

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Câmpus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

MARIANA RILLO SATO

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA INCORPORAÇÃO DE
COMPLEXOS DE COBRE(II) APLICÁVEIS NO ESTUDO FRENTE AO
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Co-orientadora: Dra. Patrícia Bento da Silva

Araraquara - SP

2016

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Câmpus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

MARIANA RILLO SATO

CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA INCORPORAÇÃO DE
COMPLEXOS DE COBRE(II) APLICÁVEIS NO ESTUDO FRENTE AO *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Araraquara - SP

2016

Ficha Catalográfica

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

S253c Sato, Mariana Rillo
Carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação de complexos de cobre(II) aplicáveis no estudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis* / Mariana Rillo Sato – Araraquara, 2016
81 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: Marlus Chorilli
Coorientador: Patrícia Bento da Silva

1. Tuberculose. 2. Complexos de cobre(II). 3. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 4. Citotoxicidade. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Silva, Patrícia Bento da, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai Roberto Sato Amaro e a minha mãe Maria Helena Vieira Rillo Sato por todo o suporte, apoio e confiança depositados em mim. Obrigada por estarem sempre ao meu lado me incentivando e me fazendo prosperar. Agradeço todo o amor e carinho incondicional e também os ensinamentos concebidos os quais carregarei a vida toda. Vocês são “espelhos” em que eu desejo sempre refletir. Amo vocês mais que tudo!

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus e a Santa Luzia santa de minha devoção, pela vida que me destes, pela oportunidade em poder realizar mais um sonho, por não me deixar desistir ou desanimar nos momentos mais difíceis da caminhada.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, Roberto e Maria Helena, ao meu irmão Matheus, e aos meus avôs maternos, Maria e Aléssio, e paternos, Nobuco e Geraldo (in memorian), por todo o amor concebido em toda minha vida, além de todo o incentivo e força, saibam que vocês são exemplos de vida para mim, agradeço a Deus todos os dias por esta família tão linda e abençoada.

Ao meu marido João Augusto, pela paciência, compreensão, além de todo conhecimento e ensinamento prestados, mais que marido, você é um grande amigo que Deus colocou na minha vida, obrigada por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço carinhosamente ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela paciência e por todos os momentos de compreensão, mas, principalmente pelos sábios conhecimentos e ensinamentos prestados ao longo deste trabalho.

Com carinho também a minha co-orientadora Patrícia Bento da Silva pelos conhecimentos e ensinamentos prestados, mas, principalmente pelas palavras de carinho e superação; juntas, tivemos a oportunidade de nos conhecermos e aprendermos, tenho certeza que uma bela amizade foi construída.

Prof. Marlus e Patrícia saibam que tenho uma enorme admiração por vocês!

Aos colegas e amigos da Farmacotécnica, Aline, Andréia, Bruno, Charlene, Cristiane, Fabíola, Fernanda, Giovana, Gisela, Liliane, Jovan, Maíra, Márcia, Natália, Valéria, por toda ajuda e ensinamentos, e também por todos os momentos vividos juntos, tenho certeza que ao longo deste trabalho construímos verdadeiras amizades, adoro todos vocês!

Em especial as amigas Alice, Camila, Fernanda, Jéssica, Karen, Marcela, e Roberta por toda paciência, apoio, e ensinamentos, vocês foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho, por vocês tenho um enorme carinho e gratidão, adoro todos vocês!

Aos queridos amigos do CMAF Bruna, Bruna, Bruno, Eloísa, João, Marina e Neima, por todo apoio e ensinamento, mas, principalmente pelos momentos vividos juntos, saibam que vocês são mais que amigos, são como “irmãos” para mim.

Especialmente a Profª. Dra. Leila Chiavacchi por todo apoio e ensinamento, mas, principalmente pelo carinho e amizade, também ao Sérgio, Vitor, e aos seus familiares, que ao longo desses anos se tornaram minha segunda família.

A todos os colegas e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), que participaram e interagiram em nosso dia-a-dia.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), em especial as técnicas de laboratório Natália, Mariluce e Fátima pela amizade e ajuda dada na realização dos experimentos.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial a Profa. Dra. Sandra Pulcinelli pela colaboração para a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial. A técnica do laboratório Danúbia pelo auxílio nas análises térmicas realizadas neste trabalho. Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro pela disponibilidade e auxílio na interpretação dos dados.

Ao Instituto de Física da USP de São Carlos, especialmente ao Prof. Dr. Marcelo A. P. da Silva pela colaboração na análise de Microscopia de Força Atômica.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP/Araraquara pela colaboração do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e da Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, bem como de Paula C. de Souza e de Débora Leite, pela realização dos ensaios biológicos in vitro.

A Profa. Dra. Palmira Daflon do nosso grupo de pesquisa que cedeu alguns materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo CMAF do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara pela contribuição de algumas matérias-primas e equipamentos utilizados.

À Seção de Pós-graduação, em especial à Cláudia, Daniela e Flávia pela atenção e apoio.

A CAPES, pela ajuda financeira na forma de bolsa de mestrado.

Muito obrigada a todos que não estão citados aqui e também aqueles de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, e assim, para meu crescimento pessoal e/ou profissional. Meus sinceros agradecimentos, vocês são muito especiais em minha vida!!!

Epígrafe

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho,
sem metas, os sonhos não têm alicerces,
sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades,
corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.*

Augusto Cury

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Tuberculose	14
1.2 Complexos metálicos.....	16
1.3 Sistemas nanoestruturados: Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs).....	18
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos gerais	24
2.1.1 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Materiais	25
3.1.1 Reagentes e matérias-primas	25
3.1.2 Equipamentos	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Síntese dos complexos de cobre(II).....	26
3.2.2 Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) por Ultra turrax ..	26
3.2.3 Desenvolvimento de CLNs por sonicador.....	27
3.2.4 Incorporação de complexos de cobre(II) nos CLNs.....	30
3.2.5 Caracterização físico-química dos CLNs	31
3.2.5.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Dnm) e do índice de polidispersidade (IPD).....	31
3.2.5.2 Análise do potencial zeta (PZ).....	31
3.2.5.3 Microscopia de força atômica (MFA)	32
3.2.5.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	32
3.2.6 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	33
3.2.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos utilizando <i>Resazurin Microtiter Assay</i> (REMA) frente ao MTB H ₃₇ Rv	33
3.2.6.2 Determinação da citotoxicidade (IC ₅₀) dos compostos frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e o índice de seletividade (IS).....	34
3.2.6.3 Avaliação da toxicidade aguda dos compostos frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae)	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 Desenvolvimento de CLNs por Ultra turrax	36

4.2 Desenvolvimento de CLNs por sonicator.....	37
4.3 Caracterização físico-química dos CLNs	40
4.3.1 Determinação do Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (Dnm) e do índice de polidispersidade (IPD).....	40
4.3.2 Análise de potencial zeta(PZ).....	49
4.3.3 Microscopia de força atômica (MFA)	53
4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	56
4.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	65
4.4.1 Determinação da CIM dos compostos utilizando a técnica <i>Resazurin Microtiter Assay</i> (REMA) frente ao MTB H ₃₇ Rv, da citotoxicidade (IC ₅₀) frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e o índice de seletividade (IS)	65
4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda dos compostos frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae)	67
5 CONCLUSÕES	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Geometrias de coordenação mais comumente encontradas nos metais.	17
Figura 2. Estruturas químicas dos diferentes complexos de cobre(II): $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
Figura 3. Estruturas químicas dos lipídios empregados para o desenvolvimento dos CLNs.	22
Figura 4. Estruturas químicas dos tensoativos utilizados para o desenvolvimento dos CLNs.	23
Figura 5. Desenvolvimento dos CLNs obtidos pela técnica de fusão-emulsificação, testando-se diferentes metodologias, Ultra turrax e Sonicador.	30
Figura 6. Fluxograma das formulações desenvolvidas por Ultra turrax e por sonicador.	39
Figura 7. Média e desvio padrão de Dnm das formulações contendo OR 40 OE e OR, nos tempos 1, 15 e 30 dias de armazenamento.	43
Figura 8. Média e desvio padrão de IPD das formulações contendo OR 40 OE e OR, no período de 1, 15 e 30 dias de armazenamento.	43
Figura 9. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do Dnm (à esquerda) e do IPD (à direita) das formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, ao longo de 60 dias.	46
Figura 10. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do Dnm (à esquerda) e do IPD (à direita) das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3, ao longo de 60 dias.	47
Figura 11. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do PZ das formulações: F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3 (a esquerda), e de F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3 (a direita), ao longo de 60 dias.	51
Figura 12. Imagens das fotomicrografias bidimensionais das formulações: (A) F32, (B) F32.OE.C1, (C) F32.OE.C2 e (D) F32.OE.C3.	53
Figura 13. Imagens de fotomicrografias tridimensionais das formulações contendo OR 40 OE: (A) F32, (B) F32.OE.C1, (C) F32.OE.C2 e (D) F32.OE.C3.	55
Figura 14. Imagens das fotomicrografias bidimensionais das formulações: (A) F38, (B) F38.OR.C1, (C) F38.OR.C2 e (D) F38.OR.C3.	56
Figura 15. Imagens das curvas de DSC dos complexos C1, C2 e C3, isolados.	57
Figura 16. Imagens das curvas de DSC dos componentes utilizados para o desenvolvimento dos CLNs: EP, TGACC, OR, OR 40 OE, P-407 e BC.	58
Figura 17. Curva de DSC das formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2 e F32.OE.C3, denominadas de A, B, C, e D, respectivamente.	60
Figura 18. Curvas de DSC das formulações, F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, denominadas de E, F, G e H, respectivamente.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13.....	26
Tabela 2. Composição da formulação F14.	27
Tabela 3. Composição da formulação F15.	28
Tabela 4. Composição das formulações F16, F17, F18, F19, F20, F21, F22, F23, F24, F25, F26 e F27.....	28
Tabela 5. Composição das formulações F28, F29, F30, F31, F32, F33, F34, F35, F36, F37, F38, e F39.....	29
Tabela 6. Composição das formulações contendo os diferentes complexos de cobre(II) incorporados nos CLNs (F32.OE.C1; F32.OE.C2; F32.OE.C3; F38.OR.C1; F38.OR.C2; e F38.OR.C3).	31
Tabela 7. Média e desvio padrão do Dnm (nm) e do IPD das formulações desenvolvidas contendo OR 40 OE (F14, F15,F16, F17, F18, F19, F20 e F21) e OR (F22, F23, F24, F25, F26 e F27).....	42
Tabela 8. Valores de temperaturas de fusão dos componentes: EP, TGACC, OR, OR 40 OE, P-407 e BC, analisados individualmente.....	59
Tabela 9. Valores de temperaturas de fusão das formulações, F32; F32.OE.C1; F32.OE.C2; e F32.OE.C3, analisadas individualmente.....	60
Tabela 10. Valores de entalpia esperado e de entalpia obtido das formulações, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, identificadas como A, B, C, e D, respectivamente....	60
Tabela 11. Valores de temperaturas de fusão das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, analisadas separadamente.....	63
Tabela 12. Valores de entalpia esperado e de entalpia obtido das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, denominadas de E, F, G e H, respectivamente.	63
Tabela 13. Resultados da CIM contra o MTB H37Rv, da citotoxicidade (IC ₅₀) sobre as linhagens celulares J774.A1 e MRC-5 e o valor do IS da razão entre esses dois resultados dos complexos C1, C2 e C3 em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38.....	65
Tabela 14. Concentração letal mediana (CL50) dos complexos de cobre(II) em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38frente à <i>Artemia salina</i> L. (Artemiidae).	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC = brometo de cetrimônio

C1 = complexo $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

C2 = complexo $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

C3 = complexo $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

CF = ciprofloxacina

CIM = concentração inibitória mínima

CLNs = carreadores lipídicos nanoestruturados

CL₅₀ = concentração letal mediana

Cu(II) = cobre(II)

D = coeficiente de difusão das partículas

DSC = calorimetria exploratória diferencial

EMB = etambutol

EP = estearato de polioxietileno 40

ESPAR = esparfloxacina

FDA = Food and Drug Administration

HIV/SIDA = síndrome da imunodeficiência humana adquirida

IC₅₀ = citotoxicidade

INH = isoniazida

IS = índice de seletividade

K = constante de Boltzmann

LVFX = levofloxacina

M. tuberculosis = *Mycobacterium tuberculosis*

MFA = microscopia de força atômica

NL = nanopartícula lipídica

NLS = nanopartícula lipídica sólida

OMS = Organização Mundial da Saúde

ON = óxido nítrico

OR = óleo de rícino

OR 40 OE = óleo de rícino hidrogenado etoxilado 40 OE

P-407 = poloxamer 407

PZA = pirazinamida

REMA = *Resazurin Microtiter Assay*

RIF = rifampicina

SM = estreptomicina

TB = tuberculose

TB-MDR = tuberculose multi-droga resistente

TB-XDR = tuberculose extensivamente droga resistente

TGACC= triglicérides do ácido cáprico/caprílico

TRZ = terizidona

RESUMO

A Tuberculose (TB) é mundialmente conhecida como a principal doença infecto-contagiosa de evolução crônica, em que o abandono do tratamento antes do período recomendado tende a ocasionar o desenvolvimento de casos mais graves da doença, gerando o aparecimento de cepas resistentes. O cobre interage com ligantes biologicamente ativos desenvolvendo complexos de cobre(II) com ações antimicrobiana. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) vêm se destacando na área farmacêutica, pois apresentam a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente fármacos lipofílicos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de CLNs acrescidos de complexos de cobre(II) aplicáveis no estudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Foram obtidos 3 complexos de cobre(II), intitulados C1, C2 e C3 que contem o ligante isoniazida e os co-ligantes aniônicos cloreto, tiocianato e cianato, respectivamente. Os CLNs foram obtidos pela técnica de fusão-emulsificação, testando-se diversas formulações por Ultra turrax a 5000 rpm por 10 minutos e por sonificador com amplitude 8% por 20 minutos até a obtenção de CLNs estáveis, que foram constituídos de 3,50% e 0,50 % de poloxamer 407 e brometo de cetrimônio, respectivamente, e de 2,07%, 2,50% e 0,88% de estearato de polioxietileno, triglicérides do ácido cáprico/caprílico e óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 40 (F32) ou óleo de rícino (F38), respectivamente. Os complexos de cobre(II) foram incorporados nos CLNs (F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3, e F38.OR.C1, F38.OR.C2, F38.OR.C3), e caracterizados por diâmetro hidrodinâmico médio (Dnm), índice de polidispersidade (IPD) e potencial zeta (PZ) por 1, 15, 30, 45 e 60 dias, revelando homogeneidade da dispersão e excelente estabilidade física; a microscopia de força atômica confirmou que os CLNs tratam-se de dispersões de partículas esféricas em escalas nanométricas; a calorimetria exploratória diferencial revelou que os componentes utilizados nas formulações interagiram para formação do sistema e que os complexos de cobre(II) foram incorporados nos CLNs. A atividade antimicrobiana dos complexos, frente ao *M. tuberculosis* H₃₇Rv determinada pelo ensaio de microdiluição com Resazurina evidenciaram potencialização da ação anti-TB pela incorporação dos complexos nos CLNs. Os ensaios de citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e de MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e a toxicidade aguda dos complexos frente à *Artemia salina* L., mostraram que as formulações apresentaram toxicidade em todas as concentrações testadas; apesar de relatos da literatura indicarem a segurança dos componentes das formulações, estudos devem ser realizados em modelos animais para avaliar a toxicidade aguda. Os resultados sugerem que os CLNs apresentam aplicação potencial no estudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

Palavras-chave: Tuberculose. Complexos de cobre(II). Carreadores lipídicos nanoestruturados. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is known worldwide as the leading infectious disease of chronic evolution in which the abandonment of treatment before the recommended period tends to cause the development of more severe disease, such as the appearance of resistant strains. Copper interacts with biologically active ligands developing copper(II) complex with activities antimicrobial. Nanostructured lipid carriers (NLCs) have gained prominence in the pharmaceutical field, since they have the ability to compartmentalize efficiently lipophilic drugs and modify their properties and behavior in the biological environment. The aims of this study was to evaluate the potential of copper(II) complexes-loaded NLCs applicable in the study against *Mycobacterium tuberculosis*. Copper(II) complexes containing isoniazid binder were obtained and they were entitled C1, C2, and C3 where they have co-binders anionic chloride, cyanate and thiocyanate, respectively. NLCs were obtained by fusion-emulsification technique, formulations were obtained by Ultra turrax at 5000 rpm for 10 minutes followed by sonicator at 8% amplitude for 20 minutes to obtain stable NLCs, those were incorporated of 3.50% and 0.50% to surfactant poloxamer 407 and cetrimonium bromide, respectively, and 2.07%, 2.50% and 0.88% of polyoxyethylene stearate lipids, triglycerides of capric acid/caprylic and ethoxylated hydrogenated castor oil 40 OE (F32) or castor oil (F38), respectively. Copper(II) complexes were incorporated into NLCs (F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3 and F38.OR.C1, F38.OR.C2, F38.OR.C3) and characterized by diameter (D_{mn}) , polydispersivity index (PDI) and zeta potential (ZP) for 1, 15, 30, 45 and 60 days, which revealed homogeneous dispersion and excellent physical stability over the same period; the atomic force microscopy confirmed that developed NLCs are spherical particles dispersions at nanometer scales; differential scanning calorimetry revealed that the constituents used in the formulations interacted in the systems and confirmed that copper(II) complexes were incorporated in the NLCs. The antimicrobial activity of the complexes against *M. tuberculosis* H₃₇Rv was determined by the resazurin microdilution assay demonstrated potential anti-TB when complexes were incorporated into NLCs. Cytotoxicity assay in murine macrophage-like cells J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) for 24 h and acute toxicity of the complex against *Artemia salina* L (Artemiidae) showed the formulations have toxicity in all tested concentrations; although published reports indicated the safety of the components used of the formulations, studies should be conducted in animal models to assess the acute toxicity. These results suggest that NLCs have potential application in the study against *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: Tuberculosis. Copper(II) complex. Nanostructured lipid carriers. Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é a principal doença infecto-contagiosa de caráter crônico do mundo (WHO, 2015), tendo como principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) também conhecido como bacilo de Koch em homenagem ao bacteriologista Robert Koch, que o identificou em 1882 (KOCH, 1890).

A TB é uma doença infecciosa e sua transmissão ocorre de pessoa a pessoa através do ar. O indivíduo com infecção ativa dissemina a doença através de gotículas (aerossóis) de fluídos contendo bacilos. As gotículas mais pesadas se sedimentam no meio ambiente, enquanto que as gotículas menores (mais leves) permanecem dispersas no ar até serem inaladas, infectando preferencialmente os bronquíolos e os alvéolos pulmonares uma vez que este patógeno tem preferência por órgãos altamente oxigenados ou até mesmo órgãos e tecidos menos oxigenados, em que é conhecida como TB extrapulmonar, que pode atingir diversos órgãos e tecidos como pele, rins, ossos, laringe, intestinos e cérebro (NOGUEIRA et al., 2012; BHAVE et al., 2007).

