química dos respectivos compostos no sangue. Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 24/2013.

Figura 6. Coleta do sangue da veia submandibular.

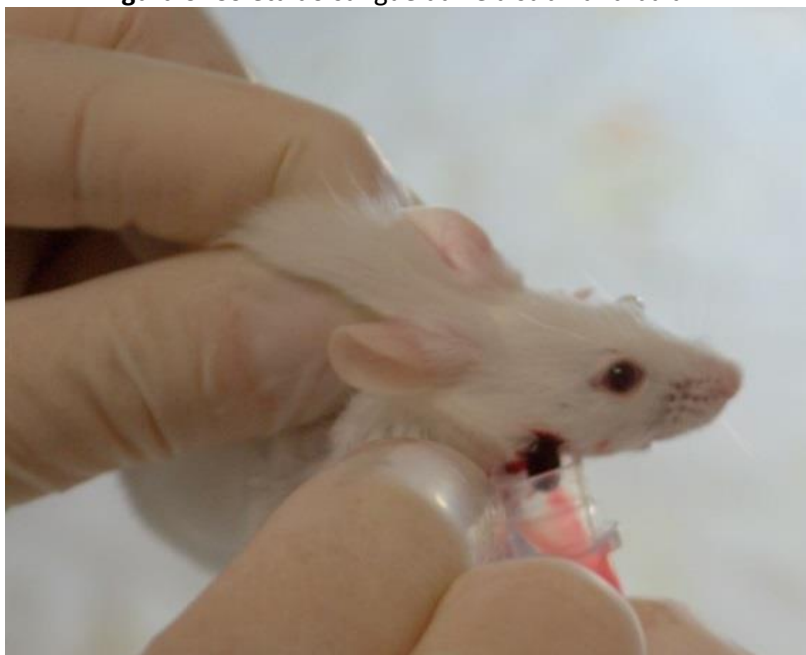


Foto: Débora Leite

3.4.5.2 Preparo das amostras e quantificação via ICP-MS

A quantificação foi realizada no Centro de Estudos Ambientais localizado no Campus da UNESP de Rio Claro sob supervisão do Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário desenvolvido juntamente com o mestrando Carlos Eduardo Eismann, a doutoranda Ana Marta Marchini Rolisola e o pós-doutorando Carlos Alfredo Suárez.

Os íons metálicos (Ru e Pt) foram quantificados usando o Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) da Thermo Scientific XSeries II.

Para a digestão das amostras, foram utilizados 50 μL da amostra de plasma e 5950 μL de ácido nítrico bidestilado 20% v/v. As amostras foram digeridas em microondas (Berghof Speedwave D 72800) atingindo a temperatura de 170 $^{\circ}\text{C}$.

Após a digestão, 2 mL das amostras foram transferidas para tubo cônico de 15mL, foi adicionado 800 μL da solução estoque de padrão interno (Bi, Ho, In, Li-6, Sc, Tb, Y), de modo que a concentração final de padrão interno nas amostras fosse de 100 $\mu\text{g/L}$ e mais 5,2 mL de água milli-Q, deixando a acidez da solução a 5% m/v.

Para a calibração, foi utilizada soluções mono-elementares de Ru e Pt nas concentrações 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppt e um branco (solução diluente) e assim,

construída uma curva analítica. Em todas as soluções adicionou-se também o padrão interno com o intuito de corrigir flutuações do sinal (contagens por minuto).

Durante o experimento realizou-se o teste de recuperação para validação do método, o qual se obteve um resultado de 95-105%.

A determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método foi realizada segundo Martincica (MARTINCICA, et al 2014), lendo-se o branco da curva, com dez replicatas, e aplicando-se as equações a seguir:

$$LD = 3 \times (\text{Desvio Padrão do branco}) \mu\text{g/L} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \times (\text{Desvio Padrão do branco}) \mu\text{g/L} \quad (\text{Equação 2})$$

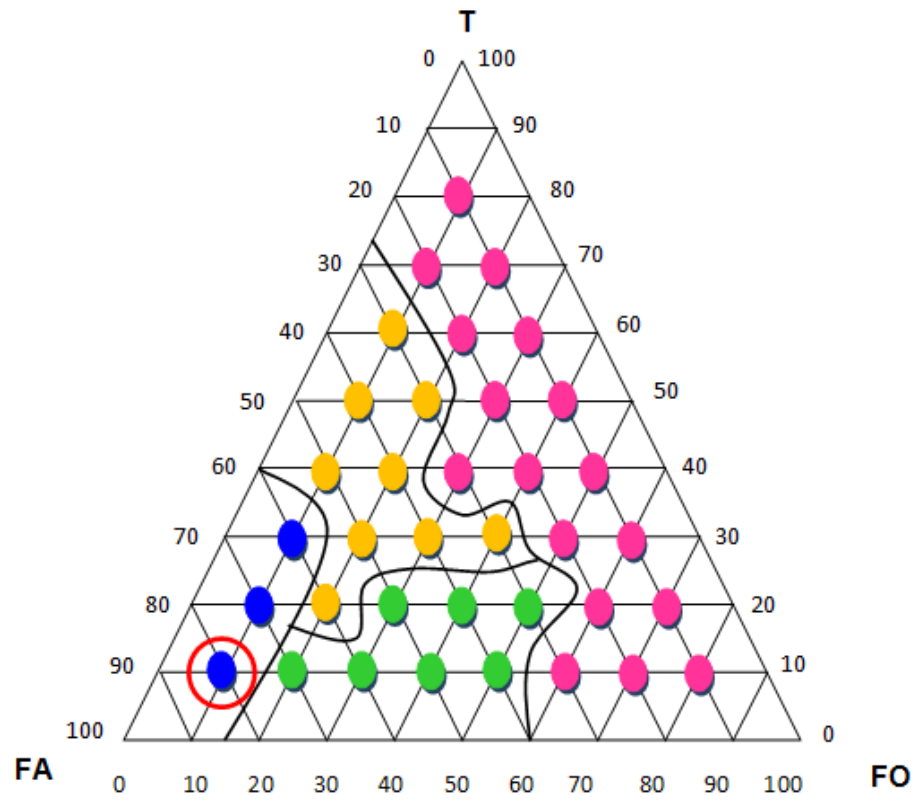
4 Resultados e discussão

4.1 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados

O sistema nanoestruturado ME3 desenvolvido é constituído por colesterol (fase oleosa), tampão fosfato pH7,4 (fase aquosa) e uma mistura de oleato de sódio, fosfatidil colina de soja e Emulgin® (óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado) na proporção 6:3:8 (tensoativo). Foram obtidas formulações com diferentes características em cada ponto, variando as proporções de fase oleosa, fase aquosa e tensoativo. As características são mostradas no diagrama de fases (**Figura 7**) como regiões denominadas Sistemas Líquido-Transparentes (SLT), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10-30%), Sistemas Viscosos Transparentes (SVT) com a concentração de tensoativo entre 20 a 65% e a fase de óleo com 10-40%, Sistemas Viscosos e Opacos (SVO) encontrados na região inferior e central do diagrama com baixa concentração de óleo de (20-50%), tensoativo (10-20%), e Separação de Fases (SF) em baixas concentrações de água (10-30%) e independente da concentração do tensoativo nas formulações.

O ponto escolhido para a incorporação dos compostos foi a formulação F1 (**Figura 7**) destacada com um círculo vermelho, que é composta de 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa. Essa formulação foi escolhida para a incorporação dos compostos heterolépticos de Ru(II) devido ser a mais líquida, ou seja, a mais adequada para o trabalho.

Figura 7. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema ME3.



Fonte: autor.



SLT = sistema líquido transparente – ponto escolhido para incorporar os compostos



SLT = sistema líquido transparente



SVO = sistema viscoso opaco



SF = separação de fase



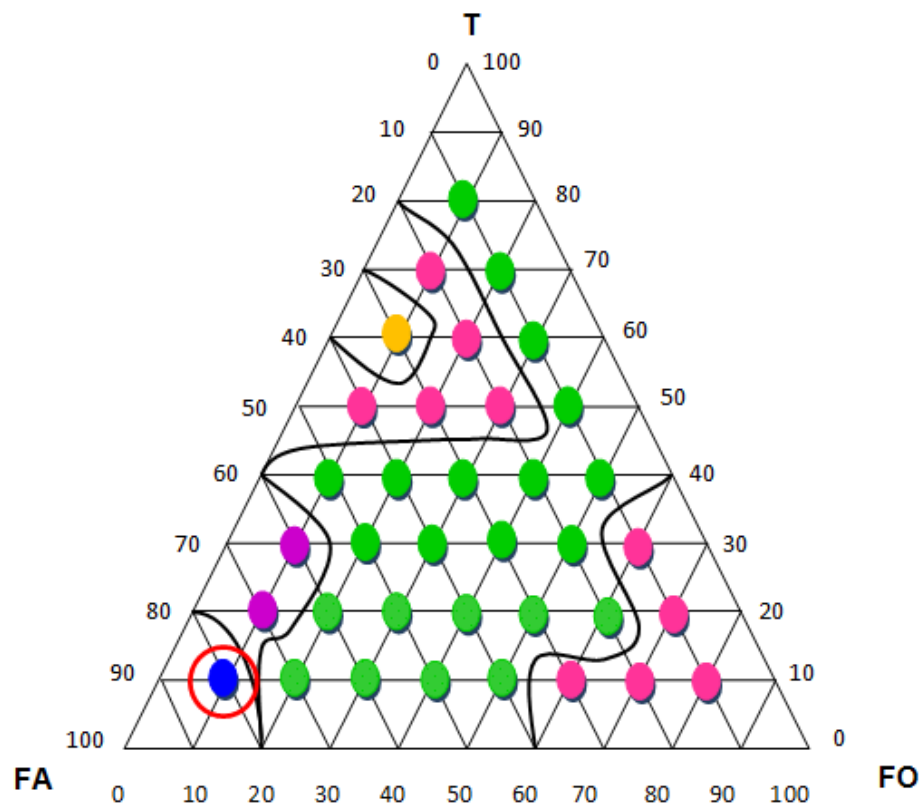
SVT = sistema viscoso transparente

Foi desenvolvido outro sistema denominado ME4, utilizando os componentes: colesterol (fase oleosa), tampão fosfato pH 7,4 com dispersão polimérica de poloxamer 407 a 10% (fase aquosa) e a mistura de Brij98[®] e fosfatidilcolina colina de soja na proporção 2:1 (tensoativo).