Dados epidemiológicos apontados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que atualmente a TB continua despertando intensa preocupação para a saúde pública, uma vez que os casos da doença estão relacionados à pobreza e a distribuição desigual de renda (KOUL et al., 2011). Estima-se que em todo o mundo um terço da população esteja infectada com o *M. tuberculosis* (WHO, 2014). No período de 2005 a 2014, o Brasil notificou aproximadamente 73 mil novos casos de TB por ano. No mundo em 2014, foram estimados cerca de 9,6 milhões de novos casos de TB, sendo que 5,4 milhões foram homens, 3,2 milhões mulheres e 1 milhão eram crianças. Houve também 1,5 milhões de mortes por TB, sendo 1,1 milhões de pessoas HIV-negativos e 0,4 milhão HIV-positivas. Destes, cerca de 890.000 eram homens, 480.000 eram mulheres e 140.000 crianças (WHO, 2015).

A incidência de TB é maior em pessoas imunocomprometidas, especialmente em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (HIV/SIDA). Essa associação (TB-HIV) resulta em maiores taxas de mortalidade quando comparado apenas às doenças sozinhas. Devido seu sistema imune debilitado, os indivíduos portadores de HIV apresentam uma maior probabilidade de uma reativação da infecção tuberculosa latente, e consequentemente, a evolução para infecção ativa (NOGUEIRA et al., 2012; PRADO et al., 2011).

Introdução

Apesar dos inúmeros recursos tecnológicos disponíveis na área farmacêutica, muito pouco desses recursos tem sido utilizado como ferramenta para o controle da disseminação da TB. Deste modo, a principal estratégia de tratamento é a quimioterapia convencional; como consequência, a erradicação desta doença é uma meta ainda distante de ser alcançada (KOUL et al., 2011).

Segundo a OMS o tratamento da TB no Brasil conta com um esquema terapêutico dividido em duas fases, fase intensiva e fase de manutenção. A fase intensiva constitui-se da combinação de quatro fármacos de primeira-linha, rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), e etambutol (EMB) administrados via oral por um período de dois meses de tratamento. Após este período, inicia-se a fase de manutenção, em que se utiliza apenas RIF e INH por mais quatro meses de tratamento (WHO, 2014).

Quando o tratamento de primeira escolha apresenta-se ineficaz devido à resistência aos fármacos RIF e/ou INH realiza-se o tratamento de segunda escolha (BRANCO et al., 2012).

Neste tratamento, emprega-se a utilização de PZA e EMB e dos fármacos de segunda-linha estreptomicina (SM), levofloxacina (LVFX) e terizidona (TRZ). Este tratamento também se divide em duas fases: intensiva e manutenção. A primeira constitui-se da combinação de PZA e EMB, SM, LVFX e TRZ por 6 meses, enquanto que a fase de manutenção segue com EMB, LVFX e TRZ por mais 12 meses (WHO, 2014).

Os efeitos secundários tais como neurotoxicidade e hepatotoxicidade causados aos pacientes pelos fármacos anti-TB, e o abandono do tratamento antes do período recomendado, podem ocasionar consequências graves para o controle da doença, sendo que a taxa de abandono do tratamento chega a 25% (PAZ et al., 2012; MACIEL et al., 2010).

Situações críticas como estas podem levar ao desenvolvimento de cepas multi-resistentes (TB-MDR) e extensivamente-resistentes (TB-XDR). TB multi-droga resistente (TB-MDR) ocorre quando o *M. tuberculosis* apresenta resistência aos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento inicial, INH e RIF de forma simultânea. Tal situação requer um tempo de tratamento ainda maior que o tratamento inicial (18 a 24 meses), e emprega a utilização de fármacos anti-TB de segunda linha que apresentam maior toxicidade que os fármacos de primeira linha (DROBNIEWSKI et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2012).

Em decorrência da dificuldade de tratamento, os pacientes podem desenvolver um quadro ainda mais crítico de TB, denominado de TB extensivamente resistente (TB-XDR). Neste caso, o bacilo apresenta resistência à INH e RIF, e a pelo menos uma fluoroquinolona (moxifloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina) como também a um

Introdução

dos fármacos injetáveis de segunda-linha (capreomicina, canamicina e amicacina). Nestes casos, o tratamento é específico para cada paciente (DROBNIEWSKI et al., 2013; BOEHME et al., 2010).

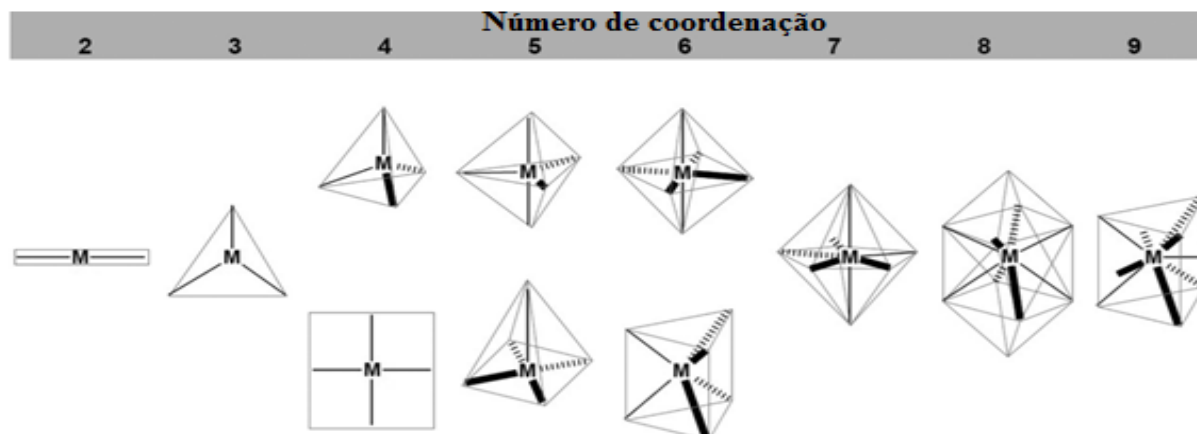
Frente a essas vertentes, a busca por novos modelos terapêuticos contra o *M. tuberculosis* para auxiliar no tratamento da TB se faz necessário. Neste contexto, os complexos metálicos vêm sendo estudados e vêm apresentando resultados promissores contra diversas cepas bacterianas, incluindo o *M. tuberculosis* (PAVAN et al., 2013).

1.2 Complexos metálicos

Complexos metálicos são constituídos por moléculas orgânicas ou íons ligados a um íon metálico central. Dado que os íons metálicos são deficientes em elétrons e que a maioria das moléculas biológicas, tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons, a atração destas cargas opostas tende a provocar uma interação entre os íons de um metal e as moléculas biológicas dentro dos sistemas biológicos (SILVA, 2012).

Em complexos metálicos, os ligantes (moléculas neutras ou aniônicas) e os metais atuam como Bases e Ácidos de Lewis, respectivamente. As Bases de Lewis contêm pelo menos um par de elétrons para doar a um orbital vazio do metal e os Ácidos de Lewis, atuam recebendo os pares de elétrons das Bases de Lewis (SANTOS, 2014).

O número de ligações entre o metal e o ligante ou o número de coordenação apresentado na estrutura dos metais, preferencialmente apresenta entre 2-6. Deste modo, os metais apresentam uma geometria de coordenação que pode ser: 2 (linear), 3 (trigonal planar), 4 (tetraédrica ou quadrado planar), 5 (bipirâmide trigonal ou pirâmide de base quadrada), e 6 (octaédrica ou trigonal prismática) (SATO et al., 2015). A Figura 1 ilustra as geometrias dos metais.

Figura 1. Geometrias de coordenação mais comumente encontradas nos metais.

Fonte: Sato et al., 2015.

Graças à química inorgânica medicinal, as pesquisas envolvendo complexos metálicos têm demonstrado um acentuado avanço nas últimas décadas, no sentido de desenvolver novos agentes terapêuticos com atividade antimicrobiana. Assim, a investigação de atividades terapêuticas dos complexos metálicos tem sido objeto de estudo cada vez mais frequente (COLETTE et al., 2015; FREITAS et al., 2014; KHOO et al., 2014; SOBOLA et al., 2014; MAZUR et al., 2012; PATEL et al., 2012; ROCHA et al., 2011).

O cobre interage com ligantes biologicamente ativos desenvolvendo complexos de cobre(II) com diversas aplicações, dentre elas, antimicrobiana. O cobre é o terceiro metal de transição mais abundante no organismo humano após o ferro e do zinco, apresenta configuração eletrônica *d*, coloração avermelhada e vem sendo utilizado desde a antiguidade, em cerca de 3000 a.C., época em que os egípcios utilizavam-no como um anti-séptico para esterilizar água de beber (SILVA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012).

Neste contexto, diversos trabalhos avaliando a atividade antimicrobiana de complexos de cobre(II) são descritos na literatura (PAHONTU et al., 2015; SILVA, 2012; EFTHIMIADOU et al., 2008).

Pahontu et al (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do ligante 2-Hidroxi-4-metoxibenzaldeído (L) e dos complexos $[\text{Cu}_2(\text{L})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Cu}(\text{L})(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})]$, frente à *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) variou de 500 - 10000 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Efthimiadou et al (2008) avaliaram a formação de complexos de cobre(II) contendo o fármaco esparfloxacina (ESPAR) e ligantes nitrogenados (2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina

Introdução

ou 2,2'-dipiridilamina). A atividade antimicrobiana foi avaliada frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Quando comparado o resultado da atividade antimicrobiana dos complexos obtidos, observou-se uma melhora da atividade, ou seja, uma redução da CIM, a qual foi obtida na seguinte ordem 2,2'-dipiridilamina < 2,2'-bipiridina = 1,10-fenantrolina. A complexação do ligante esparfloxacina (CIM = 0,25 – 8 µg/mL⁻¹) com o íon cobre(II) na presença ou ausência de um ligante N-doador resultou em diversas atividades biológicas apresentando CIM para os complexos de 0,25–4 µg/mL⁻¹. A atividade antimicrobiana dos complexos contra *E. coli* apresentou-se melhor do que a do ligante, enquanto, esparfloxacina inibiu igual ou melhor *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Silva (2012) em sua tese de doutorado, sintetizou, caracterizou e avaliou a atividade antimicrobiana de três complexos de cobre(II) contendo o fármaco tuberculostático INH. Nos estudos *in vitro*, verificou que os complexos [CuCl₂(INH)₂]·H₂O; [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O e [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O, apresentaram atividade frente ao *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), com CIM de 10,00; 0,390 e 0,780 µg/mL⁻¹, respectivamente, e baixa toxicidade frente à macrófagos J774A.1, com IC₅₀ de 78,20; 78,13 e 78,13 µg mL⁻¹. Diante destes resultados obtidos, calculou-se o valor do índice de seletividade (IS) que foram 7,82, 200 e 100 µg mL⁻¹ para os compostos [CuCl₂(INH)₂]·H₂O, [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O e [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O, respectivamente, mostrando que estes complexos são promissores, entretanto, a baixa solubilidade dos compostos em água inviabilizou que fossem realizados os estudos *in vivo*.

Perante este problema de solubilidade aquosa relatado por Silva (2012), a busca por novas alternativas que visem minimizar ou solucionar este problema se faz necessário. Para isso, a tendência do uso de sistemas de liberação sustentada de fármacos em escalas nanométricas tem sido cada vez mais investigada, uma vez que o uso de sistemas nanoestruturados, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), podem ser interessantes para melhorar as características físico-químicas dos princípios ativos a ser carreados, buscando aumentar a solubilidade dos compostos em meio aquoso e assim, liberar sustentadamente o fármaco (SILVA et al., 2014; SINGHAL et al., 2011).

1.3 Sistemas nanoestruturados: Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)

Sistemas nanoestruturados são definidos por apresentar nanopartículas, ou seja, partículas com dimensões físicas que variam aproximadamente entre 10 - 1000 nm,

Introdução

farmacologicamente ativas, e que realizem veiculação de fármacos (FONSECA-SANTOS et al., 2015).

Sistemas nanoestruturados têm incentivado a comunidade científica a voltar-se para o desenvolvimento de novas estratégias que objetivem potencializar as propriedades biológicas do fármaco, bem como melhorar as propriedades organolépticas e os problemas relacionados à solubilidade água/óleo, degradação e toxicidade do fármaco, que possam vir a afetar o desenvolvimento de uma formulação (BONIFÁCIO et al., 2014; RIGON, 2013; YOON et al., 2013; ZHANG et al., 2011; DAS; CHAUDHURY, 2011; SHI et al., 2010).

Dentre os sistemas nanoestruturados, encontram-se as nanopartículas lipídicas (NL). Desenvolvidas principalmente a partir de 1990, as NL são divididas em NL de primeira geração, representadas principalmente pelas nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e NL de segunda geração, representadas pelos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs). As NLSs são obtidas apenas de lipídios sólidos à temperatura ambiente, apresentando estruturas altamente organizadas, formando cristais perfeitos. As NLSs permitem a incorporação de fármacos lipofílicos, biodisponibilidade melhorada, biocompatibilidade, liberam sustentadamente o fármaco, e são fáceis de reproduzir (EKAMBARAM et al., 2012; SEVERINO et al., 2011). No entanto, sua estrutura cristalina gera desvantagens como baixa capacidade de incorporação de fármacos e instabilidade física durante o armazenamento (YADAV et al., 2013; OBEIDAT et al., 2010; MULLER et al., 2000).

Para minimizar os problemas relacionados às NLSs, no final de 1990 surgiram os CLNs. Diferentemente das NLSs, os CLNs apresentam uma matriz composta por uma mistura de lipídio líquido e lipídio sólido à temperatura ambiente. Essa mistura de lipídio leva a formação de estruturas desordenadas, gerando um cristal imperfeito que proporciona maiores espaços para a incorporação de moléculas de fármacos (KOLENYAK-SANTOS et al., 2014; DAS et al., 2012).

De acordo com a composição, os CLNs podem apresentar diferentes tipos: CLN imperfeito, CLN amorfo, e CLN múltiplo. Os CLNs imperfeitos são constituídos por uma mistura de glicerídeos de ácidos graxos, provocando imperfeições nos cristais e, devido à sua estrutura desordenada, permitem melhor compartimentalização de fármacos. Em CLNs amorfos são utilizadas misturas de lipídios líquidos como triglicérides do ácido cáprico/caprílico e de lipídios sólidos, de modo que o lipídeo líquido esteja em maior concentração, e quando misturados originam estruturas amorfas, no qual o processo de cristalização de lipídio da forma α para a forma β não acontece, impedindo assim, a liberação do fármaco durante o armazenamento. CLNs múltiplos realizam uma dispersão de lipídios

Introdução

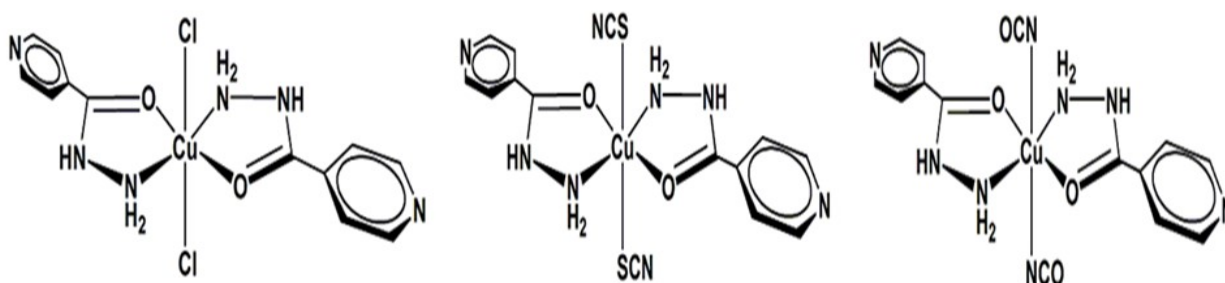
líquidos em sólido em água, a solubilidade dos lipídios líquidos no lipídio sólido é excedida formando nanocompartimentos de lipídios líquidos no interior da matriz lipídica sólida onde o fármaco fica encapsulado (MARCATO, 2009; MULLER et al., 2002; MULLER et al., 2000).

Os CLNs apresentam-se como um sistema vantajoso quando comparados às NLSs, pois sua estrutura desordenada permite incorporar fármacos lipofílicos, tendem a possibilitar uma maior compartimentalização das moléculas de fármaco, podem minimizar a toxicidade, reduzir ou evitar a degradação e as reações adversas obtidas pelo fármaco, além de serem reproduzidos em larga escala e apresentarem elevada estabilidade (YANG et al., 2014;).

Deste modo, a incorporação de complexos de cobre(II) em sistemas nanoestruturados, como os CLNs, busca uma terapia da doença que apresente menos efeitos adversos, uma vez que os complexos tendem a apresentar atividade frente ao *M. tuberculosis* e em virtude das vantagens dos CLNs, a incorporação de complexos de cobre(II) neste sistema pode levar à uma maior adesão do paciente.

Apesar dos notórios avanços científicos em relação aos complexos de cobre(II), estudos envolvendo este íon metálico e CLNs para atividade em *M. tuberculosis* não foram encontrados na literatura. Deste modo, o intuito deste trabalho foi realizar a incorporação dos complexos de cobre(II) $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ nos CLNs, a fim de desenvolver um sistema promissor capaz de aumentar a solubilidade dos compostos em meio aquoso e assim, otimizar o estudo frente ao *M. tuberculosis*. A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dos diferentes complexos de cobre(II) utilizados neste trabalho.

Figura 2. Estruturas químicas dos diferentes complexos de cobre(II): $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.



Fonte: Silva et al., 2015.

Os componentes utilizados neste trabalho para o desenvolvimento das formulações foram escolhidos, pois podem ser encontrados em formulações cosméticas e preparações

Introdução

farmacêuticas, além de serem utilizados em sistemas nanoestruturados de modo bem descrito na literatura, e também devido às suas características físico-químicas, as quais podem influenciar na estabilidade dos CLNs (DAS et al., 2012; GONZÁLEZ-MIRA et al., 2011; PUGLIA et al., 2008; CHORILLI et al., 2007).

O lipídio sólido escolhido para o desenvolvimento dos CLNs foi o estearato de polioxietileno (40) (EP), comumente utilizado como adjuvante farmacêutico para sistemas de liberação sustentada. O EP (40) possui uma cadeia média de cerca de 40 unidades de derivados de polietoxilados de ácidos esteáricos em sua porção hidrofílica, assim, a união destas moléculas permite alta liberação de fármacos (RIGON, 2013).

Como lipídios líquidos foram empregados, triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC), óleo de rícino (OR) e óleo de rícino hidrogenado e etoxilado (OR 40 OE).

TGACC foi utilizado, pois se constitui de uma mistura de triglicerídeos de cadeia média ligada principalmente aos ácidos graxos cáprico e caprílico, derivados do óleo de coco, saturados, que garantem baixa viscosidade aos CLNs (SATO et al., 2007).

OR é um composto de triglicerídeo de ácido graxo em que seu principal constituinte é o ácido ricinoleico (90%), derivados do óleo de mamona, responsável pela hidroxila (OH), enquanto os outros (10%) são constituídos de ácidos graxos não hidroxilados como os ácidos oléicos e linoléicos; devido à abundância do ácido ricinoleico, OR garante boa solubilidade ao sistema (ROWE et al., 2006; RODRIGUES, 2005).

OR 40 OE é um éster obtido pela reação do óxido de etileno com óxido de rícino hidrogenado, sendo composto por 40 unidades de polietilenoglicóis e etoxilatos de glicerol em sua porção hidrofílica. O processo de etoxilação do OR 40 OE aumenta a sua solubilidade em água, favorecendo a estabilização do sistema neste meio; assim, a etoxilação permite ao composto solubilizar-se tanto em substâncias polares como apolares (SILVA, 2010).

Como tensoativos no desenvolvimento dos CLNs foram utilizados o poloxamer 407 (P-407) e o brometo de cetrimônio (BC).

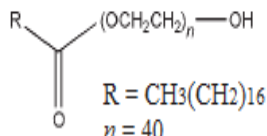
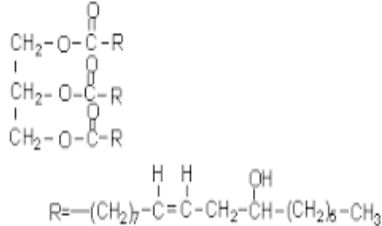
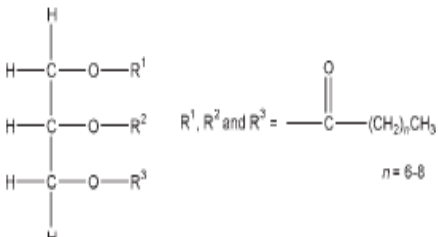
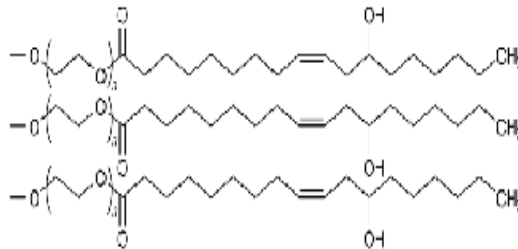
O P-407 é um copolímero formado por uma série de blocos de polioxietileno em sua porção hidrofílica e de polioxipropileno em caráter hidrofóbico. Quando utilizado em uma concentração superior à concentração micelar crítica, os monômeros do P-407 se arranjam em micelas esféricas constituídas por um núcleo de polioxipropileno com superfície de polioxietileno, as quais podem se inserir na superfície dos CLNs, formando um filme na superfície da partícula, conferindo maior estabilidade física por arranjo estérico, impedindo a aglomeração dos CLNs (ROWE et al., 2006; LEE et al., 2003; LOURENÇO et al., 1996).

Introdução

O BC é um composto de amônio quaternário que atua em formulações cosméticas e farmacêuticas como conservante antimicrobiano (ROWE et al., 2006). Os CLNs podem ser desenvolvidos com tensoativos catiônicos como o BC, uma vez que a superfície catiônica dos CLNs pode influenciar no aprisionamento do fármaco, evitando ou diminuindo a expulsão do fármaco durante o período de armazenagem. Neste trabalho, o BC foi utilizado como um tensoativo catiônico para que os CLNs tivessem uma carga positiva e que pudessem ter uma melhor interação com a parede do *M. tuberculosis* que tem uma carga negativa (AYLA-TORRE et al., 2013; STOKES et al., 2004). Assim, essa ação mútua poderia melhorar a atividade dos complexos de cobre(II) frente ao microrganismo.

Os materiais lipídicos e os tensoativos empregados para o desenvolvimento dos CLNs EP-40, TGACC, OR e OR 40 OE, e P-407 e BC, respectivamente, e as estruturas químicas dos mesmos estão demonstrados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Estruturas químicas dos lipídios empregados para o desenvolvimento dos CLNs.

Lipídios	
 R = CH₃(CH₂)₁₆ n = 40 Estearato de polietileno 40 (EP40)	 R = -(CH₂)₇-CH=CH-CH₂-CH(OH)-(CH₂)₆-CH₃ Óleo de rícino (OR)
 R¹, R² and R³ = -C(=O)-(CH₂)_n-CH₃ n = 6-8 Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC)	 Óleo de rícino hidrogenado etoxilado 40 OE (OR 40 OE)

Fonte: Autora.

Figura 4. Estruturas químicas dos tensoativos utilizados para o desenvolvimento dos CLNs.

Tensoativos
$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_x-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{O})_y-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_x-\text{H}$ Poloxamer 407 (P-407)
$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\overset{ }{\text{N}}^+}}-\text{CH}_3 \text{ Br}^-$ Brometo de cetrimônio (BC)

Fonte: Autora.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver, caracterizar, e avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para a incorporação de complexos de cobre(II) aplicáveis no estudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para a incorporação dos complexos $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (C1), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (C2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C3) nos CLNs;
- Caracterizar os sistemas obtidos com relação à incorporação dos complexos de cobre(II), empregando os seguintes ensaios: determinação de diâmetro hidrodinâmico médio (Dnm) e de polidispersidade (IPD), potencial zeta (PZ), microscopia de força atômica (MFA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos utilizando a técnica *rezasurin Microtiter Assay* (REMA) frente ao MTB H₃₇Rv, a citotoxicidade (IC₅₀) frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e o índice de seletividade (IS);
- Avaliar a toxicidade aguda dos compostos frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e matérias-primas

- Água (Milli-Q);
- Estearato de polioxietileno 40 (Sigma Aldrich, Brasil);
- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Via Farma, Brasil);
- Óleo de rícino (Mapric, Brasil);
- Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 40 OE (Eumulgin[®] HRE 40, PharmaSpecial, Brasil);
- Poloxamer 407 (Pluronic[®] F127, Sigma-Aldrich, USA);
- Brometo de cetrimônio (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Becton-Dickinson, USA);
- Meio de cultura DMEM (Vitrocell[®]);
- MeioEagle Modificado por Dulbecco (DMEM- Sigma Aldrich, USA)
- Solução de Resazurina (Sigma Aldrich, USA);
- Tripsina (Vibrocell[®])

3.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento Fisatom, modelo 752A;
- Balança semi-analítica, Shimadzu, modelo AW220;
- Centrífuga Spin Coater – SPI Supplies, modelo KW-4A;
- DSC - TA Instruments, modelo DSC Q10;
- DLS (Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK) - fonte de laser He-Ne 4,0 mW, 633nm;
- Microscópio de força atômica - Bruker, modelo Dimension Icon;
- Sonicator, Ultrasonic processor, Qsonica, modelo Q700;
- Spectrafuge[™] 16 M Microcentrífuga (Labnet[®], USA);
- Ultra-Turrax, modelo IKA;
- Microplaca de 96 orifícios (Kasvi[®], Brasil);
- Espectrofotômetro Cytation (Biotek[®]);

- Garrafas de cultivo celular de 12,50 cm²(Kasvi[®], Brasil);
- Garrafas de cultivo de 75,00cm² (Kasvi[®], Brasil);

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese dos complexos de cobre(II)

Os complexos de cobre(II) foram sintetizados pela Dra. Patrícia Bento da Silva, pós-doutoranda do laboratório de Farmacotécnica da FCFAr-UNESP de acordo com a literatura (SILVA et al., 2015).

3.2.2 Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) por Ultraturrax

Inicialmente foram desenvolvidas 13 formulações contendo como fase lipídica concentrações fixas de lipídio sólido e de lipídio líquido sendo respectivamente, 2,07% de estearato de polioxietileno 40 (EP) e 2,05% de triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC). Como fase aquosa, utilizou-se o tensoativo poloxamer 407 (P-407) nas concentrações de 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0% e água (Mili-Q) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13.

	Concentrações (%)			
	Estearato de Polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Poloxamer 407	Água Mili-Q
F1	2,07	2,05	1,0	qsp*
F2	2,07	2,05	2,0	qsp*
F3	2,07	2,05	2,5	qsp*
F4	2,07	2,05	3,0	qsp*
F5	2,07	2,05	3,5	qsp*
F6	2,07	2,05	4,0	qsp*
F7	2,07	2,05	2,0	qsp*
F8	2,07	2,05	4,0	qsp*
F9	2,07	2,05	2,0	qsp*
F10	2,07	2,05	4,0	qsp*
F11	2,07	2,93	2,0	qsp*
F12	2,07	2,93	3,0	qsp*
F13	2,07	2,93	4,0	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Foi desenvolvida também, uma formulação contendo como fase lipídica concentrações fixas de lipídio sólido e de lipídios líquidos, sendo, 2,07% de EP, e 2,05% de TGACC e 0,88% de rícino hidrogenado etoxilado 40OE (OR 40 OE), respectivamente. Como fase aquosa, utilizou o P-407 na concentração de 3,0% e água (Mili-Q) (Tabela 2).

Tabela 2. Composição da formulação F14.

	Concentrações(%)				
	Estearato de Polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Óleo de Rícino 40OE	Poloxamer 407	Água MiliQ
F14	2,07	2,05	0,88	3,0	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Após essa etapa de escolha dos componentes e suas respectivas concentrações, os constituintes da fase lipídica e da fase aquosa foram pesados em uma balança semi-analítica em béqueres separados, de modo que a fase aquosa foi aquecida a 70 °C e a fase lipídica a aproximadamente 5–10 °C acima do ponto de fusão do lipídio. A fase aquosa contendo o tensoativo foi vertida sobre a fase lipídica fundida, sob constante agitação com auxílio de um agitador magnético, por aproximadamente 30 segundos, originando assim, uma pré-emulsão.

As diversas formulações foram obtidas por Ultra Turrax a 10.000 rpm por 10 minutos (Figura 5, seção 3.2.3). Depois de emulsificadas, as dispersões de CLNs obtidas foram resfriadas em banho de gelo, ocasionando-se a cristalização do lipídio e conseqüentemente a formação dos CLNs. Depois de preparadas, as formulações foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira (4 ± 2 °C). Tal processo de obtenção das dispersões de CLNs foi semelhante para todas as formulações preparadas por Ultra turrax.

3.2.3 Desenvolvimento de CLNs por sonicador

Inicialmente foi desenvolvida uma formulação contendo como fase lipídica concentrações fixas de lipídio sólido e de lipídios líquidos, sendo, 2,07% de EP, e 2,05% de TGACC e 0,88% de óleo de rícino hidrogenado etoxilado 40OE (OR 40 OE), respectivamente. Como fase aquosa, utilizou-se o P-407 na concentração de 3,0% e água (Mili-Q) (Tabela 3).

Tabela 3. Composição da formulação F15.

Concentrações (%)					
	Estearato de Polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Óleo de Rícino 40OE	Poloxamer 407	Água MiliQ
F15	2,07	2,05	0,88	3,0	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Em seguida foram desenvolvidas outras formulações utilizando o OR 40 OE acrescidas ou não de brometo de cetrimônio (BC). Outras formulações utilizaram o óleo de rícino (OR) acrescido ou não de brometo de cetrimônio (BC). A composição destas formulações está mencionada nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Composição das formulações F16, F17, F18, F19, F20, F21, F22, F23, F24, F25, F26 e F27.

Concentrações (%)						
	Estearato de Polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Óleo de Rícino 40OE	Óleo de Rícino	Poloxamer 407	Água MiliQ
F16	2,07	2,05	0,88	-	1,0	qsp*
F17	2,07	2,05	0,88	-	2,0	qsp*
F18	2,07	2,05	0,88	-	2,5	qsp*
F19	2,07	2,05	0,88	-	3,0	qsp*
F20	2,07	2,05	0,88	-	3,5	qsp*
F21	2,07	2,05	0,88	-	4,0	qsp*
F22	2,07	2,05	-	0,88	1,0	qsp*
F23	2,07	2,05	-	0,88	2,0	qsp*
F24	2,07	2,05	-	0,88	2,5	qsp*
F25	2,07	2,05	-	0,88	3,0	qsp*
F26	2,07	2,05	-	0,88	3,5	qsp*
F27	2,07	2,05	-	0,88	4,0	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Tabela 5. Composição das formulações F28, F29, F30, F31, F32, F33, F34, F35, F36, F37, F38, e F39.

	Concentrações (%)						
	Estearato de Polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Óleo de Ricino 40OE	Óleo de Ricino	Poloxamer 407	Brometo de cetrimônio	Água MiliQ
F28	2,07	2,05	0,88	-	1,0	0,50	qsp*
F29	2,07	2,05	0,88	-	2,0	0,50	qsp*
F30	2,07	2,05	0,88	-	2,5	0,50	qsp*
F31	2,07	2,05	0,88	-	3,0	0,50	qsp*
F32	2,07	2,05	0,88	-	3,5	0,50	qsp*
F33	2,07	2,05	0,88	-	4,0	0,50	qsp*
F34	2,07	2,05	-	0,88	1,0	0,50	qsp*
F35	2,07	2,05	-	0,88	2,0	0,50	qsp*
F36	2,07	2,05	-	0,88	2,5	0,50	qsp*
F37	2,07	2,05	-	0,88	3,0	0,50	qsp*
F38	2,07	2,05	-	0,88	3,5	0,50	qsp*
F39	2,07	2,05	-	0,88	4,0	0,50	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Após essa etapa, os componentes da fase lipídica e da fase aquosa foram pesados em uma balança semi-analítica em béqueres separados, de modo que a fase aquosa foi aquecida a 70 °C e a fase lipídica a aproximadamente 5–10 °C acima do ponto de fusão do lipídio. A fase aquosa contendo o tensoativo ou a mistura de tensoativos foi vertida sobre a fase lipídica fundida, sob constante agitação com auxílio de um agitador magnético, por aproximadamente 30 segundos, originando assim, uma pré-emulsão.

Assim, diversas formulações foram obtidas por sonicador 700 W de potência, amplitude de 8% que corresponde a aproximadamente 25,6 micrômetros, em modo descontínuo por 20 minutos com intervalo de 30 segundos a cada 30 segundos (Figura 5). Durante todo o processo de sonicação, as formulações foram mantidas em banho de gelo ocasionado assim, a cristalização lipídica e a formação dos CLNs.

A fim de eliminar o titânio desprendido da haste durante o processo de sonicação, as formulações foram centrifugadas utilizando uma rotação de 5000 rpm por 10 minutos (AGAYAN et al., 2004). Em seguida, foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira. Tal processo de obtenção das dispersões de CLNs foi semelhante para todas as formulações preparadas por sonicador.

Figura 5. Desenvolvimento dos CLNs obtidos pela técnica de fusão-emulsificação, testando-se diferentes metodologias, Ultra turrax e Sonicador.



Fonte: Autora.

3.2.4 Incorporação de complexos de cobre(II) nos CLNs

A incorporação de diferentes complexos de cobre(II) $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$; $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, denominados de complexos C1, C2 e C3), respectivamente, foi realizada na etapa de pré-emulsão em uma concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Depois de emulsificadas, as dispersões de CLNs foram preparadas utilizando o sonicador 700 W de potência, amplitude de 8% que corresponde 25,6 micrômetros, modo descontinuo por 20 minutos com intervalo de 30 segundos a cada 30 segundos, sendo envolvida por banho de gelo durante todo o processo de sonicação para, formando assim, os CLNs contendo os diferentes complexos de cobre(II).

A fim de eliminar o titânio desprendido da haste durante o processo de sonicação, as formulações foram centrifugadas utilizando uma rotação de 5000 rpm por 10 minutos (AGAYAN et al., 2004). Em seguida, foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira.

As formulações selecionadas para a incorporação de diferentes complexos de cobre(II) nos CLNs foram F32 e F38 (Tabela 5, seção 3.2.3).

A Tabela 6 mostra a composição das formulações contendo os diferentes complexos de cobre(II) incorporados nos CLNs.

Tabela 6. Composição das formulações contendo os diferentes complexos de cobre(II) incorporados nos CLNs (F32.OE.C1; F32.OE.C2; F32.OE.C3; F38.OR.C1; F38.OR.C2; e F38.OR.C3).

	Concentrações (%)						C1	C2	C3	Água Mili-Q
	Estearato de polioxietileno 40	Triglicérides do ácido cáprico / caprílico	Óleo de Ricino 40 OE	Óleo De Ricino	Poloxamer 407	Brometo de cetrimônio				
F32.OE.C1	2,07	2,05	0,88	-	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	Qsp*
F32.OE.C2	2,07	2,05	0,88	-	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	qsp*
F32.OE.C3	2,07	2,05	0,88	-	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	qsp*
F38.OR.C1	2,07	2,05	-	0,88	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	qsp*
F38.OR.C2	2,07	2,05	-	0,88	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	qsp*
F38.OR.C3	2,07	2,05	-	0,88	3,0	0,50	0,50	0,50	0,50	qsp*

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

3.2.5 Caracterização físico-química dos CLNs

3.2.5.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Dnm) e do índice de polidispersidade (IPD)

A determinação do Dnm e do IPD foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou *quasi-elastic light scattering*, utilizando o equipamento de dispersão dinâmica de luz (DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK). Esta técnica determina o movimento Browniano das partículas numa amostra no qual se calcula o raio hidrodinâmico das partículas coloidais processados através do *software* incluído no sistema (MALVERN INSTRUMENT, 2003).

As medidas de espectroscopia de correlação de fótons foram realizadas à temperatura ambiente em que cada dispersão de CLN foi diluída em água ultra-purificada (1:100), mantida em frasco fechado, vertida em uma cubeta e colocada na câmara de análise. Realizaram-se três determinações de Dnm e IPD calculando a média e o desvio padrão de cada formulação. Após o preparo, as formulações foram analisadas nos tempos 1, 15, 30, 45 e 60 dias. Durante todo o tempo de análise, as formulações permaneceram em geladeira (4 ± 2 °C).

Os dados de estabilidade foram tratados no *software Statistica 7*, os quais foram avaliados através do teste estatístico Anova, utilizado para medidas repetidas no nível de significância de 5%.

3.2.5.2 Análise do potencial zeta (PZ)

Para a análise do potencial zeta (PZ) a qual determina a mobilidade eletroforética das nanopartículas, utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, Mariana Rillo Sato

UK). Os valores de PZ foram processados através do software incluído no sistema (MALVERN INSTRUMENT, 2003). As medidas de PZ foram realizadas a temperatura ambiente em que cada dispersão de CLN foi diluída em água ultra-purificada (1:100), mantida em frasco fechado, vertida em uma cubeta e colocada na câmara de análise. Realizaram-se três determinações de PZ calculando-se a média e o desvio padrão de cada formulação. Após o preparo as formulações foram analisadas nos tempos de 1, 15, 30, 45 e 60 dias. Durante todo o tempo de análise, as formulações permaneceram em geladeira (4 ± 2 °C).

Os dados de estabilidade foram avaliados através do *software Statistica 7*, empregando o teste estatístico Anova para medidas repetidas, no nível de significância de 5%.

3.2.5.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A determinação da morfologia dos CLNs foi obtida por MFA. As análises foram realizadas no Departamento de Física e Ciências de Materiais (FCM) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – USP, em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo A. Pereira da Silva.