Foram obtidas formulações com diferentes características em cada ponto, variando as proporções de fase oleosa, fase aquosa e tensoativo. As características são mostradas no diagrama de fases (**Figura 8**) como regiões denominadas Sistemas Líquido-Transparentes (SLT), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10%), Sistema Líquido Opaco (SLO) em pontos com baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo entre 20 e 30%, Sistemas Viscosos Transparentes (SVT) com a concentração de tensoativo de 60% e a fase de óleo com 10%, Sistemas Viscosos e Opacos (SVO) encontrados na região maior região do diagrama de fases com concentrações de óleo entre 20 e 60% independente da concentração de tensoativo e Separação de Fases (SF) encontradas em duas regiões do diagrama: uma com fase oleosa com concentração entre 60 e 80% e tensoativo entre 10 e 30%, outra com fase oleosa entre 10 e 30% com fase com tensoativo entre 50 e 70% nas formulações.

O ponto escolhido para o estudo também foi a formulação F1, sistema líquido transparente (**Figura 8**), que é composta de 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa. Essa formulação foi escolhida para a incorporação dos compostos heterolépticos de Ru(II) devido ser a mais líquido-transparente, ou seja, a mais adequada para o trabalho, entretanto, mais viscoso que o ponto escolhido do sistema ME3 portanto, o sistema ME3 foi selecionado para incorporação dos compostos Scars e continuação do projeto. A diferença da viscosidade pode ser observada através do ensaio reológico (item 4.2) que foi realizado para os 2 sistemas.

Figura 8. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema ME4.



Fonte: autor



SLT = sistema líquido transparente – ponto escolhido para incorporar os compostos



SLO = sistema líquido opaco



SVO = sistema viscoso opaco



SF = separação de fase

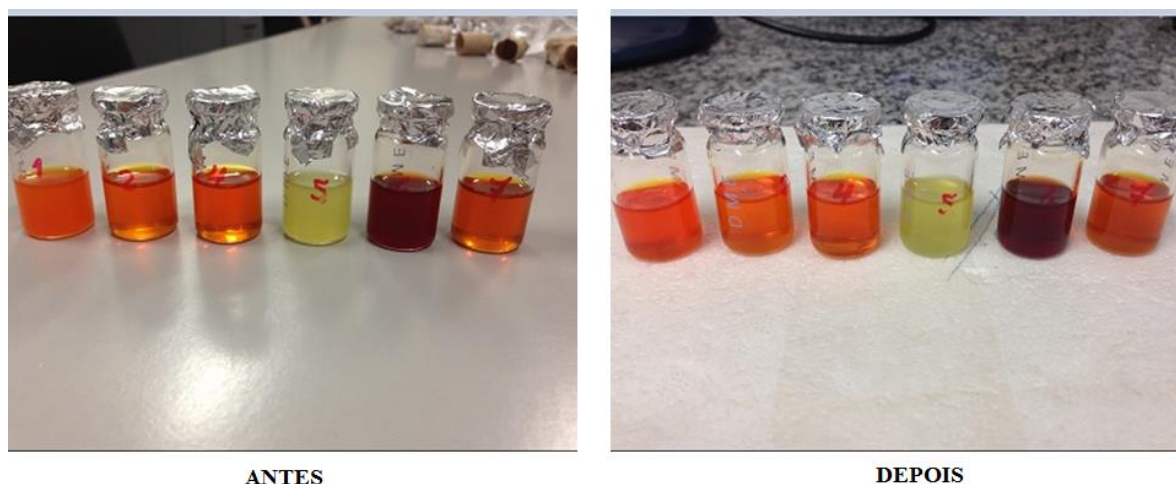


SVT = sistema viscoso transparente

4.2 Incorporação dos compostos de Ru (II)

A **Figura 9** mostra os complexos heteroléticos de Ru(II) solubilizados em DMSO antes e após serem sonicados no sonicador de haste (Q700 da Qsonica®). Observa-se que após a sonicação dos compostos não houve alteração da coloração das soluções

Figura 9. Complexos SCARs solubilizados em DMSO, antes e depois de serem sonicados.



Fonte: Autor

4.3 Caracterização dos Sistemas Nanoestruturados

4.3.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

A **Tabela 3** apresenta os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e o índice de polidispersão para o sistema lipídico nanoestruturado ME3 (base) e para os compostos de coordenação incorporados na microemulsão. Observando a tabela, o tamanho das partículas da ME foi igual a $171,6 \pm 0,8185$. A incorporação dos compostos de coordenação causou uma pequena variação no tamanho das partículas, sem exceção, variando de $185,1 \pm 0,6083$ a $213,0 \pm 2,515$. Todos os valores obtidos estão na faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para MEs (Formariz et al, 2005).

Tabela 3. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e índice de polidispersão para a microemulsão (base) e para os compostos incorporados na ME3 após 24hs e após 3 meses.

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)		Índice de Polidispersão	
	após 24hs	após 3 meses	após 24hs	após 3 meses
BASE	171,6 ± 0,8185	164,2 ± 1.644	0,152 ± 0,014	0,209 ± 0,009
SCAR1	213,0 ± 2,515	174,2 ± 0,4509	0,258 ± 0,008	0,180 ± 0,016
SCAR2	208,9± 2,598	225,2 ± 2,702	0,211 ± 0,008	0,237 ± 0,004
SCAR4	185,1 ± 0,6083	211,2 ± 1,900	0,144 ± 0,012	0,231 ± 0,012
SCAR5	196,6 ± 0,8635	212,9 ± 3,161	0,178 ± 0,008	0,241 ± 0,013
SCAR6	202,4 ± 2,015	197,3 ± 0,8185	0,219 ± 0,015	0,224 ± 0,006
SCAR7	207,8 ± 2,412	239,4 ± 2,219	0,213 ± 0,008	0,240 ± 0,012

Foram realizadas as medidas de tamanho das partículas e índice de polidispersão após 3 meses para análise da estabilidade das formulações. Os dados foram analisados estatisticamente com o software GraphPad Prism versão 6.07, através do teste t student para amostras independentes.

A análise da variação no tamanho das partículas e índice de polidispersão através do teste t de student indicou valor de $P=0.5826$ e $P=0.5353$ respectivamente, com resultado não significativo, indicando que não houve alteração significativa nos valores no período analisado.

4.3.2 Análise do Potencial Zeta

A Análise do potencial Zeta determina se há presença de carga na superfície das gotículas que constituem a microemulsão. A **Tabela 4** apresenta os resultados do potencial zeta para o sistema nanoestruturado ME3 e os compostos incorporados nesse sistema.

Tabela 4. Análise do potencial Zeta do sistema ME3, base e compostos SCARs incorporados.

Formulação	Potencial Zeta (mV) (média + Sd)
BASE	-21,5 ± 0,624
ME3-SCAR1	0,305 ± 0,0889
ME3-SCAR2	0,581 ± 0,207
ME3-SCAR4	1,80 ± 0,142
ME3-SCAR5	0,802 ± 0,174
ME3-SCAR6	-8,51 ± 1,04
ME3-SCAR7	-1,40 ± 1,08

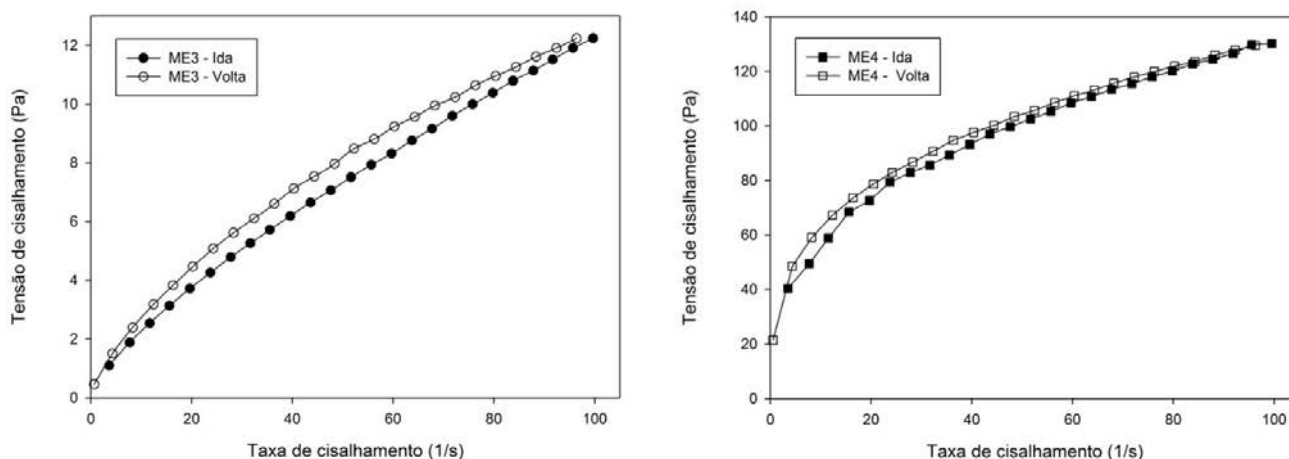
Fonte: Autor

A carga negativa da base é proveniente dos componentes da formulação. A fosfatidilcolina de soja (Figura 2) possui grupamentos ésteres livre $[-O-C=O]^-$ que contribuem para a carga negativa do sistema, bem como o oleato de sódio que também possui o grupo éster associado ao átomo de sódio que se dissocia $[-O-C=O]^-$ e o colesterol que em sua estrutura possui um grupamento hidroxila livre $[OH]^-$.