Utilizou-se o microscópio de força atômica (Bruker, modelo Dimension Icon), sob o modo de contato intermitente. Primeiramente pingou-se uma gota de amostra sobre uma placa de mica, que foi centrifugada por Spin Coater (Centrífuga Spin Coater – SPI Supplies, modelo KW-4A) a 500 rpm por 30 segundos, seguida de 5.000 rpm por 1 minuto. A placa de mica foi colocada no microscópio e assim, as imagens topográficas foram observadas empregando uma sonda/cantilever na qual fez o rastreamento da superfície da amostra, varrendo uma área de 5×5 μm (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

O tratamento das imagens topográficas foi realizado utilizando o *software Nanotec WSxM versão 5.0*.

3.2.5.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Pulcinelli do Departamento de Físico-química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

As medidas de DSC foram realizadas utilizando-se um equipamento TA DSC (Calorímetro diferencial de varredura (DSC) - TA Instruments, modelo DSC Q10), num intervalo de temperatura de -40 a 350 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob

atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL/min. Para isso, foram utilizados cerca de 5 mg de amostra em um cadinho de alumínio selado que foi colocado no calorímetro.

Analysaram os componentes utilizados nas formulações, sendo eles, EP, TGACC, OR 40 OE, OR, P-407, BC, bem como os complexos C1, C2 e C3, isolados. Também foram analisados os CLNs F32 e F38 e os complexos de cobre(II) incorporados nos CLNs, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3 e F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3. Todas as formulações foram previamente liofilizadas.

Os resultados de DSC foram plotados empregando o *software Origin 8* (OriginLab Corporation) e analisados pelo *software TA Universal Analysis*.

3.2.6 Ensaios biológicos *in vitro*

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e Prof^a. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

3.2.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos utilizando *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) frente ao MTB H₃₇Rv

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada empregando o ensaio *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), conforme Palomino et al (2002). As soluções estoque dos complexos de cobre(II) incorporados nos CLNs foram preparadas a 500 µg/mL e diluídas em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, afim de se obter diferentes concentrações de cada composto (125,00 à 0,48 µg/mL). A partir de um cultivo em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, uma alíquota da cultura de *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi adicionada a microplaca de 96 orifícios junto dos compostos permitindo um volume final de 200 µL com 5x10⁵ UFC/mL e incubada com 5% CO₂ a 37 °C por 7 dias. No sétimo dia de ensaio, foram colocados em cada orifício 30 µL de Resazurina na concentração de 0,01% e incubado por 24 h. Para se determinar a fluorescência e a CIM no qual deve resultar em uma inibição ≥ 90% da multiplicação microbiana, foi utilizada o leitor de microplacas Cytation (Biotek[®]; filtros: 530nm de excitação e 590nm de emissão). Como controles, em cada ensaio foram determinados os CIM de RIF. Os ensaios foram realizados em 3 estudos independentes.

3.2.6.2 Determinação da citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e o índice de seletividade (IS)

Segundo Pavan et al (2010) as linhagens celulares de fibroblasto pulmonar MRC-5 (ATCC CCL-171) e de macrófagos de camundongos J774A.1 (ATCC TIB-67) seguiram o protocolo a seguir. Ambas as linhagens celulares foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultivo celular de superfície em torno de 12,50 cm² com 6 mL de meio de cultura DMEM (Vitrocell[®]) contendo sulfato de gentamicina (50mg/L) e anfotericina B (2mg/L), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (denominado meio completo) e incubadas por 1h e 30 minutos em estufa para cultivo celular a 35°C com 5% de CO₂. Após este período o sobrenadante foi retirado, centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso com 6mL de meio de cultura e retornado à garrafa. Este processo de lavagem tem por fim a retirada de todo DMSO, que durante o congelamento tem função criopreservante. Após confluência celular, as células foram retiradas com auxílio de tripsina (Vitrocell[®]) e repassadas a garrafas com superfície de 75,00cm² adequando o volume de meio de cultura de acordo com o tamanho das garrafas. As células foram contadas em Câmara de Neubauer a fim de ajustar a concentração de 1x10⁵ cels/mL. Após o ajuste, foram semeadas (colunas 2-11) em microplaca de 96 orifícios permitindo um volume final de 200 µL e incubadas por 24h a 37 °C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular antes da análise com os compostos. Após o período de incubação, em outra placa de 96 orifícios, as soluções dos compostos em concentrações de 500µg/mL submetidas à diluição seriada em meio DMEM completo com intervalo de 0,24 a 250,00 µg/mL. O meio de cultura que estava na placa de células foi retirado e estas soluções foram transferidas à placa de células, a fim destas serem expostas aos compostos nas diferentes concentrações por 24h. Ao longo das 24h as placas permaneceram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Após esta segunda incubação, foi retirado todo o meio de cultura e aplicado 50µL de resazurina solubilizada em meio de cultura incompleta em cada orifício na concentração de 0,01% e incubadas por 3h; para após este período ser realizada a leitura final. A leitura final foi baseada na interpretação da fluorescência em leitor de placas Cytation (Biotek[®]; filtros: 530nm de excitação e 590nm de emissão). O valor de IC₅₀ é definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permanecem viáveis). Como controle de morte celular foi utilizado o fármaco doxorrubicina (Sigma-Aldrich) à concentração inicial de 50 nmol.

3.2.6.3 Avaliação da toxicidade aguda dos compostos frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae)

De acordo com Parra et al (2001) para determinar a toxicidade dos complexos de cobre(II) solubilizados em DMSO e nos CLNs F32 e F38 em *Artemia salina* L., 25 mg de ovos (*Artemia salina* do RN, Natal- Brasil) foram incubados em um béquer (2000 mL) com água salgada artificial a temperatura de 20 a 30°C. A água salina artificial consistiu de 23 g NaCl (Qhemis), 11 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Usb Corporation Clevelan, OH USA), 4 g Na_2SO_4 (Synth), 1,3 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ (Merck), 0,7 g KCl (Merck) em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 usando NaOH 5 mol L⁻¹ para evitar o risco de morte para a *Artemia larvae* (náuplios) por diminuição do pH durante a incubação. Após 24 horas, 0,6 g de *Saccharomyce scerevisiae* (Dr. Oetker) para cada litro de água salgada foi adicionado ao béquer, de modo a alimentar os náuplios; 48 horas após os ovos serem incubados, os náuplios foram extraídos para o experimento. Uma suspensão de náuplios (10-15 organismos), 120 µL, foi adicionada a cada poço da microplaca de 96 orifícios, incluindo o grupo controle. Em uma microplaca de 96 orifícios separada, realizou-se a diluição seriada dos compostos em DMSO a 2% ou nos CLNs. As concentrações testadas foram de 1500 - 5,85 µg/mL. Após 24 horas de incubação, a placa foi então examinada sob uma lupa binocular (x3,0) e o número de náuplios vivos em cada poço foi contado e a concentração letal mediana (CL₅₀) foi calculada. De acordo com Food and Drug Administration (FDA), a concentração letal mediana (CL₅₀) é definida como a concentração do material que os organismos são expostos que é estimado ser letal para 50% dos organismos testados. A CL₅₀ é geralmente expressa como uma variável tempo-dependente (por exemplo, 24 horas CL₅₀). A equação 1 pode ser aplicada para a determinação da porcentagem de náuplios viáveis:

$$\frac{(100 \times B)}{A} = \% \text{ de Náuplios Viáveis (equação 1)}$$

Em que: A = a média da leitura dos orifícios controle positivo (orifícios apenas com náuplios e solução salina); B = resultado de cada orifício com a respectiva diluição do complexo analisado. Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata biológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Desenvolvimento de CLNs por Ultra turrax

Os CLNs estáveis possuem aspectos homogêneos e translúcidos, que permitam a dispersão de feixe de luz e assim, viabilize a análise de Dnm e de IPD (ALLEN-JUNIOR et al., 2011).

Buscando desenvolver dispersões de CLNs com essas características, inicialmente foram preparadas 14 formulações. Seguindo a metodologia adaptada de Puglia et al (2008) as formulações foram preparadas utilizando a técnica de fusão-emulsificação, sendo que as 6 primeiras foram denominadas de F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 1, seção 3.2.2), em que a pré-emulsão formada foi dispersa por Ultra Turrax a 10000 rpm por 10 minutos. As dispersões de CLNs obtidas foram analisadas visualmente, notando-se a ocorrência de separação de fases em todos os casos, ou seja, apresentaram-se instáveis.

Deste modo, foram preparadas novas formulações F7, F8, F9 e F10 (Tabela 1, seção 3.2.2) contendo os mesmos componentes e seguindo a mesma metodologia; entretanto, foram testados dois diferentes tempos de dispersão por Ultra turrax, 15 minutos (F7 e F9) e 20 minutos (F8 e F10). Contudo, esses tempos não foram capazes de proporcionar formulações estáveis.

Outra alteração realizada foi em relação à concentração do material lipídico, TGACC de 2,05% para 2,93% para as formulações F11, F12 e F13 (Tabela 1, seção 3.2.2) variando também as concentrações de P-407, 2,0% (F11); 3,0% (F12) e 4,0% (F13). Todavia, as alterações desses componentes não influenciaram na dispersão dos CLNs e as formulações obtidas não foram estáveis.

As formulações que não foram estáveis podem ter apresentado separação de fases devido à natureza química dos lipídios, e a concentração utilizada de lipídios, os quais tendem a influenciar na estrutura e no tamanho das partículas, podendo ocasionar a perda da estabilidade do sistema (SOUTO et al., 2011; HEAURTAULT et al., 2003).

Sendo assim, foi preparada uma nova formulação (F14 (Tabela 2, seção 3.2.2)) utilizando a metodologia adaptada de Das et al (2012). Os autores desenvolveram NLSs e CLNs testando diversos materiais lipídicos, dentre eles TGACC e OR 40 OE, em que a pré-emulsão foi dispersa por dois diferentes métodos, Ultra Turrax e sonificador.

A formulação F14 apresentou um aspecto homogêneo e translúcido, não visualizado nas formulações anteriores. Tal aspecto pode ser justificado devido à utilização do OR 40 OE

na formulação, uma vez que o processo de etoxilação do OR 40 OE provavelmente favoreceu a estabilização do sistema neste meio, considerando que sua característica anfifílica permitiu ao composto uma melhor solubilidade, garantindo sua homogeneidade (SILVA, 2010).

4.2 Desenvolvimento de CLNs por sonicator

Embora a formulação F14 tenha revelado um aspecto homogêneo e translúcido, todas as demais formulações desenvolvidas por Ultra Turrax apresentaram separação de fases, mostrando-se inadequadas.

Sendo assim, a formulação F15, obtida pelo método de dispersão por sonicator e contendo os mesmo componentes da formulação F14, foi desenvolvida com o intuito de analisar qual método seria o mais adequado para dar prosseguimento ao trabalho (Tabela 3, seção 3.2.3). Após o preparo, a formulação F15 apresentou aspecto homogêneo e translúcido. Desta forma, foi utilizado o método de dispersão por sonicator para prosseguir com o trabalho.

Foram preparadas seis novas formulações (F16, F17, F18, F19, F20 e F21) utilizando o OR 40 OE e variando as concentrações de P-407 (1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0%, respectivamente) (Tabela 4, seção 3.2.3). Tais formulações apresentaram aspectos homogêneos e translúcidos.

Seguindo a metodologia adaptada de González-Mira et al (2011) foram testadas seis novas formulações F22, F23, F24, F25, F26 e F27 utilizando outro material lipídico, OR em vez do OR 40 OE e variando as concentrações de P-407 (1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0%, respectivamente) (Tabela 4, seção 3.2.3). Conforme esperado, após o preparo, tais dispersões de CLNs também se mostraram translúcidas e homogêneas.

Segundo Souto et al (2011) e Bunjes et al (2003) a escolha e a concentração de tensoativo, e o método de dispersão utilizado para o desenvolvimento dos CLNs são fatores determinantes para garantirem uma ampla distribuição de tamanho de partículas e uma boa estabilidade física das formulações durante o armazenamento. Segundo os autores, as dispersões de CLNs constituídas por uma mistura de tensoativos garantem uma maior estabilidade física em relação aos CLNs contendo apenas um tensoativo na fase aquosa.

Para a escolha do tensoativo considerou-se o estudo de Lourenço (1996) o qual revelou que formulações desenvolvidas empregando poloxamer 407 apresentam uma estabilidade física ocasionada por arranjo estérico entre a superfície da partícula e o meio específico, e não por repulsão eletrostática.

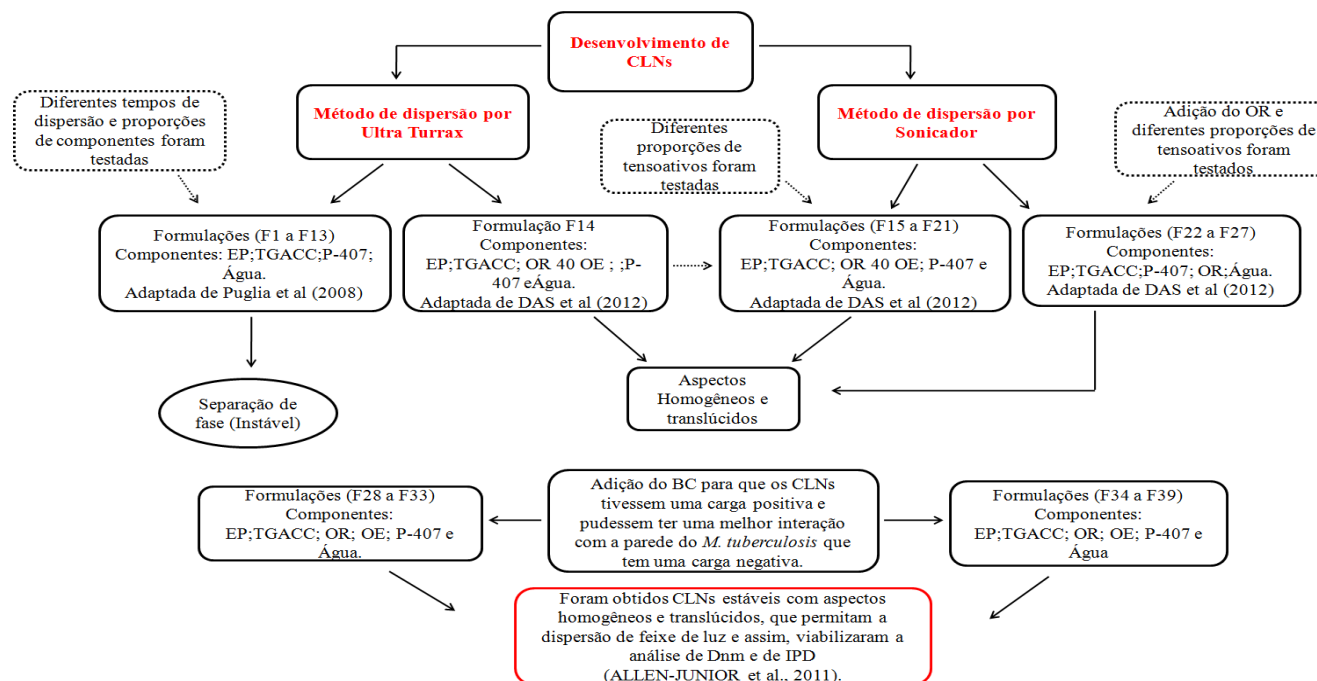
Como o P-407 já vem sendo utilizado em nosso estudo, decidiu-se adicionar às formulações, o brometo de cetrimônio (BC), um tensoativo catiônico, para que os CLNs tivessem uma carga positiva e pudessem ter uma melhor interação com a parede do *M. tuberculosis*, que tem carga negativa. Desta forma, foram preparadas novas formulações contendo uma mistura de tensoativos (P-407 e BC) na fase aquosa.

Assim, foram preparadas 12 novas formulações constituídas dos materiais lipídicos utilizados até o momento e acrescidas do BC, sendo que, 6 formulações foram constituídas por OR 40 OE, F28, F29, F30, F31, F32 e F33; e 6 formulações foram constituídas por OR, F34, F35, F36, F37, F38 e F39 (Tabela 5, item 3.2.3). Em todas as formulações foi possível observar características translúcidas e homogêneas.

Todas as formulações citadas acima foram acondicionadas em frascos âmbar sob refrigeração (4 ± 2 °C) e por apresentarem características físicas adequadas (homogeneidade e translucidez), foram analisadas via Dnm e IPD.

Para melhor compreensão, as formulações desenvolvidas por Ultra turrax (seção 4.1) e por sonicador (seção 4.2), seguem demonstradas no Fluxograma abaixo (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma das formulações desenvolvidas por Ultra turrax e por sonicador.

**Siglas**

EP: Estearato de Polioxietileno 40

TGACC : Triglicérides do ácido cáprico/caprilico

OR 40 OE : Óleo de ricino hidrogenado e etoxilado 40 OE

OR: Óleo de ricino

P-407: Poloxamer 407

BC=: Brometo de cetrimônio

Água Mili-Q

Fonte: Autora.

4.3 Caracterização físico-química dos CLNs

4.3.1 Determinação do Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (Dnm) e do índice de polidispersidade (IPD)

Dnm e IPD são parâmetros extremamente importantes para avaliar a estabilidade dos CLNs (TAN et al., 2010). Para serem considerados sistemas cineticamente estáveis, o Dnm das partículas de sistemas coloidais deve apresentar escalas nanométricas entre 10 – 1000 nm, sendo que as nanopartículas lipídicas geralmente apresentam-se entre 150 – 300 nm (FONSECA-SANTOS et al., 2015; YOON et al., 2013). O índice de IPD determina a distribuição de tamanho de partícula, ao passo que IPD baixo, próximo de 0,2, revela partículas mais homogêneas, enquanto $IPD > 0,4$ indicam distribuição de tamanho de partículas heterogêneas em que provavelmente apresentam aglomerados na dispersão (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011; KRAUSE et al., 2010).

Apesar de Dnm e IPD serem essenciais para a estabilidade do sistema, fatores como componentes da formulação (considerando a mistura de agentes tensoativos) e as propriedades estruturais dos lipídios utilizados são indicativos de instabilidade física, assim como as condições de preparo (tempo, temperatura e equipamento) também influenciam na estabilidade final da formulação (YADAV et al., 2013; HEAURTAULT et al., 2003; ÜNER, 2006).

Das formulações realizadas pelo método de dispersão por Ultra Turrax apenas a formulação F14 apresentou homogeneidade, se mostrando adequada (seção 4.1). Provavelmente a estabilidade conferida a esta formulação se deu devido à utilização do OR 40 OE, que devido a sua característica anfifílica, permite que o composto seja capaz de solubilizar-se tanto em solventes polares como apolares.

Além disso, a adição de um lipídio líquido na formulação tende a permitir maior compartimentalização de fármacos, podendo principalmente, evitar ou diminuir a expulsão do fármaco da partícula durante o período de armazenagem. Segundo Mitri et al (2011) fármacos lipofílicos possuem melhor solubilidade em lipídios líquidos que em lipídios sólidos, assim, a adição do OR 40 OE na matriz lipídica dos CLNs pode favorecer a incorporação dos complexos de cobre(II), e possivelmente conferir estabilidade ao sistema.

Do mesmo modo, a formulação F15 realizada pelo método de dispersão por sonicator, e contendo os mesmo componentes da formulação F14, também apresentou homogeneidade e

translucidez. Portanto, essas formulações foram analisadas via Dnm e IPD no tempo de 24 horas.

Comparando os resultados destas duas formulações, a F14 revelou um Dnm praticamente 2 vezes maior que a F15, além de um maior IPD (Tabela 7). Provavelmente isso ocorreu devido à utilização do método de sonicação, pois já é bem estabelecido na literatura que a dispersão por sonicação influencia diretamente no Dnm e no IPD (DAS et al., 2011).

Observou-se neste trabalho, que o método de sonicação apresentou mais vantagens que o método de Ultra turrax, uma vez que permitiu a obtenção de partículas distribuídas de forma homogênea em escalas nanométricas, além de formulações mais estáveis decorrentes de alta velocidade de agitação associada a elevada temperatura (KAUR; SLAVCEV, 2013). Assim, a partir dos resultados obtidos por essas formulações, foi descartado o uso do método de dispersão por Ultra Turrax.

As formulações F16, F17, F18, F19, F20 e F21 foram analisadas via Dnm e IPD no tempo de 24 horas após o preparo. Os resultados de Dnm dessas formulações revelaram que todas obtiveram valores de Dnm entre 87 nm e 103 nm semelhantes ao valor da formulação F15, de 89 nm (Tabela 7).

Os valores de IPD das formulações F16, F17, F18, F19, F20 e F21 (Tabela 7) mantiveram-se entre 0,23 e 0,35, esses resultados revelaram que as formulações apresentam distribuição de partículas homogêneas, dificultando assim, a possibilidade de aglomerados na dispersão (KRAUSE et al., 2010).

Para as formulações F22, F23, F24, F25, F26 e F27 (Tabela 7) pode se verificar que o aumento da concentração do P-407 nas formulações influenciou para que ocorressem menores valores de Dnm.

Os valores de IPD destas formulações foram mantidos entre 0,18 e 0,23, revelando que todas essas formulações apresentaram excelente homogeneidade de dispersão (KRAUSE et al., 2010).

Os resultados de Dnm e de IPD analisados revelaram que tanto as formulações contendo OR 40 OE quanto às formulações contendo OR apresentaram ampla distribuição de partículas, e excelente homogeneidade da dispersão (KRAUSE et al., 2010).

Tabela 7. Média e desvio padrão do Dnm (nm) e do IPD das formulações desenvolvidas contendo OR 40 OE (F14, F15, F16, F17, F18, F19, F20 e F21) e OR (F22, F23, F24, F25, F26 e F27).

	Dnm (nm) ± Desvio padrão	IPD ± Desvio padrão
F14	262,7 ± 60,20	0,44 ± 0,01
F15	89,29 ± 2,57	0,33 ± 0,05
F16	90,06 ± 0,99	0,28 ± 0,02
F17	102,20 ± 1,47	0,35 ± 0,05
F18	87,54 ± 0,89	0,30 ± 0,02
F19	103,50 ± 1,06	0,26 ± 0,01
F20	88,24 ± 0,13	0,27 ± 0,01
F21	96,83 ± 0,77	0,28 ± 0,01
F22	120,3 ± 0,36	0,23 ± 0,01
F23	135,2 ± 1,24	0,19 ± 0,01
F24	140,5 ± 1,00	0,19 ± 0,01
F25	119,3 ± 1,11	0,20 ± 0,01
F26	115,3 ± 1,62	0,18 ± 0,01
F27	98,61 ± 0,51	0,20 ± 0,01

As formulações F28, F29, F30, F31, F32 e F33, acrescidas do tensoativo, BC, apresentaram, após 24 horas de preparo, uma diminuição nos valores de Dnm (Figura 7) em relação às formulações anteriores sem o BC (F16 ao F21, Tabela 7), uma vez que F28, F29, F30, F31, F32 e F33 atingiram valores de Dnm entre 49 nm e 83 nm, estando, portanto, de acordo com os relatos da literatura que revelam o uso de mais de um tensoativo produz um filme na interface, garantindo aos CLNs uma cobertura mais eficiente em sua superfície (SEVERINO et al.; 2011).

Considerando que essas formulações apresentaram um menor diâmetro de partícula e homogeneidade da dispersão, decidiu-se verificar os valores de Dnm e de IPD em função do tempo de armazenamento (Figuras 7 e 8).

Entre os tempos de 24 horas e 30 dias de armazenamento, as formulações constituídas de OR 40 OE e acrescidas de BC apresentaram um aumento de Dnm de no máximo 25 nm. A formulação F28 sofreu ao decorrer dos 30 dias de armazenamento, um aumento de Dnm de aproximadamente 33 nm, enquanto as formulações F29 e F30, praticamente não exibiram alterações nos valores de Dnm nos mesmos períodos (Figura 7). As formulações F31, F32 e F33 apresentaram um aumento de Dnm de aproximadamente 12 nm ao longo dos 30 dias de armazenamento.

As formulações F28, F29, F30, F31, F32 e F33 apresentaram IPD entre 0,2 e 0,4 no decorrer dos 30 dias de armazenamento (Figura 8), demonstrando que as formulações constituídas de OR 40 OE e das misturas de tensoativos P-407 e BC, apresentaram menor polidispersidade das partículas (KRAUSE et al., 2010).

Figura 7. Média e desvio padrão de Dnm das formulações contendo OR 40 OE e OR, nos tempos 1, 15 e 30 dias de armazenamento.

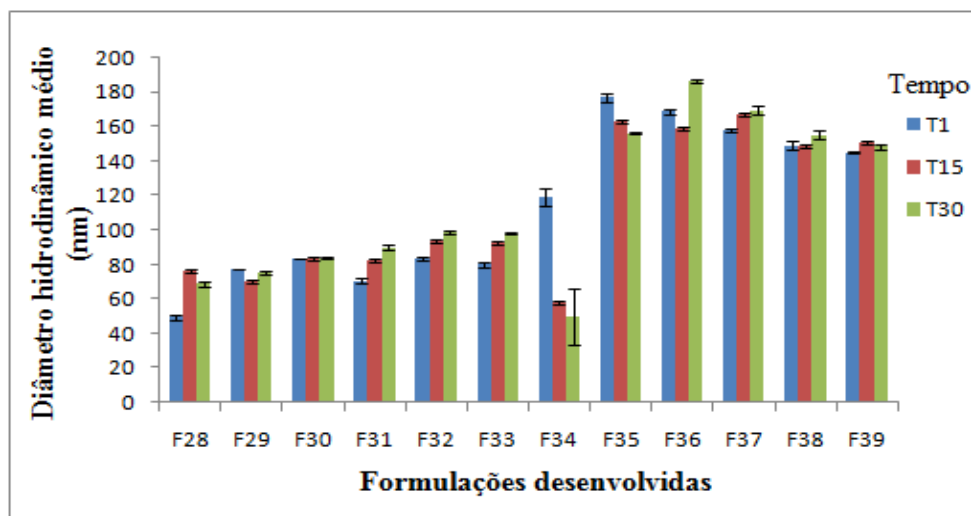
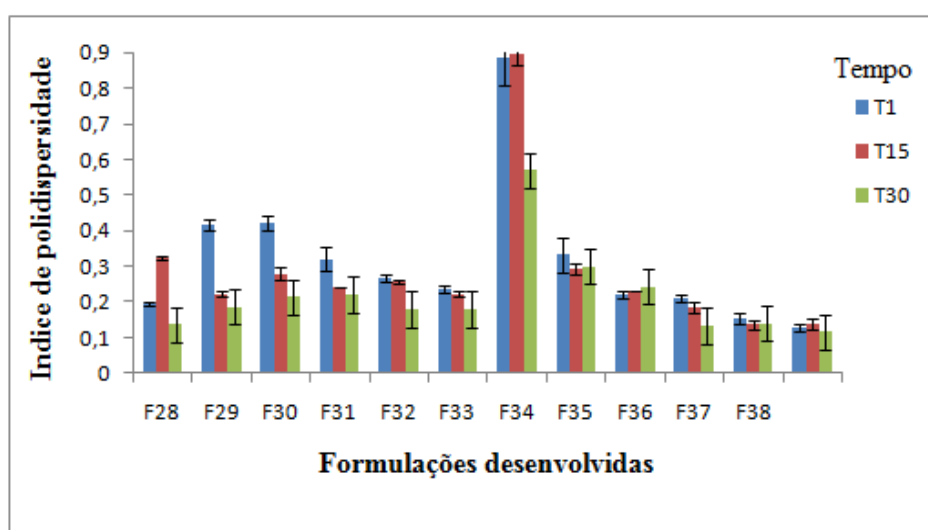


Figura 8. Média e desvio padrão de IPD das formulações contendo OR 40 OE e OR, no período de 1, 15 e 30 dias de armazenamento.



As formulações F34, F35, F36, F37, F38 e F39 apresentaram durante os 30 dias de armazenamento um aumento de Dnm de no máximo 22 nm. Dentre elas, F34 e a F35 apresentaram uma diminuição dos valores de Dnm entre os períodos de 24 horas e 30 dias de armazenamento, entre 50 nm e 20 nm, respectivamente; enquanto as formulações F38 e F39 praticamente não apresentaram alterações nos valores de Dnm no mesmo período (Figura 9).

Em relação ao IPD, praticamente todas as formulações constituídas de OR apresentaram IPD próximos a 0,2, com exceção de F34 que apresentou IPD elevado em todos os tempos, atingindo aproximadamente 0,8 (Figura 9). Portanto, as formulações contendo OR revelaram distribuição de tamanho de partículas homogêneas, com exceção da F34, que

devido ao elevado IPD, provavelmente apresentou aglomerados na dispersão (KRAUSE et al., 2010).

De acordo com estudos encontrados na literatura, tensoativos são adjuvantes que atuam sobre a tensão superficial de líquidos imiscíveis, facilitando a obtenção e a estabilização do sistema (MARCATO, 2009; MANIASSO, 2001).

Observou-se que as formulações constituídas por OR 40 OE ou por OR, as quais continham apenas o tensoativo P-407 ou a mistura de tensoativos, P-407 e BC, foram influenciadas pelas concentrações de P-407 bem como pela presença de BC nas formulações.

Os resultados de Dnm e de IPD discutidos mostraram claramente que as formulações que apresentaram elevadas concentrações de P-407 sofreram uma redução de Dnm, além de terem sido favorecidas quanto ao IPD, uma vez que na maioria dos casos os valores de IPD permaneceram próximos a 0,2, revelando, portanto, formulações com partículas monodispersas, garantindo assim, a estabilidade física das formulações.

Das et al (2011) revelou em seu estudo que formulações obtidas com maiores concentrações de tensoativos apresentaram menores valores de Dnm e IPD reduzidos.

Este fato pode ocorrer devido o uso de mais de um tensoativo na formulação, em que provavelmente leva a formação de micelas esféricas que podem se inserir na superfície dos CLNs formando um filme na interface, garantindo uma cobertura mais eficiente em sua superfície e assim, impedindo a aglomeração dos CLNs (SEVERINO et al., 2011).

Os dados descritos na literatura corroboram com os resultados de Dnm e de IPD analisadas durante os 30 dias de armazenamento, apresentados principalmente pelas formulações F32 e F38, sendo estas as formulações que apresentaram menores valores de Dnm e de IPD. Além disso, F32 e F38 não apresentaram modificações organolépticas durante os 30 dias de armazenamento, podendo observar neste período de tempo que os aspectos físicos, tais como homogeneidade e translucidez, foram mantidos.

Portanto, F32 e F38 foram as formulações que mais se mostraram adequadas para dar sequência ao trabalho, sendo selecionadas para a incorporação dos complexos de cobre(II) $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$; $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, denominados de C1, C2 e C3, respectivamente (seção 3.2.4).

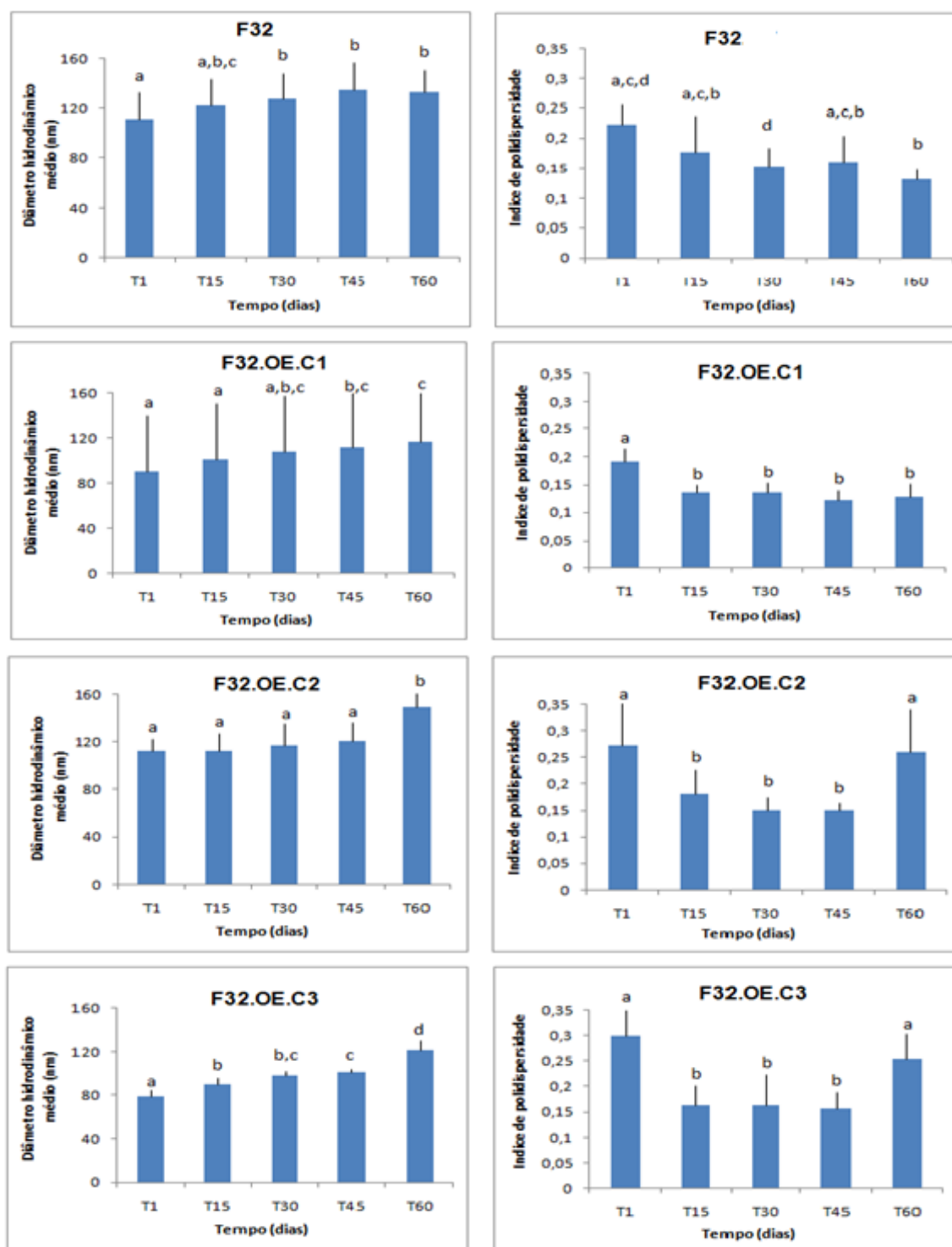
Após a incorporação dos complexos de cobre(II) nos CLNs, F32 e F38 passaram a ser denominados de F32.OE.C1, F32.OE.C2 e F32.OE.C3, e de F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3, respectivamente.

Apenas estas formulações foram avaliadas quanto à estabilidade física por um período de 60 dias. Para isso, empregou-se o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do Dnm das

partículas e do IPD das formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3 (Figura 9) e das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3 (Figura 10). As mesmas também foram analisadas quanto ao PZ durante 60 dias (Figura 11, seção 4.3.2).

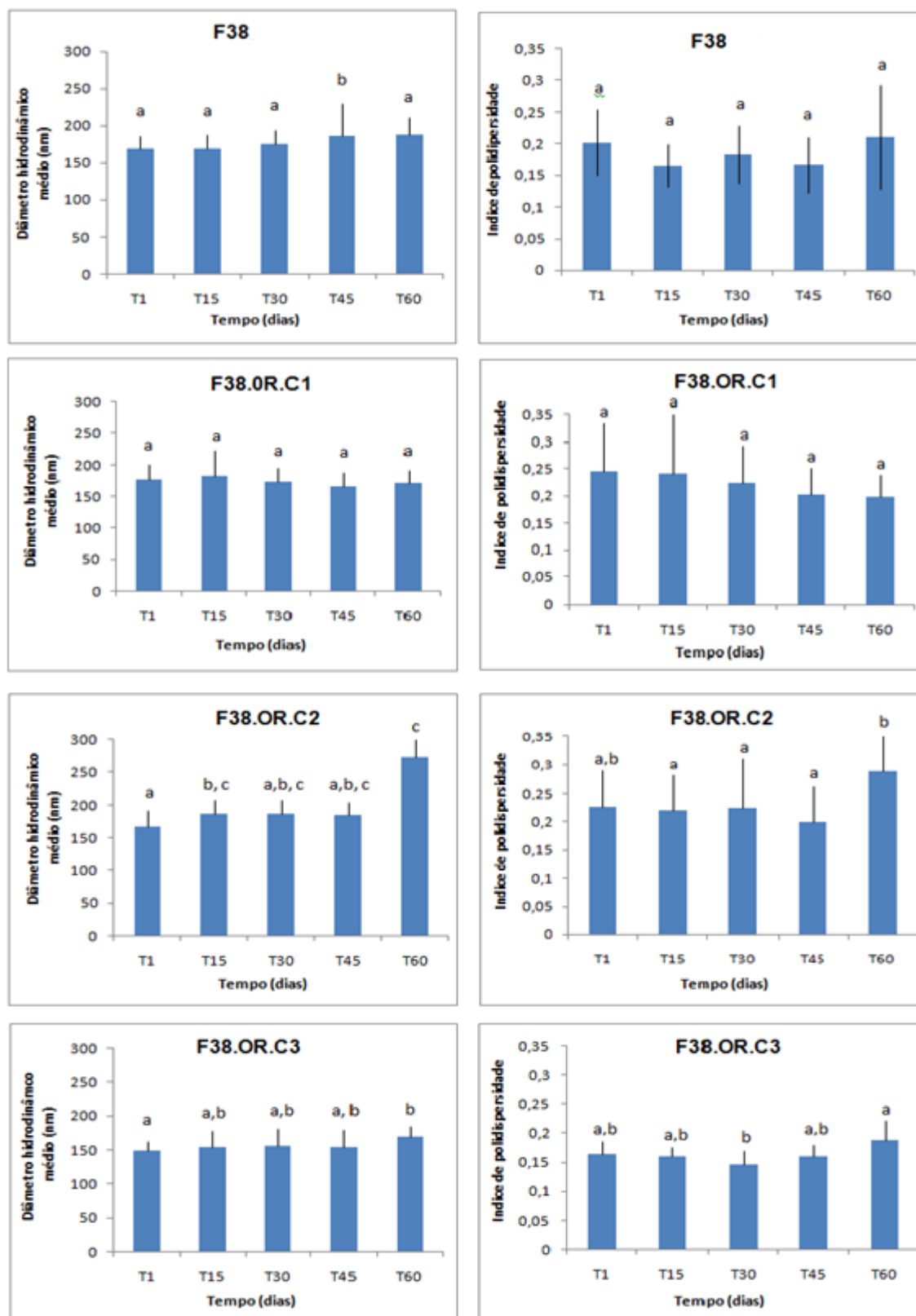
Os resultados do Dnm e de IPD foram analisados quanto ao grau de normalidade de modo que os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey, ou por análise de variância (ANOVA), seguida por Friedman ANOVA e concordância de Kendall. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Figura 9. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do Dnm (à esquerda) e do IPD (à direita) das formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, ao longo de 60 dias.



*Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 10. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do Dnm (à esquerda) e do IPD (à direita) das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3, ao longo de 60 dias.



*Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A formulação F32 apresentou um aumento significativo de Dnm nos primeiros 15 dias de armazenamento, que foi gradual até 30 dias, apresentando-se estável ao longo dos 60 dias. Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio foram de 111,27 nm a 134,25 nm, durante 60 dias de armazenamento. F32 apresentou uma redução significativa em relação ao IPD já nos primeiros 15 dias de armazenamento, a qual foi mantida estável ao longo dos 60 dias. Durante este período, os valores médios de IPD foram de 0,13 a 0,22, comprovando ser uma formulação com partículas monodispersas, provavelmente sem aglomerados na dispersão.

Com a incorporação do complexo C1 ao CLN, F32.OE.C1 sofreu um aumento significativo de Dnm em 30 dias de armazenamento, o qual se manteve estável até 60 dias de armazenamento. Durante esse período, o valor de Dnm apresentado foi de 90,27 nm a 116,46 nm. F32.OE.C1 apresentou uma redução significativa em relação ao IPD nos primeiros 15 dias e se manteve estável ao longo dos 60 dias, atingindo durante este período valores médios de IPD de 0,19 a 0,23, revelando ser uma formulação com partículas monodispersas.

A incorporação do complexo C2 ao CLN demonstrou estabilidade em relação ao Dnm de F32.OE.C2 até 45 dias de armazenamento, sofrendo após este período um aumento significativo de Dnm até 60 dias. F32.OE.C2 apresentou valores de Dnm de 112,4 nm a 149,3 nm. A partir dos primeiros 15 dias de armazenamento, F32.OE.C2 sofreu uma diminuição significativa de IPD que se manteve estável até 45 dias, sofrendo um novo aumento estatisticamente significativo no tempo de 60 dias de armazenamento. Apesar destas alterações, os valores de IPD se mantiveram próximos a 0,2 ao longo dos 60 dias de armazenamento, apresentando valores médios de IPD de 0,15 a 0,27, revelando, portanto, presença de partículas homogêneas, provavelmente sem aglomerados de partículas na formulação.

A incorporação do complexo C3 ao CLN promoveu um aumento significativo em relação ao Dnm de F32.OE.C3 já nos primeiros 15 dias, o qual foi gradual até 60 dias de armazenamento. Para esta formulação, os valores de Dnm foram de 78,65 nm a 122,00 nm, durante 60 dias de armazenamento. A partir dos 15 primeiros dias de armazenamento, F32.OE.C3 apresentou uma diminuição significativa de IPD, que permaneceu estável até 45 dias, tendo a partir deste período um novo aumento significativo de IPD, semelhante ao tempo inicial. Os valores de IPD obtidos foram de 0,15 a 0,30 ao longo dos 60 dias de armazenamento, revelando presença de partículas homogêneas.

A formulação F38 apresentou estabilidade em relação ao Dnm até 30 dias de armazenamento, sofrendo um aumento significativo de Dnm aos 45 dias e mantendo-se estável até 60 dias. Os valores de Dnm foram de 169,48 nm a 187,37 nm, ao longo dos 60

dias. F38 não apresentou alterações significativas de IPD ao longo dos 60 dias. Os valores de IPD obtidos foram de 0,16 a 0,21 durante 60 dias de armazenamento, revelando presença de partículas homogêneas.

A incorporação do complexo C1 ao CLN demonstrou ampla distribuição de Dnm para F38.OR.C1, uma vez que não sofreu alterações significativas de Dnm no decorrer dos 60 dias de armazenamento. Os valores de Dnm de F38.OR.C1 foram de 166,25 nm a 181,74 nm, durante este mesmo período. Assim como na distribuição de Dnm, F38.OR.C1 não apresentou alterações significativas de IPD durante 60 dias. Neste período, os valores médios de IPD foram de 0,19 a 0,24, exibindo ser uma formulação de partículas monodispersas.

Com a incorporação do complexo C2 ao CLN, F38.OR.C2 revelou um aumento significativo de Dnm nos primeiros 15 dias de armazenamento, o qual se manteve estável ao longo dos 45 dias, sofrendo a partir deste período um aumento significativo até 60 dias de armazenamento. Os valores de Dnm apresentados por F38.OR.C2 foram de 167,18 nm a 273,25 nm durante os 60 dias de armazenamento. Tal formulação apresentou estabilidade em relação ao IPD até 45 dias de armazenamento, sofrendo um aumento significativo de IPD durante aos 60 dias. Os valores médios de IPD permaneceram próximos a 0,2 durante todo este período, a saber, 0,20 a 0,28, revelando homogeneidade da formulação.

A incorporação do complexo C3 ao CLN demonstrou ampla distribuição no Dnm de F38.OR.C3 durante 45 dias de armazenamento, se mantendo estável até 60 dias. Os valores de Dnm de F38.OR.C3 foram de 148,71 nm a 170,27 nm. Assim como no Dnm, F38.OR.C3 apresentou estabilidade em relação ao IPD durante os 60 dias de armazenamento. Ao longo dos 60 dias, os valores médios de IPD foram de 0,14 a 0,19, revelando presença de partículas monodispersas.

4.3.2 Análise de potencial zeta(PZ)

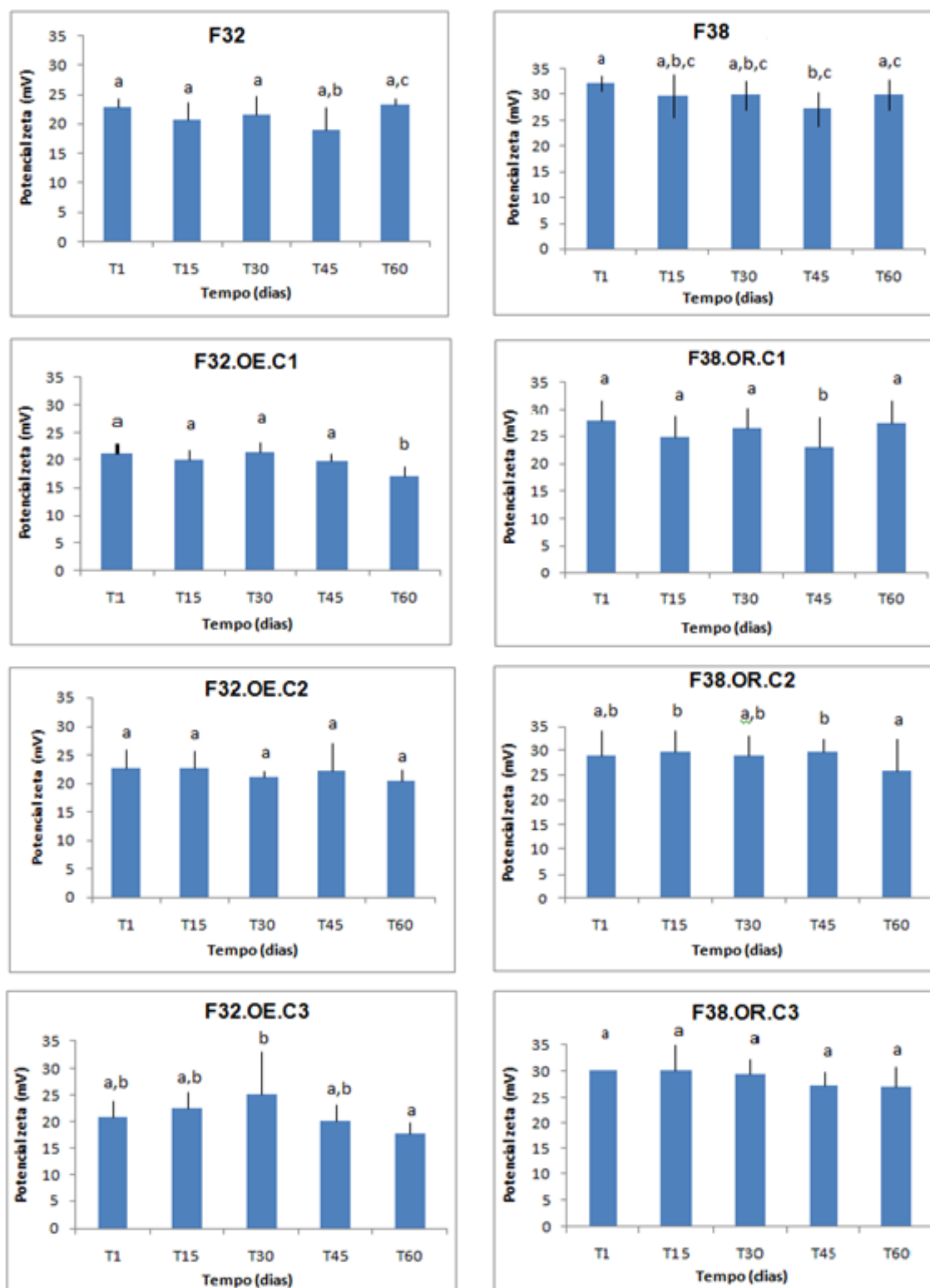
O PZ indica as cargas elétricas entre a superfície da partícula e o meio específico, estando diretamente envolvido na estabilidade física das partículas (OBEIDAT et al., 2010). Valores de PZ próximos a ± 30 mV revelam uma excelente repulsão eletrostática, ou seja, uma maior estabilidade física das partículas. Contudo, menores valores de PZ tendem a comprometer a estabilidade física das partículas, podendo resultar em desestabilização das formulações, exibindo assim, a presença de aglomerados na dispersão (SAUPE et al., 2006).

Conforme descrito acima (seção 4.3.1), apenas as formulações selecionadas foram analisadas quanto ao PZ, assim, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3, F38, F38.OR.C1,

F38.OR.C2, e F38.OR.C3, foram avaliadas estatisticamente, em que os resultados de PZ foram tratados pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

A Figura 11 mostra os resultados de PZ obtidos para as formulações contendo OE 40 OE (à esquerda) e OR (à direita) sendo, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3, e F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, respectivamente, analisadas durante 60 dias de armazenamento.

Figura 11. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%) do PZ das formulações: F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3 (a esquerda), e de F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3 (a direita), ao longo de 60 dias.



*Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A formulação F32 apresentou uma diminuição significativa de PZ após 45 dias de armazenamento, sofrendo um aumento significativo de PZ após 60 dias. F32 obteve valores médios de PZ de 18,87 mV a 23,25 mV.

Na formulação F32.OE.C1 a incorporação do complexo C1 ao CLN não apresentou mudanças significativas de PZ até 45 dias de armazenamento, mostrando uma redução significativa de PZ apenas em 60 dias de armazenamento. Os valores médios de PZ foram de 17,03 mV a 21,42 mV.

Com a incorporação do complexo C2 ao CLN, F32.OE.C2 não demonstrou alterações significativas de PZ durante os 60 dias de armazenamento, apresentando valores médios de PZ de 20,51 mV a 22,60 mV.

A incorporação do complexo C3 ao CLN apresentou um aumento significativo de PZ para F32.OE.C3 em 30 dias de armazenamento, diminuindo gradualmente até 60 dias de armazenamento. Os valores médios de PZ de F32.OE.C3 foram de 17,80 mV a 25,25 mV, durante os 60 dias de armazenamento.

A formulação F38 apresentou uma diminuição significativa de PZ já nos primeiros 15 dias de armazenamento, que se manteve estável ao longo de 45 dias de armazenamento, tendo a partir deste período, um aumento significativo de PZ, semelhante ao tempo inicial. Os valores médios de PZ apresentados ao longo de 60 dias de armazenamento foram de 27,33 mV a 32,18 mV.

Com a incorporação do complexo C1 ao CLN, F38.OR.C1 apresentou uma diminuição significativa de PZ em 45 dias de armazenamento, sofrendo um aumento significativo de PZ aos 60 dias. Os valores médios de PZ apresentados durante 60 dias de armazenamento foram de 23,08 mV a 27,91 mV.

Com a incorporação do complexo C2 ao CLN, F38.OR.C2 apresentou estabilidade em relação ao PZ até 45 dias de armazenamento, tendo uma diminuição significativa de PZ apenas em 60 dias de armazenamento. Durante este período, os valores médios de PZ apresentados por F38.OR.C2 foram de 25,88 mV a 29,67 mV.

Com a incorporação do complexo C3 ao CLN, F38.OR.C3 não apresentou alterações significativas de PZ ao longo dos 60 dias de armazenamento, revelando excelente estabilidade física ao longo do tempo. Os valores médios de PZ foram de 27,16 mV a 30,36 mV.

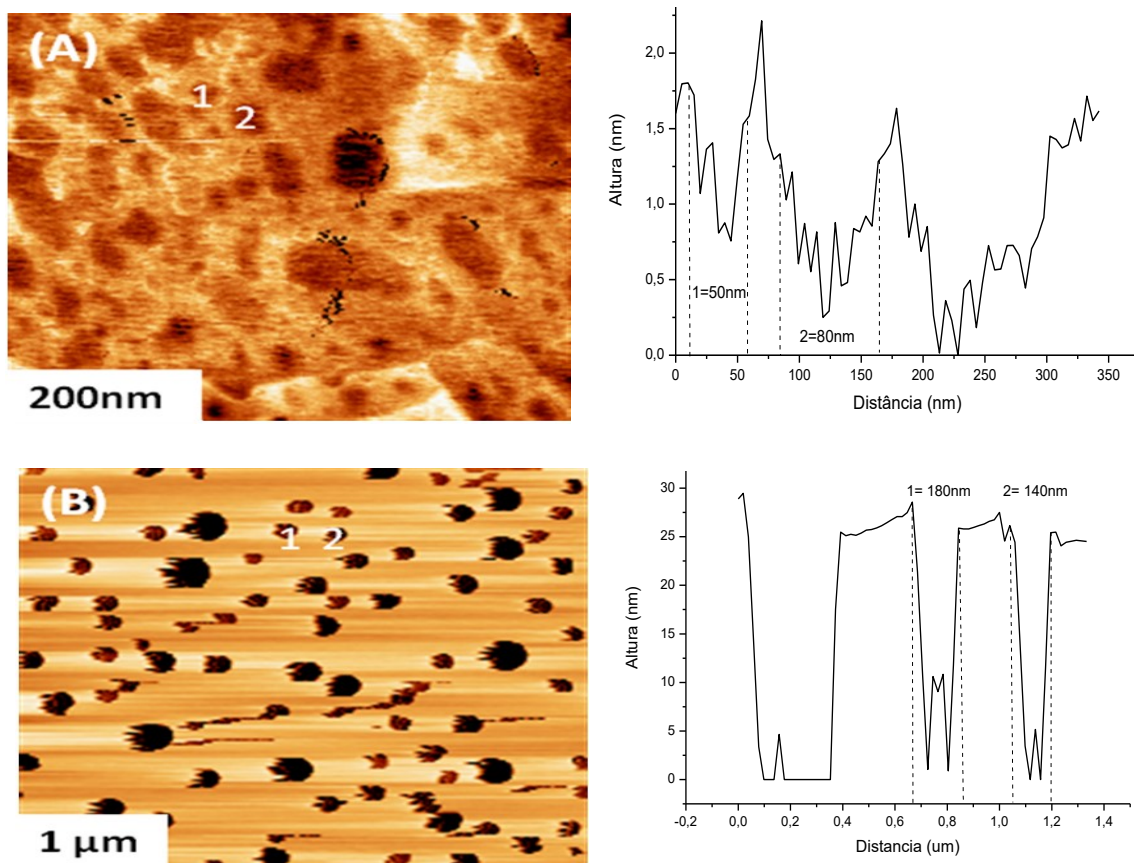
Os valores de PZ apresentados ficaram em aproximadamente + 30 mV, sendo este o PZ requerido para boa estabilidade física do sistema (DAS et al., 2011; FREITAS, MULLER, 1998). Deste modo, pode-se dizer que as formulações possuem uma boa estabilidade física ao longo dos 60 dias, ocasionada por interações eletrostáticas entre a superfície das partículas e o

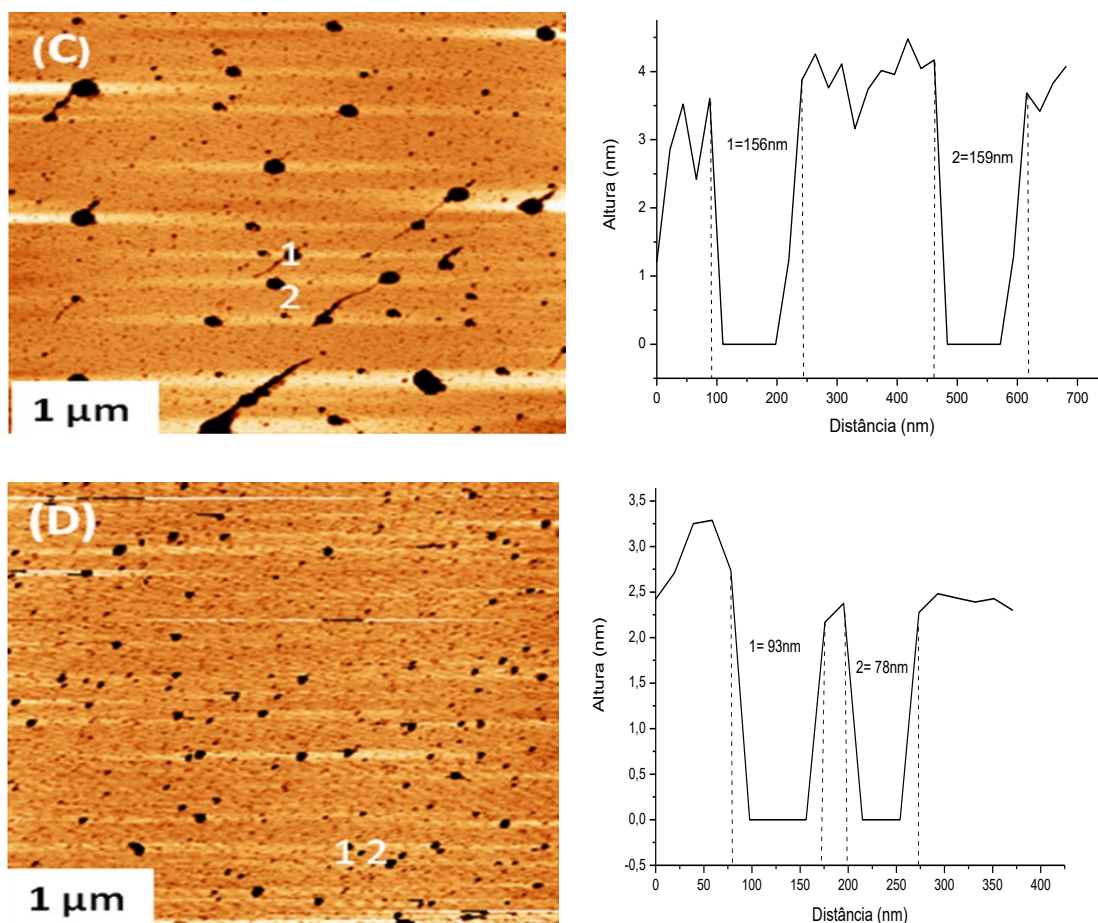
meio, devido à adição de um tensoativo catiônico (OBEIDAT et al., 2010; SAUPE et al., 2006).