4.3.3 Reologia

A **Figura 10** apresenta os Reogramas das formulações ME3 e ME4 a temperatura de 25°C. Nesta observa-se que a formulação ME3 apresentou-se não Newtoniana do tipo pseudoplástico com curva descendente do tipo reopético, mostrando-se menos viscosa que a formulação ME4, uma vez que esta necessita de uma tensão de cisalhamento maior para causar uma deformação na amostra, caracterizando-a como não Newtoniana do tipo plástica com curva descendente do tipo reopética. Essa diferença discrepante entre as formulações deve-se à adição do polímero Poloxamer 407 o qual tornou facilmente visível o aumento da viscosidade.

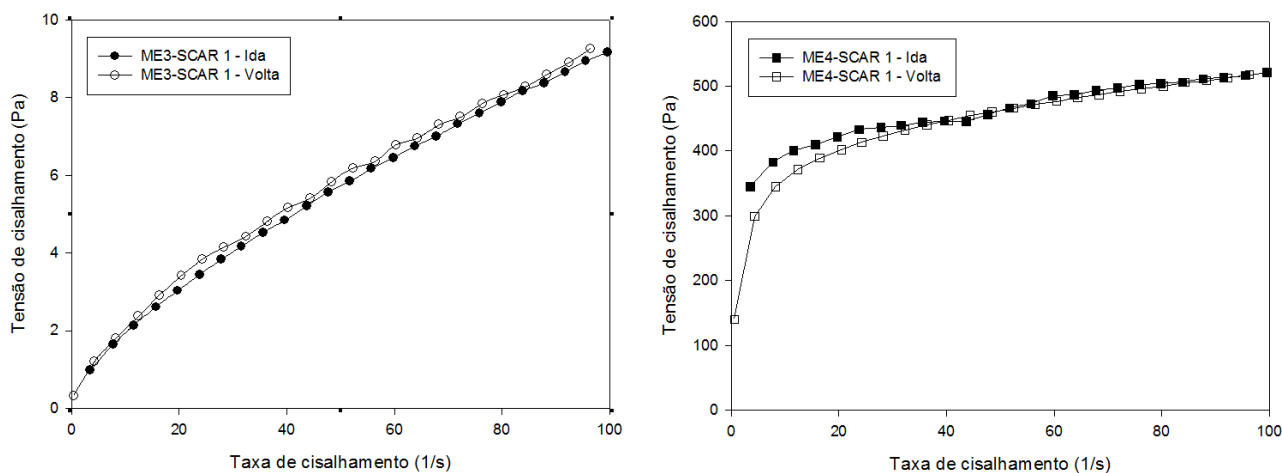
Figura 10. Reogramas das formulações ME3 e ME4 na temperatura de 25 °C



A **Figura 11** apresenta os reogramas das formulações ME3-SCAR1 e ME4-SCAR1 a temperatura de 25°C. Analisando as figura é possível observar que nas amostras contendo o composto SCAR1 incorporado nas diferentes bases, houve a conservação do comportamento reológico.

Nesta, observa-se que as amostras com a adição do composto de Ru (II) SCAR1 demonstrou, no sistema ME3-SCAR1, uma desestruturação do sistema em relação ao sistema ME3. Contudo, no sistema ME4-SCAR1, houve maior estruturação do sistema após a adição do composto SCAR1 quando comparado com o sistema ME4.

Figura 11. Reogramas das formulações ME3-SCAR1 e ME4-SCAR1 na temperatura de 25°C.



Após observar os reogramas apresentados nas **Figuras 10 e 11**, reafirma-se os comportamentos observados pela lei das potências, descritas pela Equação 3:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 3})$$

Onde k é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e n é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa fluido pseudoplástico ou plástico, e $n = 1$ fluido newtoniano (CARVALHO, 2009; BERNEGOSSI, 2014).

Na **Tabela 5** estão dispostos os valores de η e k das formulações selecionadas.

Tabela 5. Índice de escoamento (η) e índice de consistência (k) dos sistemas selecionados, analisados em temperatura de armazenamento (25 °C).

Formulação	H (média + Sd)	K(média + Sd)
ME3	0,736±0,001	0,411±0,02
ME4	0,361±0,003	24,750±0,309
ME3-SCAR1	0,681±0,001	0,398±0,003
ME4-SCAR1	0,123±0,004	290,729±4,903

Fonte: autor.

Observa-se que em todas as formulações analisadas apresentaram η menor que 1, demonstrando ser pseudoplásticas, concordando com a interpretação feita nos reogramas anteriores, ressalvo as formulações ME4 e ME4-SCAR1 que necessitam de uma tensão inicial para acontecer o escoamento, sendo assim consideradas, plásticas de Bingham. Também é possível observar que as formulações ME3 e ME3-SCAR1 apresentaram valores de k menores que as ME4 e ME4-SCAR1, demonstrando ser menos consistentes. Além disso, observa-se que após a adição do rutênio (II), ou seja, a formulação ME4-SCAR1, quando comparado com a formulação sem rutênio (II), demonstra uma estruturação no sistema, apresentando um índice de consistência maior.

4.4 Ensaios Biológicos

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Citotoxicidade (IC₅₀) e Índice de Seletividade (IS)

A atividade anti-TB dos compostos foi determinada pelo Ensaio de Microdiluição com Resazurina (REMA). As soluções estoque dos compostos de teste não emulsionados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). As Microemulsões foram testadas adicionando-as diretamente à placa.

A **Tabela 6** apresenta os resultados da CIM dos compostos solubilizados em DMSO e incorporados no sistema ME3. Esta também apresenta os resultados dos ensaios de Citotoxicidade (IC₅₀) utilizando células VERO (ATCC CCL81) e Índice de seletividade (IS) dos compostos.

Tabela 6. Atividade anti-TB (CIM), Citotoxicidade (IC₅₀) utilizando células VERO (ATCC CCL81) e Índice de seletividade (IS) dos compostos de Rutênio (II) incorporados e não incorporados na ME3.

Identificação	Compostos	CIM - µg/mL		IC ₅₀ - µg/mL		IS – IC ₅₀ /CIM		IS
		DMSO	ME3	DMSO	ME3	DMSO	ME3	DMSO/ME
SCAR1	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,18	1,37	43,9	70,7	37,20	51,60	+38,7%
SCAR2	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	1,08	1,88	20,3	50,5	18,79	26,86	+42,95%
SCAR4	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	1,34	1,71	20,7	48,1	15,44	28,12	+82,12%
SCAR5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	1,32	2,93	8,1	54,6	6,10	18,63	+205,4%
SCAR6	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	6,8	>25	134,9	56,9	19,83	-----	-----
SCAR7	[Ru(pic)(dppe)(phen)]PF ₆	0,98	1,71	22	46	22,44	26,90	+20,0%
BASE	ME3	-----	>25	-----	62,6	-----	-----	-----

Fonte: Autor.

A **Tabela 7** apresenta os resultados da CIM, os valores dos ensaios de Citotoxicidade (IC₅₀) utilizando macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e Índice de seletividade (IS) dos compostos SCARs.

Tabela 7. Atividade anti-TB (CIM), Citotoxicidade (IC₅₀) utilizando macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e Índice de seletividade (IS) dos compostos de Rutênio (II) incorporados e não incorporados na ME3.

Identificação	Compostos	CIM - µg/mL		IC ₅₀ - µg/mL		IS – IC ₅₀ /CIM		IS
		DMSO	ME3	DMSO	ME3	DMSO	ME3	DMSO/ME
SCAR1	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,18	1,37	22,3	59,6	18,90	43,50	+130,2%
SCAR2	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	1,08	1,88	6,5	50,5	6,02	26,86	+346,2%
SCAR4	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	1,34	1,71	7,6	92,3	5,67	53,98	+852%
SCAR5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	1,32	2,93	3,9	33,2	2,95	11,33	+284,1%
SCAR6	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	6,8	>25	NC	68,9	NC	NC	-----
SCAR7	[Ru(pic)(dppe)(phen)]PF ₆	0,98	1,71	14,4	77,9	14,69	45,56	+210,2%
BASE	ME3	-----	>25	-----	53,4	-----	-----	-----

Fonte: Autor.

Analizando as **Tabelas 6 e 7**, podemos notar que a atividade anti-TB dos complexos heterolépticos de rutênio (II) foi mantida para todos os compostos incorporados, exceto o SCAR 6. Em um estudo realizado em 2013 avaliando a atividade anti-TB de compostos metálicos da primeira série do bloco *d* com tiossemicarbazonas, Oliveira demonstrou que a atividade destes compostos é dependente da carga. Compostos não iônicos apresentaram atividade, analogamente nos compostos iônicos a atividade foi reduzida ou perderam a atividade (OLIVEIRA, 2013). Baseado no ensaio de Análise do Potencial Zeta no item 4.3.2, quando o composto SCAR 6 foi incorporado na microemulsão ME3 passou a apresentar carga negativa de aproximadamente -8,5 mV, reduzindo a atividade do composto.

Observamos também que houve redução da toxicidade tanto nos ensaios utilizando células VERO como Macrófagos, chegando a diminuir 10 vezes a toxicidade para alguns compostos, como demonstrado na coluna IS DMSO/ME, onde foi realizada a comparação em porcentagem do quanto aumentou o índice de seletividade dos compostos microemulsionados em comparação com os compostos solubilizados em DMSO. O Composto SCAR 6 já apresentava atividade reduzida quando não incorporado, quando na microemulsão, perdeu sua atividade, este composto não foi utilizado para o ensaio de biodisponibilidade oral.

Cabe observar que a base da microemulsão não mostrou atividade anti-TB. A CIM dos complexos incorporados, exceto do complexo SCAR 6, aumentou muito pouco, provavelmente devido a liberação mais lenta dos complexos da matriz da microemulsão.

O complexo SCAR 6 demonstrou atividade quando solubilizado em DMSO mas perdeu quando incorporado na microemulsão. Conforme a figura 1, este complexo, diferente dos demais complexos SCARs, não tem o PF_6 como contra-íon e possui dois átomos de Cl⁻ que poderiam estar sendo deslocados quando solubilizado em DMSO, dando origem a uma estrutura diferente, o que não ocorre na microemulsão.