4.3.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A microscopia de força atômica (MFA) foi utilizada para analisar a morfologia e a rugosidade dos CLNs. A Figura 12 representa as fotomicrografias bidimensionais das formulações contendo OR 40 OE, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, denominadas de A, B, C e D, respectivamente.

Figura 12. Imagens das fotomicrografias bidimensionais das formulações: (A) F32, (B) F32.OE.C1, (C) F32.OE.C2 e (D) F32.OE.C3.





A partir destas imagens (Figura 12) podemos observar que as formulações A, B, C e D apresentaram uma morfologia esférica de diferentes diâmetros, mas todos em escalas nanométricas, podendo-se ressaltar que nenhuma formulação revelou a presença de aglomerados.

Na imagem de A (F32) foi possível observar esferas com diâmetros de aproximadamente 50 nm e 80 nm, enquanto as imagens de B, C e D (F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, respectivamente) em que os complexos de cobre(II) foram incorporados nos CLNs, apresentaram esferas com diâmetros de aproximadamente 140 nm e 180 nm; 156 nm e 159 nm; e 78 nm e 93nm, respectivamente, de modo que A apresentou um diâmetro menor que o encontrado na análise de Dnm, enquanto B, C e D apresentaram diâmetros aproximados.

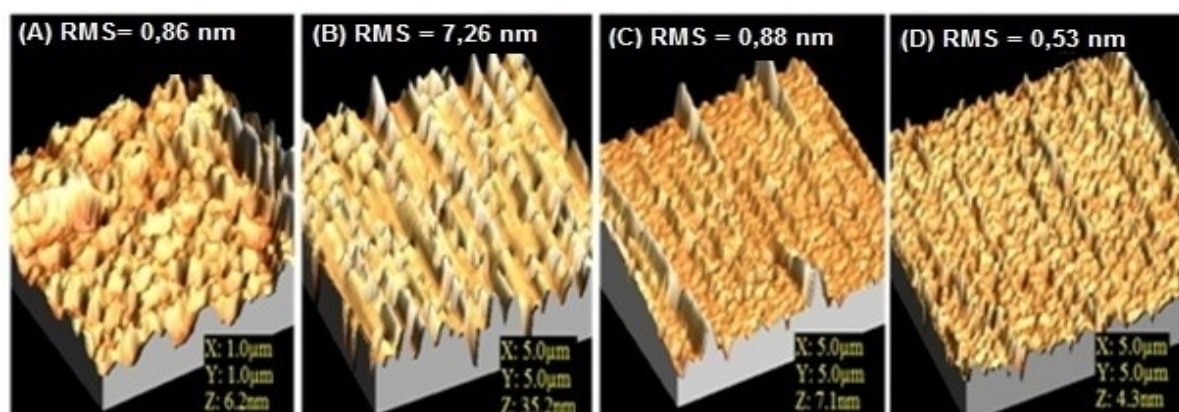
Assim, perante estes resultados pode-se sugerir que o método de sonicação utilizado para o desenvolvimento dos CLNs foi eficiente, uma vez que as partículas obtidas apresentaram morfologia esférica e distribuição nanométrica; além disso, pode-se dizer que os complexos C1, C2 e C3 possivelmente foram incorporados nos CLNs, uma vez que, foi

observado um aumento de diâmetro de partícula nas formulações em que os complexos foram adicionados.

Além da morfologia das partículas, a MFA permite identificar outro parâmetro, conhecido como rugosidade, que é um conjunto de imperfeições e irregularidades que possui a superfície do material, podendo através deste determinar características como aderência, área superficial, entre outros; essas medidas se dão pelo valor da rugosidade média (RMS).

A Figura 13 apresenta as fotomicrografias tridimensionais dos CLNs constituídos de OR 40 OE (Figura 12), revelando os respectivos valores de RMS dos CLNs.

Figura 13. Imagens de fotomicrografias tridimensionais das formulações contendo OR 40 OE: (A) F32, (B) F32.OE.C1, (C) F32.OE.C2 e (D) F32.OE.C3.

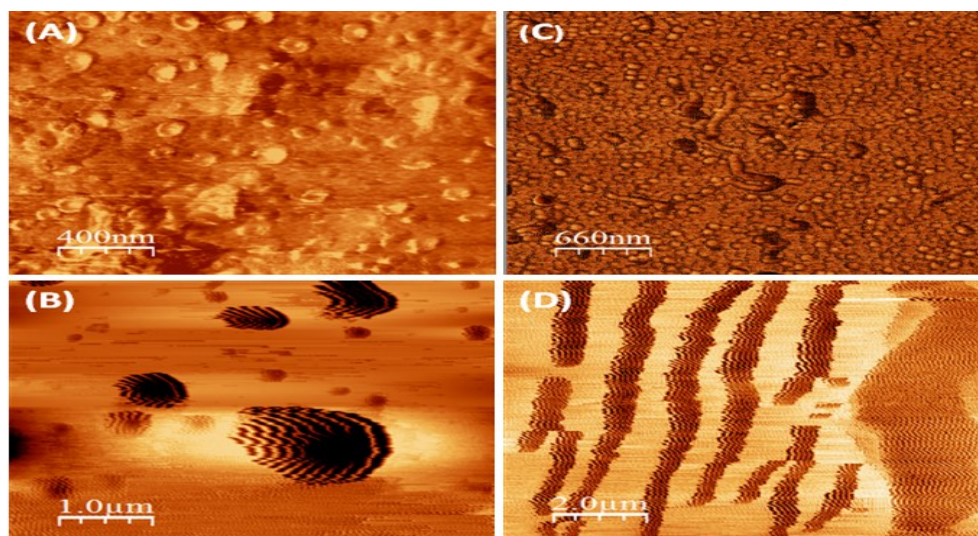


Analisando as imagens da Figura 13, pode-se dizer que todas as formulações apresentaram baixos valores de RMS, sendo que, a formulação B apresentou o maior valor de RMS=7,26 nm. Isto revela que este material possui uma maior área superficial, o que poderia favorecer uma melhor ligação dos CLNs com a micobactéria.

Analisando todos os resultados de RMS pode-se sugerir que todas as formulações contendo OR 40 OE apresentaram partículas homogêneas, provavelmente sem aglomerados na dispersão devido ao baixo valor médio de rugosidade.

A Figura 14 mostra as fotomicrografias bidimensionais das formulações contendo OR, F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3, identificadas de A, B, C e D, respectivamente.

Figura 14. Imagens das fotomicrografias bidimensionais das formulações: (A) F38, (B) F38.OR.C1, (C) F38.OR.C2 e (D) F38.OR.C3.



Nas imagens da Figura 14, as formulações A, B, C, e D apresentaram uma morfologia esférica, porém, observou-se com nitidez que todas as formulações revelaram presença de aglomerados, que pode ter ocorrido devido o processo de secagem utilizado no preparo das amostras para a análise da MFA (DUBES et al., 2003). Possivelmente o processo de secagem ocasionou o arraste das partículas, formando conseqüentemente aglomerados.

Sendo assim, a presença de aglomerados alterou a morfologia das partículas, modificando o tamanho das esferas, e assim, ocasionando um aumento na rugosidade, por isso, os resultados de tamanho de partículas e de rugosidade não foram calculados, uma vez que não seriam confiáveis.

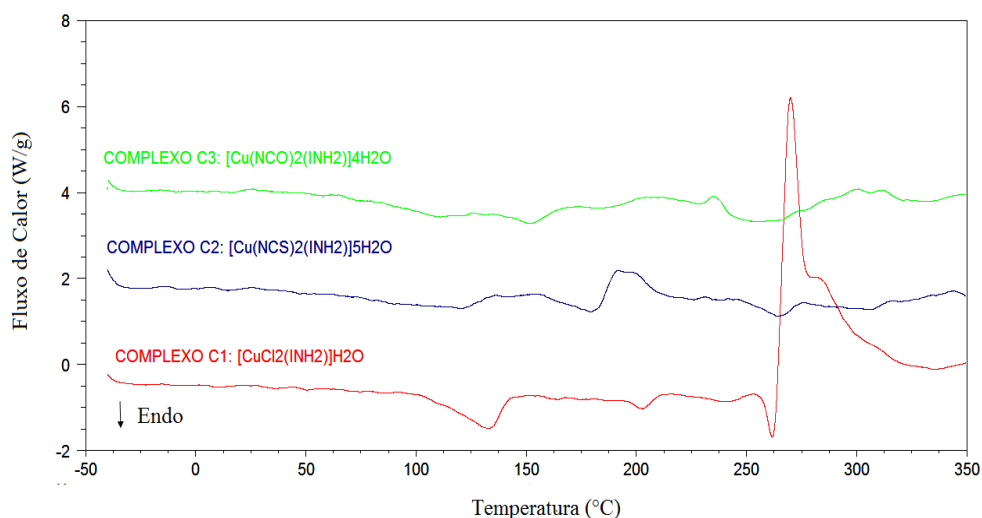
4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de DSC permite analisar fenômenos energéticos como alterações físicas ou químicas dos sistemas. Assim, através do aquecimento ou do resfriamento dos sistemas, adquirem-se informações qualitativas e quantitativas das alterações físicas e químicas envolvendo variações da entalpia, processos endotérmicos e exotérmicos (WENDLANDT, 1974).

Deste modo, a técnica de DSC foi utilizada para determinar as transições térmicas e as possíveis diferenças estruturais entre as formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, F32.OE.C3, F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3. Para todas as formulações os eventos endotérmicos indicam a temperatura de fusão.

A Figura 15 mostra as curvas de DSC dos complexos de cobre(II): $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, identificados como C1, C2 e C3, respectivamente.

Figura 15. Imagens das curvas de DSC dos complexos C1, C2 e C3, isolados.

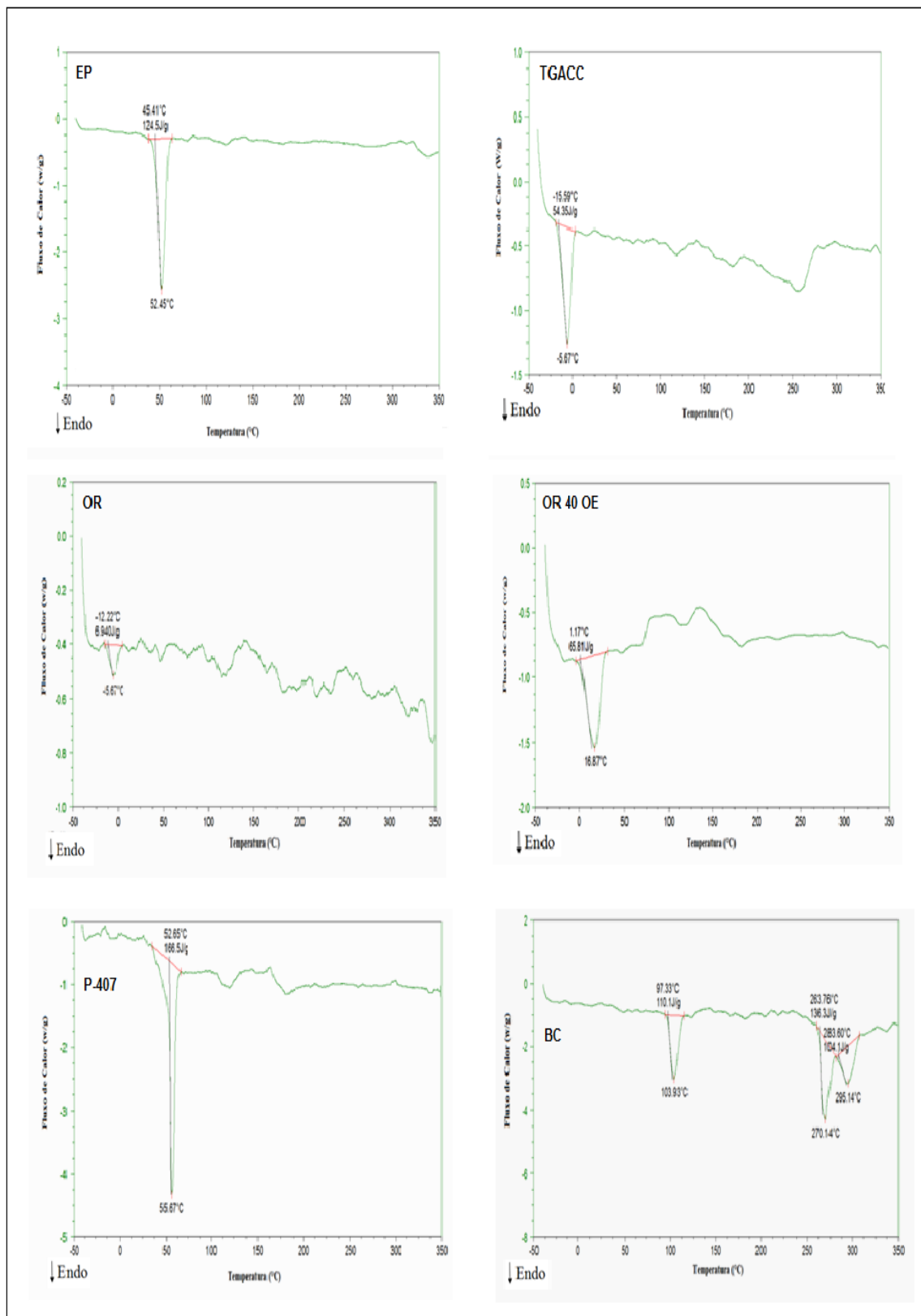


Os complexos C1, C2, C3 não apresentaram picos de fusão, sugerindo que estes complexos estão no seu estado amorfo.

Segundo a Farmacopéia Brasileira 4.ed. (2000), a INH presente nos complexos de cobre(II) apresenta ponto de fusão de 170 a 173°C, entretanto analisando-se os gráficos, nota-se a ausência deste pico, revelando que possivelmente a INH esteja inserida nos complexos de cobre(II).

A Figura 16 exemplifica as curvas de DSC dos componentes utilizados para o desenvolvimento dos CLNs: EP, TGACC, OR, OR 40 OE, P-407 e BC.

Figura 16. Imagens das curvas de DSC dos componentes utilizados para o desenvolvimento dos CLNs: EP, TGACC, OR, OR 40 OE, P-407 e BC.



A Tabela 8 exibe os valores de temperaturas de fusão dos componentes, os quais foram analisados individualmente.

Tabela 8. Valores de temperaturas de fusão dos componentes: EP, TGACC, OR, OR 40 OE, P-407 e BC, analisados individualmente.

Amostras	T _{PICO} (°C)
EP	52,45
TGACC	-5,67
OR	-5,67
OR40 OR	16,87
P-407	55,67
BC	103,93

A curva de DSC de EP mostrou uma temperatura de fusão em 52,45 °C, que está condizente com os valores encontrados na literatura, os quais descrevem a presença deste evento de fusão próximo de 38°C (ROWE et al.; 2006) e 54°C (RIGON, 2013). Esta variação de temperatura de fusão pode ocorrer devido à possibilidade de rearranjo da estrutura cristalina do material que pode resultar em formas polimórficas mais estáveis ou menos estáveis, que alteram a temperatura de fusão (SILVA et al., 2008).

A curva de DSC de TGACC apresentou um evento endotérmico referente à temperatura de fusão em -5°C sendo possível observar sua degradação a partir de 100°C.

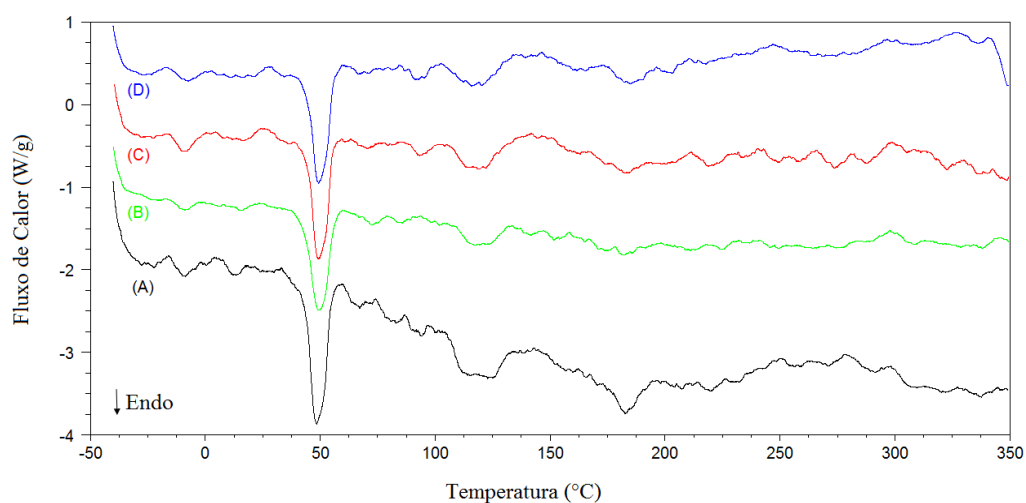
As curvas de DSC de OR e de OR 40 OE apresentaram um evento endotérmico atribuído ao ponto de fusão em -5°C e em 16°C, respectivamente, confirmando o dado apresentado na ficha de informação do produto fornecido pela empresa BASF, porém seus picos não estão definidos e não possuem muita intensidade. Além disso, as curvas de DSC de ambos os componentes lipídicos, apresentam vários eventos após 48 °C.

A curva de DSC de P-407 apresentou um pico de fusão bem definido em 55 °C, próximo ao descrito por Rigon (2013) que foi de 59 °C.

A curva de DSC do BC apresentou três picos de fusão bem definidos, o primeiro em 103,93 °C, o segundo em 270 °C e o terceiro em 295 °C. Segundo Bottom (1999) a presença de mais de um ponto de fusão pode significar o indicio de polimorfismo. Além destes eventos de fusão, BC mostrou um evento de degradação próximo a 110 °C.

A Figura 17 apresenta as curvas de DSC das formulações constituídas de OR 40 OE, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, identificadas como A, B, C, e D.

Figura 17. Curva de DSC das formulações F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2 e F32.OE.C3, denominadas de A, B, C, e D, respectivamente.



Na Tabela 9 está apresentado os valores da temperatura de fusão das formulações OR 40 OE, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, analisadas individualmente, para o pico mais definido e intenso.