Esses resultados mostraram que o sistema lipídico nanoestruturado (ME3) foi capaz de reduzir a citotoxicidade dos complexos de Ru (II) e manter a atividade anti-TB. (FREITAS, et al 2014). Estes resultados podem ser explicados pela presença do colesterol na microemulsão, tratando-se do esteroide presente em maior quantidade no corpo humano, foi escolhido como componente do sistema principalmente com o intuito de reduzir a toxicidade dos complexos incorporados na microemulsão, bem como promover a interação com a membrana celular do MTB, que é constituída por uma bicamada fosfolipídica, facilitando a atuação dos compostos SCARs.

4.4.2 Comparação da CIM com sistemas nanoestruturados utilizando Ác. Micólico como constituinte da fase oleosa.

O composto SCAR1 foi o que melhor apresentou atividade anti-TB quando presente na microemulsão, dessa forma, ele foi escolhido para análise da atividade anti-TB incorporado nas formulações contendo ácido micólico. Os resultados estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Atividade anti-TB do composto SCAR1 nos diferentes sistemas lipídicos.

Sistema Lipídico	Composição (O)	CIM - µg/mL
ME1	Ac. micólico e colesterol (1:9)	1,21
ME2	Ac. micólico e colesterol (1:19)	1,40
ME3	Colesterol	1,57

Fonte: Autor.

De acordo com o resultado obtido, a variação da CIM do composto SCAR1, incorporado nos diferentes sistemas nanoestruturados não foi significativa, não justificando o uso do ácido micólico na fase oleosa das microemulsões.

4.4.3 Determinação da CIM frente aos 5 isolados clínicos sensíveis, MDR à INH e RMP com perfil fenotípico e genotípico de resistência determinados

A CIM dos compostos frente aos isolados clínicos foi determinada empregando a metodologia do REMA sugerida por Palomino et al. (PALOMINO et al, 2002) e descrita anteriormente, substituindo a cepa padrão H₃₇Rv por um painel de isolados clínicos sensíveis e MDR (**Tabela 9**). O painel de isolados clínicos foi caracterizado fenotipicamente quanto à resistência através da automação laboratorial BACTECTM MGITTM 960 Mycobacterial Detection System e os resultados comparados à metodologia do REMA. O perfil de resistência genotípica foi analisado através da técnica de detecção de polimorfismo no DNA PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism) e posterior sequenciamento (MIYATA et al, 2011). Os isolados clínicos foram selecionados de maneira a obter um perfil heterogêneo de resistência.

Tabela 9. Painel de isolados clínicos com perfil de resistência fenotípica determinada pela metodologia do REMA e resistência genotípica através do sequenciamento de genes detectados inicialmente pelo polimorfismo no DNA PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism).

BACTEC MGIT 960					PERFIL FENOTÍPICO												PERFIL GENOTÍPICO											
ISOLADOS	INH		RMP		REMA (µg/mL)			ISONIAZIDA						RIFAMPICINA														
								<i>inhA</i>			<i>katG</i>			<i>ahpC</i>			<i>rpoB</i>											
	0,1 µg/mL	1,0 µg/mL	INH	RMP	Nucl.	códon	Aa	Nucl.	códon	Aa	Nucl.	códon	Aa	Nucl.	códon	aa												
46	R	R	> 50	> 50		n.d.		G > C	315	Ser > Thr		n.d.		CA > TG	526	His > Cys												
100	S	S	> 50	< 0,195		n.d.				n.d.		n.d.		C > G	531	Ser > Trp												
110	R	R	> 50	0,4		n.d.				n.d.		n.d.		C > T	531	Ser > Leu												
158	R	R	> 50	> 50		n.d.				n.d.		n.d.			n.d.													
169	R	R	> 50	> 50	C > T	15	Arg > Stop	T > A	337	Tyr > Asn	C > T	81	Hys > Tyr	C > T	531	Ser > Leu												

INH: Isoniazida; RMP: Rifampicina; Nucl.: nucleotídeo; aa: aminoácido; n.d. não detectado; azul: sensível; vermelho: resistente

Fonte: Miyata et al, 2011

Dentre os 80 isolados de *M. tuberculosis* que compõem o painel (MIYATA, et al 2011), foram selecionadas 5 cepas e utilizadas para análise. Assim, 1 isolado era sensível a INH e RMP, e 4 TB-MDR, segundo a técnica do BACTECTM MGITTM 960.

A avaliação de compostos frente a isolados clínicos resistentes pode fornecer dados sobre a possível resistência cruzada dos novos complexos com os fármacos. Segundo o pipeline do Laboratório Prof. Dr. Hugo David, da FCFAR/UNESP Araraquara, compostos com atividade inferior ou igual a 10 µg/mL, são considerados potenciais agentes anti-TB. Na **Tabela 10** encontram-se os resultados da determinação da CIM em isolados clínicos provenientes do hospital Clemente Ferreira. Foram utilizadas as cepas CF 46, 100, 110, 158 e 156. Como se observa na tabela, as cepas CF 46, 158 e 169 apresentaram resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina e as cepas CF 100 e 110, apresentam resistência a isoniazida.

Tabela 10. Atividade anti-TB dos compostos SCARs solubilizados em DMSO, incorporados na ME3 e dos fármacos já utilizados na terapia anti-TB frente aos isolados clínicos provenientes do Hospital Clemente Ferreira. CF46, 158 e 169 resistentes a RIF e IZN, CF100 e C F110 resistentes a IZN.

Compostos testados	Conc inicial	CF46		CF100		CF110		CF158		CF169	
	µg/ml	µg/ml	MM	µg/ml	MM	µg/ml	MM	µg/ml	MM	µg/ml	MM
Base da Microemulsão	12,5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
ME3 - Scar1	12,5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	11,9	12,5	12,0	12,6
ME3 - Scar2	12,5	>12.5	>12.5	3,3	3,4	>12.5	>12.5	5,7	5,8	11,2	11,4
ME3 - Scar4	12,5	>12.5	>12.5	2,9	3,0	>12.5	>12.5	3,4	3,5	5,7	5,8
ME3 - Scar5	12,5	>12.5	>12.5	5,8	5,0	>12.5	>12.5	5,5	4,7	8,5	7,3
ME3 - Scar6	12,5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
ME3 - Scar7	12,5	>12.5	>12.5	3,0	3,2	>12.5	>12.5	2,2	2,3	3,6	3,8
DMSO - Scar 1	12,5	3,7	3,9	10,9	11,5	1,7	1,8	2,6	2,7	2,9	3,1
DMSO - Scar 2	12,5	3,0	3,1	5,7	5,8	1,9	1,9	1,6	1,6	2,6	2,7
DMSO - Scar 4	12,5	3,0	3,1	5,4	5,5	2,3	2,4	2,7	2,8	3,0	3,1
DMSO - Scar 5	12,5	4,8	4,1	5,1	4,4	2,7	2,3	2,9	2,5	2,9	2,5
DMSO - Scar 7	12,5	5,2	5,5	7,3	7,7	4,0	4,2	3,0	3,2	4,4	4,6
AM	12,5	0,9	1,5	0,7	1,2	0,5	0,9	0,6	1,0	0,6	1,0
CAP	12,5	2,2	2,9	5,8	7,7	3,0	4,0	1,7	2,3	1,4	1,9
GAT	12,5	1,4	3,5	0,5	1,2	<0.049	<0.049	0,2	0,5	1,2	3,0
IZN	50,0	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
KAN	12,5	4,3	8,9	7,8	16,1	2,8	5,8	2,8	5,8	1,5	3,1
MOX	12,5	2,1	5,2	0,4	1,0	<0.049	<0.049	0,2	0,5	1,6	4,0
OFL	12,5	3,8	10,5	0,9	2,5	0,3	0,8	0,7	1,9	11,5	31,8
RIF	50,0	>50	>50	<0.195	<0.195	0,4	0,5	>50	>50	>50	>50

Fonte: Autor.

A resistência aos fármacos em MTB é causada por mutações em diferentes genes do bacilo que se refletem nas proteínas envolvidas com as interações com os fármacos utilizados. A resistência à INH, por exemplo, está relacionada com uma variedade de mutações em um ou mais genes, como o que codifica a enzima catalase (*katG*) (Miyata et al, 2011). Os complexos SCARs solubilizados em DMSO apresentaram atividade promissora frente a todas as cepas resistentes. Quando estes foram incorporados na ME3, mantiveram sua atividade frente as cepas CF 100 (resistente a IZN), 158 e 169 (resistentes a IZN e RIF). O mecanismo de ação destes complexos de Ru (II) ainda não foi elucidado. Através deste estudo, podemos sugerir que seu mecanismo de ação difere dos principais fármacos utilizados na terapêutica – isoniazida e rifampicina.

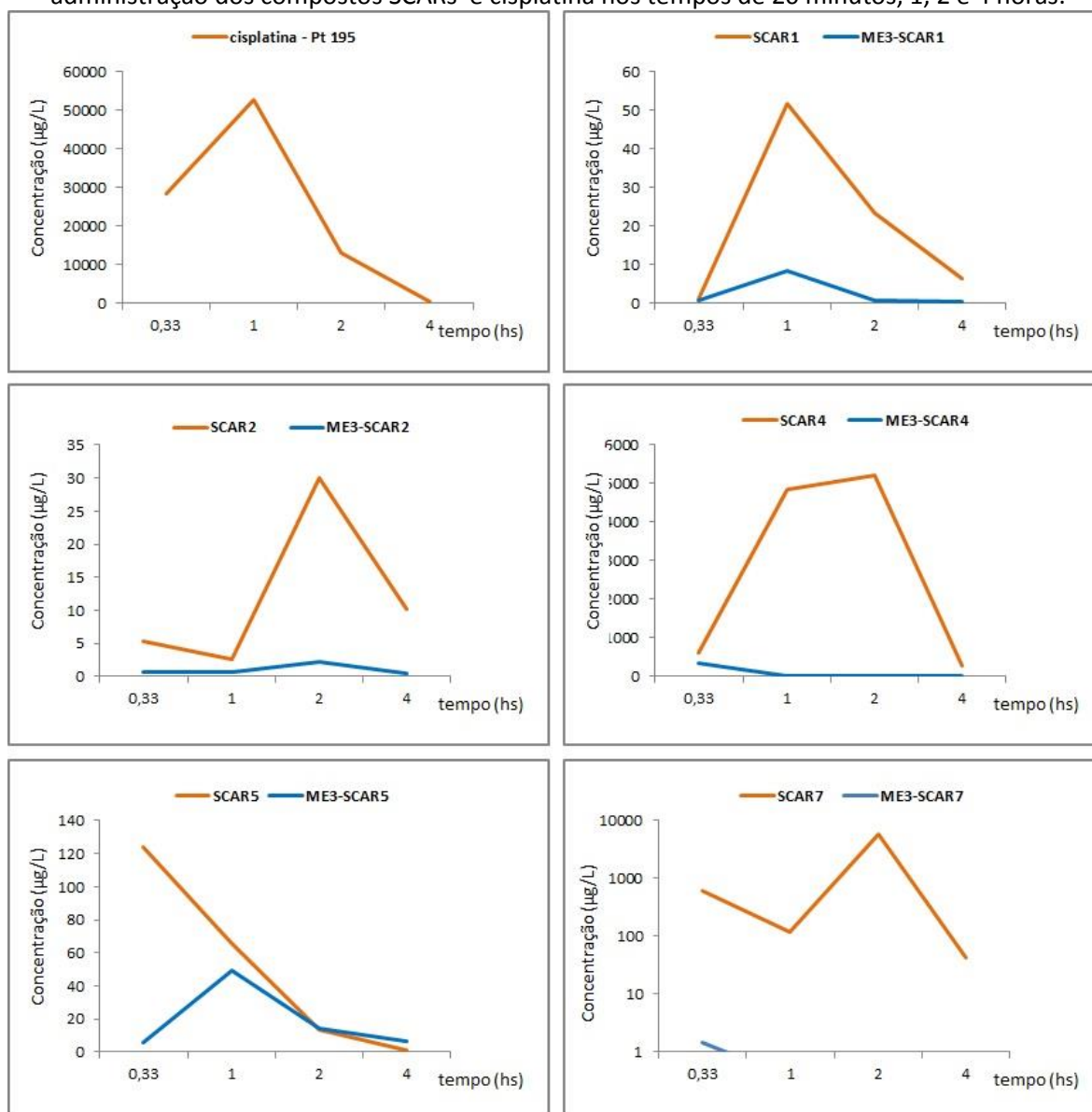
4.5 Quantificação via ICP-MS

Este ensaio revela se o íon metálico foi absorvido ou não. Através desta metodologia não é possível avaliar parâmetros farmacocinéticos ou farmacológicos como a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção. A quantificação estima em µg/L a concentração do íon metálico no plasma em diferentes tempos de coleta após a administração dos compostos via gavagem nos animais.

A **Figura 12** traz os gráficos obtidos através das leituras realizadas no ICP-MS Thermo XSeries II das amostras de plasma de camundongos que receberam via oral as soluções contendo os compostos SCARs solubilizados em óleo de girassol ou incorporados na ME3, nos tempos de 20 minutos, 1, 2 e 4 horas após sua administração. Foi utilizado um grupo controle, os valores obtidos nesta leitura foi descontado dos resultados das demais amostras analisadas. Foi utilizada a cisplatina como fármaco padrão e quantificou-se a Pt de massa atômica 195, a que se encontra em maior abundância. Para a quantificação de Ru, foi analisado o Ru 102, também o mais abundante que apresenta menos interferentes na análise.

Os coeficientes de correlação (R^2) ficaram acima de 0,999 para todos os analitos. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados conforme a Metodologia, resultando em LD = 0,0006968 µg/L (Ru 102); LD = 0,0003954 µg/L (Pt 195); LQ = 0,002322 µg/L (Ru 102); LQ = 0,001318 µg/L (Pt 195).

Figura 12: Quantificação de Ru e Pt (fármaco controle) em plasma de camundongos BALB/C após administração dos compostos SCARs e cisplatina nos tempos de 20 minutos, 1, 2 e 4 horas.



Fonte: Autor

Analisando o fármaco controle e sabendo que este apresenta biodisponibilidade oral, a quantificação do metal presente em sua composição nos mostra um pico da Pt no tempo de 2 horas após a coleta do sangue, com concentração aproximada de 50.000 µg/L.

Foi encontrado e quantificado o Ru 102 no plasma dos animais que receberam os compostos SCARs tanto solubilizados em óleo de girassol como incorporados no sistema nanoestruturado ME3. Os que apresentaram maiores concentrações do elemento

analisado foram as amostras com o composto SCAR 4 em óleo de girassol após 2 horas, exibindo uma concentração de aproximadamente 5200 µg/L, e do composto SCAR 7 também em óleo de girassol após 2 horas na concentração aproximada de 6000 µg/L.

As menores concentrações de Ru, para todos os compostos SCARs, encontradas nas amostras dos animais que receberam a microemulsão em comparação com os que receberam os compostos solubilizados em óleo de girassol, são justificadas pela liberação controlada que ocorre quando o composto está em um sistema nanoestruturado, o que garantiu a menor toxicidade e conseqüentemente, a sobrevivência dos animais que receberam os compostos incorporados no sistema ME3. Avaliando a dupla de compostos SCAR 1 e ME3-SCAR1 por exemplo, o pico do íon metálico proveniente do composto solubilizado em óleo de girassol ocorre na amostra coletada 1 hora após administração do composto com concentração aproximada de 51 µg/L, enquanto o mesmo composto incorporado no sistema ME3 apresentou o pico no mesmo intervalo de tempo porém, com concentração do íon metálico de aproximadamente 8,2 µg/L, comprovando a liberação mais lenta da molécula para a corrente sanguínea.

5 CONCLUSÕES

O sistema ME1, proposto inicialmente no projeto era constituído de colesterol e ácido micólico (9:1) como fase oleosa, oleato de sódio, óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (Emulgin®) e fosfatidilcolina de soja, na proporção 6:8:3, como tensoativo e tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa. Este se tornou inviável de ser utilizado, pois em comparação da atividade do composto SCAR1 incorporado nos sistemas ME1, ME2 e ME3 frente ao MTB, não foi observado aumento considerável da atividade anti-TB para justificar o uso do ácido micólico, um componente com custo muito elevado. Por esse motivo, e baseado nos resultados do ensaio de reologia, o sistema escolhido para o ensaio com cepas resistentes e biodisponibilidade oral, foi o ME3.

Quando se compara a base da ME3 e as formulações contendo os complexos metálicos, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas, sendo esse um forte indício de que realmente ocorreu a incorporação dos respectivos complexos no sistema lipídico nanoestruturado. O índice de polidispersidade (IPD) é o índice que mostra

a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre $0,152 \pm 0,014$ e $0,258 \pm 0,008$ apresentando uma média faixa de variação entre a base e as formulações com os compostos incorporados, esses dados permiti inferir que as amostras apresentam certa homogeneidade. A análise do tamanho de partículas e índice de polidispersão após 3 meses de preparo das MEs, mostrou que esta apresenta estabilidade após o período avaliado, comprovado pelo teste t student para amostras independentes.

A citotoxicidade dos compostos heterolépticos de Ru (II) diminuiu quando estes foram incorporados no sistema nanoestruturado ME3. Os resultados foram obtidos através do ensaio de citotoxicidade utilizando as linhagens celulares VERO (ATCC CCL81) e Macrófagos (ATCC TIB-67). Durante o ensaio de biodisponibilidade, observou-se que os camundongos que ingeriram os compostos SCARs solubilizados em óleo de girassol morreram, enquanto os que receberam as microemulsões continuaram vivos, comprovando que os compostos quando incorporados na ME3 se tornaram menos tóxicos.

Os compostos incorporados na microemulsão ME3 apresentaram atividade frente alguns isolados clínicos resistentes, resultado muito importante visto a necessidade de se encontrar um composto ativo contra MDR-TB.

A análise via ICP-MS demonstrou que o íon metálico foi absorvido. Foi encontrado Ru no plasma dos camundongos que receberam os compostos SCARs solubilizados em óleo de girassol e também nos que receberam a microemulsão.

Encontrar novos fármacos representa um grande desafio. Os compostos SCARs se mostraram promissores apresentando atividade anti-TB e baixa toxicidade. O estudo de novos sistemas de liberação de fármacos é importante para a redução dos efeitos colaterais, as interações farmacológicas e toxicológicas. O sistema com colesterol como fase oleosa reduziu significativamente a toxicidade dos compostos analisados.

Os objetivos do trabalho foram alcançados e os resultados muito importantes para continuação dos estudos com os compostos heterolépticos de Ru(II).

6 REFERÊNCIAS

AHMAD, S. et al. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, n. 7, p. 1633-1645, 2006.

ALVES, S. L. A.; METZKER, S; ARAUJO FILHO, J. Á.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 655-661, Setembro, 2011.

ANIL, K; ARNOULD, L; LOUNIS, N; GUILLEMONT, J; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 9657, p. 469-483, Janeiro, 2011.

BATISTA, B. L.; GROTO, D; RODRIGUES, J. R.; SOUZA, V.C.O. ; BARBOSA, F. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Anal. Chim. Acta.**, v. 646, n.30, p. 23-29, 2009.

BERNEGOSSI, J. **Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o peptídeo KSL-W**. 2014. f.104. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (São Paulo – Brasil).

BERNHARDT, P. V. et al. Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 13, n. 1, p. 107-119, 2008.

CAMARGO JR, F. B. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo pantenol e avaliação dos seus efeitos hidratantes na pele humana por bioengenharia cutânea**. 2006. f.26. Dissertação de Mestrado pelo Pós Graduação em

Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – (São Paulo – Brasil).

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. 2009. f.143. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (São Paulo – Brasil).

EL-RIDY, M.S.; MOSTAFA, D.M.; SHEHAB, A.; NASR, E.A.; ABD EL-ALIM, S.; Biological evaluation of pyrazinamide liposomes for treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Pharm.**, v.330, p.82-88, 2007.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **Acs Nano** v. 3: p.16-20, 2009.

FDA – U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – 15.05.2015 – disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/204384s005lbl.pdf> acessado 02.07.2015.

FERREIRA, A. A.; QUEIROZ, K. C. S.; TORRES, K. P.; FERREIRA, M. A. F.; ACCIOLY, H.; ALVES, M. S. C. Os fatores associados a Tuberculose pulmonar e a baciloscopia. **Rev. Bras. Epid.** v. 2, n.8, p 142-149, 2005.

FORMARIZ, T. P. et al. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Coll. Surf. B Biointerf.**, v. 77, p. 47-53, 2010.

FORMARIZ, T. P.; URBANI, M. C.; SILVA JUNIOR, A; GREMIÃO, M. P.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos **Rev. Bras. C. Farm.** São Paulo, v. 41, n. 3, p. 301-313, Julho/Setembro, 2005.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. S.; FRANZINI, C. M.; SILVA JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release. **Coll. Surf. B-Biointerf.**, v.63, p.287-295, 2008.

FREITAS, et al. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, p. 5999-6008, 2014.

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUES, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Lab. Animal Europe**, v. 34, n. 9, p. 39-43, 2005.

GRILL, A. E.; et al. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.

GRUPPO, V.; et al. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 1245-1250, 2006.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

KISICH, K.O.; GELPERINA, S.; HIGGINS, M.P.; WILSON, S.; SHIPULO, E.; OGANESYAN, E.; HEIFETS, L. Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J of Pharm.** v. 345, p.154-162, 2007.

KREIDEL, R. N. **Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nimodipino empregando PEG 6000 ou Poloxamer 407**. 2009, f.22. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – (São Paulo – Brasil).

LAWRENCE, M. J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.45, p.89-121, 2000.

LALLOO, U.G.; NYAMANDE, K; DHEDA, K. 2010: The year in review, Part I. **Int. J of Tuberc. Lung Dis.**, v. 15 n.9, p1149-1153, 2011.

LIENHARDT, C; VERNON, A; RAVIGLIONE, M. C. New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, 2010, v. 16, p 186–193, 2010.

MAINARDES, R. M. et al. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Curr. Drug Delivery**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MARTINCICA, A.; MILACIC, R.; VIDMARA, J.; TUREL, I.; KEPPLER, B. K.; SCANCARA, J. New method for the speciation of ruthenium-based chemotherapeutics in human serum by conjoint liquid chromatography on affinity and anion-exchange monolithic disks. **J. Chromatogr. A**, v. 1371, p. 168–176, 2014.

MARTINI, P. C. **Avaliação da segurança e estudo da permeação e retenção cutânea de géis de ácido hialurônico**. 2011. f.32. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – (São Paulo – Brasil).

MIYATA, M. et al. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil phenotypic and genotypic methods. **Biomed. Pharmacother.**, v. 65, p. 456-459, 2011.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - a review. **Trop. J. of Pharma. Res.**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 1, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v. 14, n. 7-8, p. 76-80, 2002.

OLIVEIRA, J. S. et al. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, n. 19, p. 2409-2424, 2006.

OLIVEIRA, C. G. **Síntese e caracterização de metais da primeira série do bloco d com tiossemicarbazonas para investigar seu potencial contra *Mycobacterium tuberculosis***. 2013, p. 96-97. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP, (São Paulo – Brasil).

OLIVEIRA, M. B. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo fluconazol para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. 2012, p. 35-37. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, (São Paulo – Brasil).

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A; CAMACHO, M; GUERRA, H; SWINGS, J; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n.48, p. 2720–2722, Agosto, 2002.

PAVAN, FR. **Determinação do Perfil Pré-clínico da Atividade Anti-tuberculose In Vitro e In Vivo de Complexos Heterolépticos de Rutênio (II) com Fosfinas, Diminas e Picolinato Como Ligantes**. 2011, f101. Tese de Doutorado no Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Paulo.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F., LEITE, LEITE, S. R. A.; BATISTA, C; ELLENA, J; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V; GAMBINO, D; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p 5099-5107, 2011.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p 598–601, 2010.

PAVAN, F. R. **Atividade Anti - *Mycobacterium tuberculosis* Intra e Extracelular e Citotoxicidade dos Complexos de Rutênio e Vanádio e seus Ligantes**. 2009, f.93. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Paulo.

PESTANA, K, C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral. Estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica**. 2009. f.41. Tese de Doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (São Paulo – Brasil).

ROSALBA, L. D.; MECKESL, M; FERNANDEZ, S. S.; SALINAS, G. M.; VILARREAL, J. V.; TORRES, J; HERRERA, J. L.; ARELLANES, A. J. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Mem. Inst. O. Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n.1, p. 45-51, Fevereiro, 2010.

Secretaria de Vigilância de Saúde (SVS). Ministérios da Saúde e da Assistência Social firmam compromisso para trabalho conjunto no controle da tuberculose [dezembro de 2014]. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/0B0CE2wqdEaR-RFhFMkpSVUZXMW8/view?pli=1>> acessado em 25.01.2015.

SILVA, P. B. **Síntese, caracterização e investigação das atividades biológicas de complexos de cobre(II) contendo moléculas bioativas e ligantes nitrogenados**. (2012) Tese de Doutorado no Programa de Pós Graduação. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, (São Paulo – Brasil).

SILVA, M. et al. Potential tuberculostatic agents: micelle-forming copolymer poly(ethylene glycol)-poly-(aspartic acid) prodrug with isoniazid. **Arch. Pharm.**, v. 334, n. 6, p. 189-193, 2001.

SURMAN, L. L.; BARBOSA, L. M. Q.;SIQUEIRA, S. D. V. S.; SILVA, K. G. H.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, S. T. Potencialidades de Veículos Microemulsionados para Fotoprotetores Físicos **Lat. Am. J. Pharm.** V. 28,n. 1, p. 133-140, 2009.

VENUGOPAL, J. et al. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **World Tuberculosis Day - 24 March 2015**. Disponível em <<http://www.who.int/campaigns/tb-day/2015/event/en/>>, acessado 01.08.2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2014**. Geneva, 2014. p. 171.

ZHANG, L. Y. et al. Cisplatin inhibits protein splicing, suggesting inteins as therapeutic targets in mycobacteria. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 2, p. 1277-1282, 2011.

CAPÍTULO II

Article

Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the *in Vitro* Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds

Eduardo Sinesio de Freitas ¹, Patricia Bento da Silva ², Marlus Chorilli ²,
Alzir Azevedo Batista ³, Érica de Oliveira Lopes ¹, Monize Martins da Silva ³,
Clarice Queico Fujimura Leite ¹ and Fernando Rogério Pavan ^{1,*}

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 14801-902, Brazil

² Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 14801-902, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 13565-905, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fernandopavan@fcfar.unesp.br
Tel./Fax: +55-163-301-4667.

Received: 1 March 2014; in revised form: 26 April 2014 / Accepted: 4 May 2014 /

Published: May 2014

Abstract: Tuberculosis is an ancient disease that is still present as a global public health problem. Our group has been investigating new molecules with anti-TB activity. In this context, inorganic chemistry has been a quite promising source of such molecules, with excellent results seen with ruthenium compounds. Nanostructured lipid systems may potentiate the action of drugs by reducing the required dosage and side effects and improving the antimicrobial effects. The aim of this study was to develop a nanostructured lipid system and then characterize and apply these encapsulated compounds (**SCARs 1, 2 and 4**) with the goal of improving their activity by decreasing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₀) and reducing the cytotoxicity (IC₅₀). The nanostructured system was composed of 10% phase oil (cholesterol), 10% surfactant (soy oleate, soy phosphatidylcholine and Eumulgin[®]) and 80% aqueous phase (phosphate buffer pH = 7.4). Good activity against *Mycobacterium tuberculosis* was

maintained after the incorporation of the compounds into the nanostructured lipid system, while the cytotoxicity decreased dramatically, in some cases up to 20 times less toxic than the unencapsulated drug.

Keyword: ruthenium complexes; tuberculosis; nanostructured lipid systems

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an ancient infectious disease whose main causative agent is the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Despite the technological resources to control the disease, eradication is still a distant goal. The bacterium uses mechanisms that allow it to remain latent for years to evade the host's immune system. Closely linked to poverty and unequal income distribution, the disease is a serious global public health problem [1].

TB is an ancient disease that is present in society today as never before in history. People who are infected with pulmonary TB can spread the disease by coughing, sneezing or even talking. A patient with pulmonary tuberculosis that is not treated correctly will infect other people, and on average, this individual can transmit the disease to approximately ten to fifteen people per year. The most common symptoms of pulmonary TB are cough, shortness of breath, chest pain, fever, night sweats, loss of appetite, muscle weakness and fatigue [2].

Another factor that contributes to the problem is the fact that approximately one third of the World population is already infected with the bacillus in its latent form. Of these, approximately 10% will develop clinical manifestations, characterized as TB disease, especially individuals co-infected with HIV. Thus, HIV associated with TB has been characterized as a major cause of death among co-infected patients [3].

Modern drug design strategies are based on the knowledge of the pathophysiology of diseases and biochemical pathways for the selection of molecular targets. Modern biotechnological tools have provided valuable information for the discovery and development of new drugs. Medicinal chemistry has a central role in various processes aimed at the identification of bioactive substances and the development of leading-compounds with optimized pharmacodynamic and pharmacokinetic properties [4].

Our group has conducted biological tests to identify bioactive substances from natural products and synthetic organic and inorganic compounds [5,6]. In this approach, our results have shown inorganic chemistry to be a very promising approach. Heteroleptic ruthenium (II) compounds containing phosphines, diimines, picolates as binders were extremely promising leads, with Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) better and/or comparable to those of the current first line drugs [7]. They showed anti-TB activity against both dormant and multidrug-resistant (MDR) bacteria and did not interact with other medicinal treatments already used [8,9].

In recent years, the search for new drug delivery systems has been very relevant in establishing more effective therapeutic alternatives that deliver drugs more safely and with minimized side effects. One of these studies has been directed at microemulsions (MEs), which can be defined as transparent emulsions in which an oil is dispersed in (orderwise) an aqueous medium containing a surfactant, with or without a suitable co-surfactant system generating thermodynamically stable droplets and having an internal phase on the order of nanometers (nm). The active substances can be transmitted when they are solubilized in the MEs in the oily or aqueous phase [10]. The MEs are regarded as reservoir systems because the drug is separated from the dissolution medium through a

membrane or interface that must be implemented to allow release into the environment. These systems provide a dimensionally restricted environment with particular properties, such as the ability to bind or associate with molecules of different groups of drugs with the aim of solubilizing, to modulate the amount of drug released, to increase the drug stability in relation to environmental conditions or to improve the profile bioavailability by increasing the concentration of drug at the site of action and preserving the active principle [11].

The formation of microstructures in aqueous surfactant solutions is a common phenomenon of self-organizing molecules as way to achieve stable thermodynamics. This phenomenon is the basis for the technological application of surfactants as organized systems in the biological sciences. Surfactant molecules commonly self-aggregate in the presence of water to form a rich variety of structures whose parameters are varied surfactant concentration, presence of salt and temperature. In dilute solutions, isotropic solutions of micelle aggregates can be formed, while in surfactant-solvent systems at higher concentrations, liquid crystalline isotropic and anisotropic stages can exist. These aggregates become more structured even when an oil or other components such as another surfactant or medium chain alcohol, is added the surfactant-water system. Thus, emulsions, microemulsions and lyotropic mesophases of different geometries can be generated [10].

Importantly, microemulsion systems improve the solubility and stability of drugs, in addition to providing long-acting therapeutics, increasing their bioavailability and decreasing the required dose, targeting specific tissues or organs of the body and delivering active substances with differing degrees of hydrophilicity/lipophilicity in the same formulation [12].

The major focus of this research was the incorporation of ruthenium compounds into microemulsions, to develop an effective therapeutic alternative with lower doses and reduced side effects. Thus, the ruthenium(II) complexes were incorporated into a nanostructured system consisting of soy phosphatidylcholine (SPC) and Eumulgin® (Castor oil polyoxyl-40-Hydrogenated), which are commonly used as surfactants [13,14], sodium oleate (OS) as a co-surfactant [15], cholesterol (CHO) as the oil phase and phosphate buffer pH 7.4. Then, they were evaluated *in vitro* for their antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC-27194 (MIC₉₀) and tested on VERO cells (a normal eukaryotic cell) to determine their cytotoxicity (IC₅₀).

2. Results and Discussion

2.1. Nanostructured Lipid System

Light scattering is a routine technique that is used for determining the diameter of the internal phase of microemulsions. Light scattering assays have been developed for liquid microemulsions that have been diluted with deionized water to detect experimental errors [16].

Table 1 shows the mean values and standard deviation of the particle size and polydispersity index for the nanostructured lipid system (ME) and the extracts incorporated in the microemulsion. As per Table 1, the diameter of the ME particles was 129.1 ± 0.9 nm. The incorporation of the complexes caused a small variation in the particle diameter size, without exception, ranging from

167.9 ± 2 to 213.0 ± 3 nm. All values are smaller than 1.0 µm (1000 nm), which is the optimal size for MEs according to Cunha Júnior *et al.* [14]. When comparing the ME and the formulations containing the complexes, there was a small increase in the size of the particle diameter, a strong indication that the complexes were incorporated into the nanostructured lipid system. The polydispersity index was calculated by dividing the mean size of the droplets by the mean number of measured droplets. For both the MEs and the complexes-loaded MEs, the light scattering analysis showed PDI values of 0.144–0.258 indicating a good size distribution of the droplets in the ME system. This parameter directly reflects the size homogeneity of the droplets in the total microemulsion.

Table 1. Determination of the droplet size and polydispersity of the ME using light scattering.

Formulation	Mean Diameter ± S.D. (nm) *	Mean PDI ± S.D.*
ME	129.1 ± 0.9	0.152 ± 0.01
SCAR1	188.0 ± 1	0.211 ± 0.02
SCAR2	167.9 ± 2	0.211 ± 0.00
SCAR4	213.0 ± 3	0.258 ± 0.01

* Standard deviation (S.D.), polydispersity index (PDI).

2.2. Biological Results of Encapsulated and Unencapsulated Ruthenium(II) Complexes

Table 2 shows the MIC₉₀, IC₅₀ and SI of the compounds. The compounds were tested under two conditions, diluted in DMSO and incorporated into the nanostructured lipid system. According to Pavan *et al.*, 2013 [7,8] and described in the Introduction, the compounds were very active against *M. tuberculosis* pan-susceptible and MDR, as well as latent stage. However, the only study available about the cytotoxicity was published in 2011 and used J774 macrophage cells. In that study, the compounds showed relative cytotoxicity values ranging between 11.90–32.60 µM. In a 2013 study [7] of **SCARs 2** and **4**, there were five and one mouse deaths, respectively, in the lethal dose (LD₅₀) experiment at an oral dose of 2.000 mg/kg/body weight. Based on this study, we decided to study three different complexes containing two ligands (pic and dppb) and changing the nitrogen ligand 2,2'-bipyridine (bipy) found in **SCAR1** with 4,4-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me-bipy) in **SCAR2** and with 1,10-phenanthroline (phen) in the **SCAR4**. As shown in Table 2, the compounds solubilized in DMSO are still active against *M. tuberculosis* and relatively toxic as shown in previous work. We also noted that the substitution of the nitrogeneous ligand of **SCAR1** in **SCAR2** and **SCAR4** caused an increase in toxicity. When replacing the bipy ligand with Me-bipy, *i.e.*, substituting two of the hydrogen atoms with two methyl radicals on the pyridine rings, there was a small 2-fold increase, from 47.60 to 22.70 µM, in toxicity; adding an aromatic ring to the nitrogeneous ligand by replacing the bipy with phen in **SCAR4**, also caused a small 1.3-times increase, from 47.60 to 37.60 µM, in the toxicity against VERO epithelial cells. These results indicate that the exchange of only a ligand in the

coordination sphere of the Ru(II) compounds most likely alters the mechanism of action, and consequently the toxicity of the resulting complexes.

However, when all compounds were encapsulated, the cytotoxicity decreased drastically and the activity against *M. tuberculosis* was maintained at similar levels as that of the unincorporated compounds. Case by case, **SCAR1** decreased 8-fold, **SCAR2** 22-fold and **SCAR4** 2-fold. These results show that this nanostructured lipid system is able to reduce the cytotoxicity of the complexes; this might be explained by the presence of cholesterol, which could promote interaction with the cellular membrane that consists of a phospholipid bilayer, in the composition of the microemulsion system.

Table 2. Results of minimum inhibitory concentration (MIC₉₀), cytotoxicity (IC₅₀) and selectivity index (SI) of ruthenium(II) complexes alone (unincorporated) diluted in DMSO and incorporated into a nanostructured lipid system (ME).

Identification	Compounds	MIC ₉₀		IC ₅₀		SI
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	
SCAR 1 (DMSO)	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	1.6	1.7	45.6	47.6	28.0
SCAR2 (DMSO)	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	1.9	1.9	22.3	22.7	12.0
SCAR4 (DMSO)	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	1.7	2.0	32.0	37.6	18.8
SCAR1 (ME)	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	6.1	6.4	367.6	383.7	60.0
SCAR2 (ME)	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	2.9	3.0	500	510.2	170.1
SCAR4 (ME)	[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	2.9	3.4	70.5	82.8	24.4

Considering these two experiments, which involved the substitution of a nitrogeneous ligand in the coordination sphere and the incorporation of coordination compounds into the nanostructured lipid system, we can conclude that the ME is a better transport vehicle than DMSO for these ruthenium complexes.

The selectivity index (SI) of each compound was determined as the ratio of IC₅₀ to MIC (Table 2). According to Orme *et al.* [17], candidates for new drugs must have a selectivity index equal to or higher than 10, a MIC lower than 6.25 µg/mL (or the molar equivalent) and a low cytotoxicity. The SI is used to estimate the therapeutic window of a drug and to identify drug candidates for further studies. When we compare the unencapsulated and encapsulated SIs of each compound, we can see a considerable increase. Evaluating each case individually, the selectivity index of SCAR1 increased

2-fold, SCAR2 14-fold, and SCAR4 0.3-fold relative to the unincorporated compounds.

There are studies involving nanoencapsulated drugs as a first line treatment of TB, with the objective of improving the bioavailability of the anti-TB drugs, thereby enhancing the activity of drugs against intracellular *M. tuberculosis* in macrophages and maintaining a therapeutic drug concentration, and consequently improving the compliance of TB patients by developing a new drug delivery system that can be successfully used in interventional technology [18]. However, the association of nanotechnology and inorganic compounds for anti-TB treatment in the literature is very poor, and this is the first time that the ruthenium compounds incorporated into microemulsion

are presented as anti-TB drugs. The main goal of this study was to decrease the cytotoxicity and thus reduce the side effects of the medications.

3. Experimental

3.1. Inorganic Compounds

The synthesis of the complexes [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (**SCAR1**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (**SCAR2**), [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (**SCAR4**) was performed according to the methodology described by Pavan *et al.*, [8,9].

3.2. Nanostructured Lipid System Preparation

MEs were prepared according Formariz *et al.*, [19,20] with modifications and with the following composition: CHO (10%) as the oil phase, PBS (pH 7.4) as the aqueous phase (80%) and a surfactant mixture SPC/SO/EU – 3:6:8 (10%). The composition was used to obtain the optimal hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value for the stabilization of the clear ME system. The HLB value describes the simultaneous attraction of the surfactant mixture for the oil and aqueous phases; when the HLB is close to the required HLB of the oil phase of the ME, the system provides the minimum energy conditions for ME formation. The composition of the surfactant system SPC/SO/EU was established to obtain an HLB value of 14.97.

The mixture was sonicated using a rod sonicator (Q700 of QSonica[®], Newtown, CT, USA) at 700 watts in discontinuous mode for 10 min with a 30-second interval in an ice bath every two minutes during the sonication process. After sonication, the MEs were centrifuged at $11,180 \times g$ for 15 min to eliminate the waste released by the titanium rod sonicator. MEs were prepared 24 h before the experiments and maintained at 25 ± 0.1 °C to complete the equilibration of the system.

3.3. Nanostructured Lipid System Characterization: Mean diameter and Polydispersity Index (PDI)

ME droplet diameters were determined with and without inorganic compounds. All samples were diluted (100 µL sample in 900 µL deionized water). The microemulsion droplet size distribution was determined using dynamic light scattering in a Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, San Diego, CA, USA). The samples were oriented in the analysis chamber so that the laser beam could cross through the dispersion. The temperature of the system was maintained at 20 °C, and the laser wavelength was 532 nm. Ten determinations of the diameter and polydispersity index (PDI) of the drops in each sample were made (n = 3).

3.4. Preparation of the Coordination Compound-Loaded Nanostructured Lipid System

After obtaining the ME, the coordination compounds were loaded into the nanostructured lipid system. Then, compound (0.0100 g) was added to ME (2 mL) and the mixture was homogenized and sonicated for 5 min at room temperature in discontinuous mode to facilitate the incorporation of

the nanostructured material into the lipid system at a concentration of 5,000 µg/mL. The inorganic compound-loaded nanostructured lipid systems were characterized by measuring the mean diameter and polydispersity in a Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, San Diego, CA, USA) and using the Zetasizer Software.

3.5. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC₉₀)

The anti-*M. tuberculosis* activity of the compounds was determined using the Resazurin Microtiter Assay (REMA) method according to Palomino *et al.*, [21]. Stock solutions of the tested compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and nanostructured into the lipid systems, then diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment - BBL/Becton-Dickinson, Detroit, MI, USA) to obtain a final drug concentration range of 0.09–25 µg/mL. A suspension of the *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 was cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC and 0.05% Tween 80. The culture was frozen at –80 °C in aliquots. After two days, the CFU/mL of the aliquot was determined. The concentration was adjusted to 5×10^5 CFU/mL, and 100 µL of the inoculum was added to each well of a 96-well microplate together with 100 µL of the compounds. The samples were set up in triplicate. The plate was incubated for 7 days at 37 °C. After 24 h, 30 µL 0.01% resazurin (solubilized in water) was added. The fluorescence of the wells was read after 24 h using a TECAN Spectrafluor® (Männedorf, Switzerland). The MIC₉₀ was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of *M. tuberculosis*.

3.6. In Vitro Cytotoxic Activity

The cytotoxicity of the complexes diluted in DMSO and in nanostructured in lipid systems was measured on normal epithelial cells (VERO ATCC CCL -81) as described by Pavan *et al.*, [22]. The cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ on plates with a surface area of 12.50 cm² in 10 mL DMEM (Vitrocell®, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, gentamicin sulfate (50 mg/L) and amphotericin B (2 mg/L).

This technique consists of collecting the cells using a solution of trypsin/EDTA (Vitrocell®), centrifuging (2000 rpm for 5 min), counting the number of cells in a Newbauer chamber and then adjusting the concentration to 3.4×10^5 cells/mL in DMEM [23]. Next, 200 µL suspension was deposited into each well of a 96-well microplate obtaining a cell concentration of 6.8×10^4 cells/well and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for 24 h to allow the cells to attach to the plate. Dilutions of the test compounds were prepared to obtain concentrations from 500 to 1.95 µg/mL. The dilutions were added to the cells after the removal of the medium and any cells that did not adhere, and incubated again for 24 h. The cytotoxicity of the compounds was determined by adding 30 µL developer of resazurin and read after a 6-hour incubation. The reading was performed in a microplate Spectrafluor Plus (TECAN®) reader using excitation and emission filters at wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. The cytotoxicity (IC₅₀) was defined as the highest concentration of compound allowing the viability of at least 50% of the cells.

4. Conclusions

The ruthenium compounds **SCARs 1–4** have met some of the criteria that a new drug against tuberculosis must fulfill; however, they have considerable cellular toxicity. In this work involving nanoencapsulation, there was a decrease in their cytotoxicity while maintaining their activity against *M. tuberculosis*. These results make this new family of drugs against tuberculosis even more promising.

Acknowledgments

We thank FAPESP ref. Process: 2013/09265-7 and 2013/14957-5, CNPQ-Glaxo ref. Process: 406827/2012-5 and PROPE ref Process: 0102/004/43 for financial Support.

Author Contributions

Patricia Bento da Silva: Co-orientation of the main author (Eduardo S. Freitas). Creator of the project and assistance in drafting the paper. Marlus Chorilli: Development of nanostructures and assistance in drafting the paper.

Alzir Azevedo Batista: Synthesis of the complexes and assistance in drafting the paper.

Érica de Oliveira Lopes: Cytotoxicities assays and assistance in drafting the paper.

Monize Martins da Silva: Synthesis of the complexes and assistance in drafting the paper.

Clarice Queico Fujimura Leite: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and assistance in drafting the paper.

Fernando Rogério Pavan: Orientation of the main author (Eduardo S. Freitas). Creator of the project and assistance in drafting the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anil, K.; Arnould, L.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **2011**, *469*, 483–490.
2. World Health Organization (WHO). *Basic facts on tuberculosis (TB) in the WHO European Region*, 2012. Available online: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/data-and-statistics> (accessed on 5 January 2014).
3. Guido, R.; Andricopulo, A.; Oliva, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: Applications in infectious diseases. *Adv. Stud.* **2010**, *24*, 70.
4. Rosalba, L.D.; Meckesl, M.; Fernandez, S.S.; Salinas, G.M.; Vilarreal, J.V.; Torres, J.; Herrera, J.L.; Arellanes, A.J. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem. Inst. Oswaldo-Cruz.* **2010**, *105*, 45–51.
5. Pereira, G.A.; Massabni, A.C.; Castellano, E.E.; Costa, L.C.S.; Leite, C.Q.F.; Pavan, F.R.; Cuin, A. A broad study of two new promising antimycobacterial drugs: Ag(I) and Au(I) complexes with 2-(2-thienyl)benzothiazole. *Polyhedron.* **2012**, *38*, 291–296.
6. Mondelli, M.; Pavan, F.R.; Souza, P.C.; Leite, C.Q.F.; Nascimento, J.E.O.; Facchin, G.; Torre, M.H. Study of a series of cobalt(II) sulfonamide complexes: Synthesis, spectroscopic characterization, and microbiological evaluation against *M. tuberculosis*. Crystal structure of [Co(sulfamethoxazole)₂(H₂O)₂]H₂O. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1036*, 180–187.
7. Pavan, F.R.; Poelhsith, G.V.; da Cunha, L.V.P.; Barbosa, M.I.F.; Leite, S.R.A.; Batista, A.A.; Cho, S.H.; Franzblau, S.G.; de Camargo, M.S.; Resende, F.A.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One* **2013**, *8*, 1–10.
8. Pavan, F.R.; Poelhsitz, G.V.; Barbosa, M.I.F.; Leite, S.R.A.; Batista, C.; Ellena, J.; Sato, L.S.; Franzblau, S.G.; Moreno, V.; Gambino, D.; *et al.* Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate

- complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5099–5107.
9. Pavan, F.R.; Poelhsitz, G.V.; Nascimento, F.B.; Leite, S.R.A.; Batista, A.A.; Deflon, V.M.; Sato, D.N.; Franzblau, S.G.; Leite, C.Q.F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 598–601.
 10. Formariz, T.P.; Urban, M.T.C.; Silva Junior, A.A.; Gremião, M.P.D.; Oliveira, A.G. Microemulsion and liquid crystals as drug delivery systems. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2005**, *41*, 301–313.
 11. Bonifacio, B.V.; Silva, P.B.; Ramos, M.A.R.; Negri, K.M.S.; Bauab, T.M.; Chorilli, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int. J. Nanomedicine*. **2014**, *9*, 1–15.
 12. Sintov, A.C.; Shapiro, L. New microemulsions vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. *J. Control Rel.* **2004**, *95*, 173–183.
 13. Vandamme, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: Recent developments and future challenges. *Prog. Retin. Eye Res.* **2002**, *21*, 15–34.
 14. Cunha Junior, A.; Fialho, S.L.; Carneiro, L.B.; Oréfice, F. Microemulsions as drug delivery systems for topical ocular administration. *Arq. Bras. Oftal.* **2003**, *63*, 285–391.
 15. Lachman, L.; Liberman, H.; Kanig, L.J. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, 3rd ed.; Lea & Febiger: Philadelphia, PA, USA, 2001; p. 1143.
 16. Orthaber, D.; Glatter, O. Synthetic phospholipid analogs: A structural investigation with scattering methods. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *107*, 179–189.
 17. Orme, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1943–1946.
 18. Metha, S.K.; Kaur, G.; Verma, A. Fabrication of plant protein microspheres for encapsulation, stabilization and *in vitro* release of multiple anti-tuberculosis drugs. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *275*, 219–230.
 19. Formariz, T.P.; Chiavacci, L.A.; Sarmiento, V.H.V.; Franzini, C.M.; Silva-Jr. A.A.; Scarpa, M.V.; Santilli, C.V.; Egito, E.S.T.; Oliveira, A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. *Colloid. Surface. B* **2008**, *63*, 287–295.
 20. Formariz, T.P.; Chiavacci, L.A.; Scarpa, M.V.; Silva-Júnior, A.A.; Egito, E.S.T.; Terrugi, C.H.B.; Franzini, C.M.; Sarmiento, V.H.V.; Oliveira, A.G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloid. Surface. B* **2010**, *77*, 47–53.
 21. Palomino, J.-C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720–2722.
 22. Pavan, F.R.; Maia, P.I.; Leite, S.R.A.; Deflon, V.M.; Batista, A.A.; Sato, D.N.; Franzblau, S.G.; Leite, C.Q.F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur. J.*

Med. *Chem.* **2010**, *45*,
1898–1905.

23. Valdivieso-Garcia, A.; Clarke, R.C.; Rahn, K.; Durette, A.; MacLeod, D.L.; Gyles, C.L. Neutral red assay for measurement of quantitative vero cell cytotoxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1981–1983.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).