Tabela 9. Valores de temperaturas de fusão das formulações, F32; F32.OE.C1; F32.OE.C2; e F32.OE.C3, analisadas individualmente.

Amostras	T _{PICO} (°C)
F32	48,57
F32.OE.C1	49,32
F32.OE.C2	49,28
F32.OE.C3	49,13

A Tabela 10 apresenta os valores de entalpia obtidos, além dos valores de entalpia esperado, calculados a partir das Figuras 16 e 17.

Tabela 10. Valores de entalpia esperado e de entalpia obtido das formulações, F32, F32.OE.C1, F32.OE.C2, e F32.OE.C3, identificadas como A, B, C, e D, respectivamente.

Amostras	A		B		C		D	
	$\Delta E_{\text{esperado}}$ (A)	$\Delta E_{\text{esperado}}$ (B,C,D)	(F32) ΔE_{obtido}	(F32.OE.C1) ΔE_{obtido}	(F32.OE.C2) ΔE_{obtido}	(F32.OE.C3) ΔE_{obtido}	(F32.OE.C3) ΔE_{obtido}	(F32.OE.C3) ΔE_{obtido}
EP	37,35	35,38	91,46	64,76	65,32	67,22		
TGACC	12,33	11,72	8,80	9,60	9,80	6,50		
OR 40 OE	6,38	6,09	5,78	2,90	8,30	9,50		
P-407	64,76	61,30	91,46	64,76	65,32	67,22		
BC	6,05	5,80	5,60	5,60	3,40	7,20		

Na análise das curvas de DSC de A (F32) foi observado um pico endotérmico referente à temperatura de fusão em 48,57 °C, este evento possui intensidade e característica bastante semelhante às temperaturas de fusão dos componentes, EP e P-407 que apresentaram temperaturas de fusão de 52 °C e 55 °C, respectivamente, portanto, este evento revela as junções entre os picos de fusão dos componentes EP e P-407. Neste caso, a entalpia obtida pela análise térmica foi de 91,46 J/g a qual se mostrou menor que a entalpia esperada, 102,11 J/g, calculada levando em consideração as junções entre os picos EP e P-407.

Observou-se um pico de temperatura de fusão de aproximadamente -5,67 °C, referente à temperatura de fusão de TGACC que foi de -5,67; para este componente a entalpia obtida foi de 8,80 J/g, mostrando-se menor que a entalpia esperada, 12,33 J/g.

Outro pico de temperatura de fusão observado foi em aproximadamente 20 °C o qual se aproxima ao pico de OR 40 OE de 16,87 °C; OR 40 OE que apresentou entalpia obtida de 5,78 J/g que foi menor que a entalpia esperada, 6,38 J/g.

Além disso, na curva de DSC de A, foi possível observar a presença de vários eventos próximos a 50 °C, semelhante aos eventos apresentados por OR 40 OE que ocorreram em 48 °C. Assim, a análise da curva de DSC de A, indica que os componentes desta formulação interagiram para a formação do sistema, uma vez que os valores de entalpia obtidos foram menores que de entalpia esperados.

Nas curvas de DSC das formulações B (F32.OE.C1), C (F32.OE.C2) e D (F32.OE.C3) em que houve a incorporação dos complexos de cobre(II) nos CLNs, observou-se com nitidez a presença de picos de temperaturas de fusão próximos de 49,32 °C em todos os casos, estes eventos se mostraram próximos as temperaturas de fusão dos componentes EP e P-407, revelando portanto, as junções entre os picos de fusão destes componentes.

As curvas de DSC de B, C e D apresentaram os mesmos valores de entalpia obtidos para os componentes EP e P-407, sendo de 64,76 J/g; 65,32 J/g; e 67,22 J/g, os quais se mostraram menor que o valor de entalpia esperada, 96,68 J/g, o qual foi calculado considerando as junções entre os picos EP e P-407.

Também foram observados picos de temperaturas de fusão próximos a -5,67 °C, relacionados às temperaturas de fusão de TGACC, -5,67, sendo assim, os valores de entalpia obtidos para B, C e D foram de 9,60 J/g; 9,80 J/g; e 6,50 J/g, respectivamente, em que se apresentaram menor que o valor de entalpia esperado, que foi 11,72 J/g.

Nas curvas de DSC de B, C e D também foram observados picos de temperaturas de fusão próximos de 20 °C semelhantes ao pico de OR 40 OE que foi de 16,87 °C; B, C e D

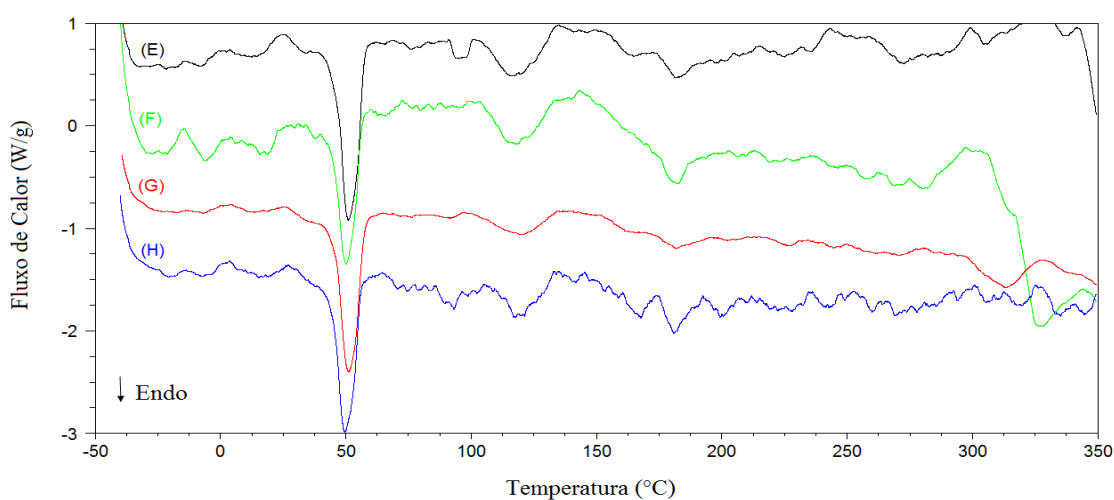
apresentaram valores de entalpia obtidos de 2,90 J/g; 8,30 J/g; e 9,50 J/g, respectivamente, de modo que B apresentou menor que a entalpia esperada, 6,09 J/g.

As curvas de DSC de B, C e D sofreram eventos próximos a 50 °C, que se assemelharam aos eventos de OR 40 OE ocorridos após 48 °C. Deste modo, as curvas de DSC de B, C e D revelaram valores de entalpia obtidos menores que os valores de entalpia esperados, concluindo-se que os componentes destas formulações possivelmente interagiram para a formação dos sistemas, indicando assim, que os complexos de cobre(II) foram incorporados nos CLNs.

Nas curvas de DSC das formulações A, B, C e D, não foi possível detectar um pico de temperatura de fusão do componente BC, que foi de 103,93 °C. Provavelmente isto aconteceu, pois, o BC foi um componente utilizado em baixa concentração nas formulações, quando comparado aos demais componentes, tais como EP e P-407 os quais tiveram seus picos de fusão observados nitidamente em todas as formulações. Além disso, as formulações A, B, C e D apresentaram alterações na linha de base após 70 °C, que possivelmente seja saída de solvente.

Na Figura 18 estão apresentadas as curvas de DSC das formulações constituídas de OR, F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2 e F38.OR.C3, identificadas como E, F, G e H, respectivamente.

Figura 18. Curvas de DSC das formulações, F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, denominadas de E, F, G e H, respectivamente.



A Tabela 11 exibe os valores de temperaturas de fusão destas formulações, enquanto a Tabela 12 mostra os valores de entalpia esperados e de entalpia obtidos, calculados a partir das Figuras 16 e 18.

Tabela 11. Valores de temperaturas de fusão das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, analisadas separadamente.

Amostras	T _{PICO} (°C)
F38	51,04
F38.OR.C1	50,22
F38.OR.C2	51,22
F38.OR.C3	49,76

Tabela 12. Valores de entalpia esperado e de entalpia obtido das formulações F38, F38.OR.C1, F38.OR.C2, e F38.OR.C3, denominadas de E, F, G e H, respectivamente.

Amostras	E		F		G		H	
	(F38)		(F38.OR.C1)		(F38.OR.C2)		(F38.OR.C3)	
	$\Delta E_{\text{esperado}}$ (E)	$\Delta E_{\text{esperado}}$ (F, G e H)	ΔE_{obtido}	ΔE_{obtido}	ΔE_{obtido}	ΔE_{obtido}	ΔE_{obtido}	ΔE_{obtido}
EP	37,35	35,38	81,52	66,25	71,69	69,10		
TGACC	12,33	11,72	4,40	2,37	12,52	3,06		
OR	0,67	0,64	4,40	2,37	12,52	3,06		
P-407	64,76	61,3	81,52	66,25	71,69	69,10		
BC	6,05	5,80	11,70	1,97	0,40	7,8		

A curva de DSC de E (F38) mostrou um pico de temperatura de fusão bastante intenso de 51,04 °C, semelhante às temperaturas de fusão dos componentes, EP e P-407 que se apresentaram em 52 °C e 55 °C, respectivamente, caracterizando, portanto, as junções entre os picos de fusão destes componentes. Neste caso, a entalpia obtida pela análise térmica foi de 81,52 J/g que se mostrou menor que a entalpia esperada, 102,11 J/g, calculada considerando as junções entre os picos EP e P-407.

Também foi observado um pico de temperatura de fusão de aproximadamente -5 °C, o qual se identifica com os picos de temperaturas de fusão dos componentes TGACC e OR, já que ambos apresentaram picos de fusão de -5,67 °C, observando-se com clareza as junções entre os picos de fusão de TGACC e OR. Para estes componentes os valores de entalpia obtidos foram de 4,40 J/g mostrando-se menores que a entalpia esperada, 13,00 J/g, o qual também foi calculado considerando as junções entre os picos TGACC e OR.

A curva de DSC de E (F38.OR.C1) revelou a presença de vários eventos próximos a 50 °C semelhante aos eventos apresentados por OR que ocorreram após 48 °C. Portanto, na

análise da curva de DSC de E, os valores de entalpia obtidos foram menores que os valores de entalpia esperados, concluindo-se que provavelmente os componentes desta formulação interagiram para a formação do sistema.

Nas curvas de DSC de F (F38.OR.C2), G (F38.OR.C2) e H (F38.OR.C3), em que houve a incorporação dos complexos de cobre(II) nos CLNs, observou-se com clareza em todas estas formulações, a presença de picos de temperaturas de fusão próximos de 49 °C, a saber, 50,22 °C; 51,22 °C; e 49,76 °C, respectivamente, revelando portanto, as junções entre os picos de fusão dos componentes EP e P-407, que apresentaram picos de fusão de 52 °C e 55 °C, respectivamente.

Comparando as curvas de DSC de E com as curvas de F, G e H, notou-se que incorporação dos complexos de cobre(II) nos CLNs ocasionou redução dos valores de entalpia obtidos, assim, F, G e H apresentaram os mesmos valores de entalpia obtidos para os componentes EP e P-407, sendo 66,25 J/g; 71,69 J/g; e 69,10 J/g, respectivamente, tais valores de entalpia obtidos mostraram-se menores que os valores de entalpia esperados, 96,68 J/g, que foram calculados considerando as junções entre os picos EP e P-407.

Também foram observados picos de temperaturas de fusão próximos a -5,67 °C, relacionados às temperaturas de fusão dos componentes TGACC e OR, já que ambos apresentaram picos de fusão de -5,67 °C, deste modo, as formulações F, E, e H apresentaram para TGACC e OR, valores de entalpia obtidos de 2,37 J/g; 12,52 J/g; e 3,06 J/g, respectivamente, os quais se apresentaram menor que o valor de entalpia esperado, que foi 12,36 J/g, com exceção da formulação G que se apresentou um pouco maior.

As curvas de DSC de F, G, e H apresentaram eventos próximos a 50 °C, que se assemelharam aos eventos de OR ocasionados após 48 °C. Deste modo, as curvas de DSC de F, E, e H revelaram valores de entalpia obtidos menores que os valores de entalpia esperados, além de picos de fusão não tão definidos para os complexos de cobre(II) isolados, indicando portanto, que tais comportamentos ocorreram devido grande parte dos complexos de cobre(II) estarem na sua forma amorfa interagindo para a formação dos sistemas, indicando portanto, que os complexos de cobre(II) foram incorporados nos CLNs.

Nas formulações E, F, G e H, foram observados picos de fusão do componente BC na região de 103,93 °C, porém de modo não muito definido como apresentados na amostra isoladas, reforçando a hipótese que componentes utilizados em maiores concentrações nas formulações, bem como EP e P-407 possivelmente ocasionaram picos de temperaturas de fusão mais intensos e definidos que o BC, utilizado em baixa concentração na formulação.

4.4 Ensaios biológicos *in vitro*

4.4.1 Determinação da CIM dos compostos utilizando a técnica *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA) frente ao MTB H₃₇Rv, da citotoxicidade (IC₅₀) frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) em 24 h e o índice de seletividade (IS)

Os resultados da CIM dos complexos C1, C2 e C3 em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38, frente ao MTB H₃₇Rv, da citotoxicidade (IC₅₀) frente à linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e MRC-5 (ATCC-CCL-171) e o índice de seletividade (IS), estão sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados da CIM contra o MTB H₃₇Rv, da citotoxicidade (IC₅₀) sobre as linhagens celulares J774.A1 e MRC-5 e o valor do IS da razão entre esses dois resultados dos complexos C1, C2 e C3 em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38.

Complexos	Rema (µg/mL)	IC ₅₀ J774.A1 (µg/mL)	IS	Rema (µg/mL)	IC ₅₀ MRC-5 (µg/mL)	IS
C1	37,07	80,11	2,11	37,07	76,80	2,072
C2	36,52	75,36	2,063	36,52	51,90	1,421
C3	38,47	184,04	4,783	38,47	132,05	3,432
F32	2,470	< 0,490	0,1983	2,470	< 0,240	0,0972
F32.OE.C1	1,870	< 0,490	0,2620	1,870	< 0,240	0,1283
F32.OE.C2	2,310	< 0,490	2,310	2,310	< 0,240	0,1039
F32.OE.C3	1,960	< 0,490	0,250	1,960	< 0,240	0,1224
F38	5,110	< 0,490	0,0959	5,110	< 0,240	0,0469
F38.OR.C1	1,750	< 0,490	0,280	1,750	< 0,240	0,1371
F38.OR.C2	2,560	< 0,490	0,1914	2,560	< 0,240	0,0937
F38.OR.C3	3,180	< 0,490	0,1540	3,180	< 0,240	0,0754
Rifampicina	0,43	-	-	0,43	-	-
Doxorrubicina	-	1,7x10 ⁻³	-	-	6,5x10 ⁻³	-

Analisando a Tabela 13, pode-se observar que os compostos C1, C2 e C3, quando solubilizados em DMSO, apresentaram valores de CIM no intervalo de 37,07 - 38,47 $\mu\text{g/mL}$.

Os complexos após serem incorporados nos CLNs F32 tiveram a CIM reduzida, ou seja, a atividade frente ao *M. tuberculosis* foi melhor. A CIM do complexo C1 foi de 37,07 para 1,870 $\mu\text{g/mL}$, do C2 de 36,52 para 2,310 $\mu\text{g/mL}$ e do C3 de 38,47 para 1,960 $\mu\text{g/mL}$. Logo, a atividade foi potencializada em 19,8, 15,8 e 19,6 vezes para esses compostos, respectivamente.

O mesmo foi observado ao incorporar as amostras no CLN F38; a ação foi potencializada em 21,2, 14,3 e 12,1 para os compostos C1, C2 e C3, respectivamente. Entretanto, os CLNs F32 e F38 desenvolvidos também apresentaram atividade antimicobacteriana, ou seja, inibiram o crescimento do *M. tuberculosis*, podendo então sugerir que a potencialização da atividade pelos CLNs - complexos metálicos devem ter ocorrido por um mecanismo de sinergismo entre o CLN e o complexo de cobre(II).

No que diz respeito ao ensaio de citotoxicidade pode-se observar que os complexos de cobre(II) não foram tóxicos frente a macrófagos (J774.A1) e à linhagem celular MRC-5 (fibroblasto pulmonar); entretanto, após serem incorporados nos CLNs F32 e F38, apresentaram toxicidade frente a essas duas linhagens celulares.

O valor de IC_{50} obtido para ambas as formulações desenvolvidas e para as amostras dos complexos incorporados nos sistemas frente a macrófagos foi o mesmo, $< 0,49 \mu\text{g/mL}$. Para MRC-5, o valor de IC_{50} obtido para todas as amostras foi de $< 0,240 \mu\text{g/mL}$. Sendo assim, de acordo com o protocolo desenvolvido por Pavan et al (2013), as formulações F32 e F38 desenvolvidas apresentaram toxicidade.

Relato da literatura mostrou que em macrófagos alveolares a citotoxicidade induzida pela RIF em solução de DMSO foi substancialmente menor do que a induzida pela RIF em NLS, podendo dessa maneira, inferir que essa linhagem é mais sensível a alta concentração de lipídio que contém na composição deste sistema, podendo ser o mesmo caso deste trabalho (CHUAN et al., 2013).

Outro fator que contribuiu com a toxicidade celular das linhagens testadas é a seletividade celular do sistema. Segundo Orme et al (2001) para se ter um composto seletivo, é necessário um índice de seletividade (IS), $\text{IC}_{50}/\text{CIM}$, igual ou superior a 10, que indica que a amostra analisada pode ser aplicada na concentração 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade. Diante dos resultados obtidos de IS, nenhuns dos complexos são seletivos, tanto em DMSO quanto incorporados nas formulações desenvolvidas.

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda dos compostos frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae)

Os dados de concentração letal mediana (CL_{50}) dos complexos de cobre(II) em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38 frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Concentração letal mediana (CL_{50}) dos complexos de cobre(II) em DMSO e incorporados nos CLNs F32 e F38 frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae).

Composto	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
C1	17,1
C2	7,80
C3	244,1
Solvente DMSO 2%	> 1500
F32	< 5,86
F32.OE.C1	< 5,86
F32.OE.C2	< 5,86
F32.OE.C3	< 5,86
F38	< 5,86
F38.OR.C1	< 5,86
F38.OR.C2	< 5,86
F38.OR.C3	< 5,86

Os complexos C1 e C2 em DMSO foram mais tóxicos quando comparados ao C3 frente ao modelo alternativo de *Artemia salina* L. (Artemiidae); entretanto, quando comparado ao complexo $[\text{Cu}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}]$ (2Am4Ph = N(4)-fenil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona) relatado na literatura por Ferraz et al (2009) que apresentou uma CL_{50} de 2,67 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram uma menor toxicidade. Ao serem incorporados nos CLNs F32 e F38, todos os complexos e as duas formulações desenvolvidas apresentaram $CL_{50} < 5,86$ $\mu\text{g/mL}$.

Portanto, os resultados obtidos de citotoxicidade frente a macrófagos e a linhagem celular MRC-5 e o modelo alternativo, estão de acordo, pois, em ambos os métodos as

formulações mostraram-se tóxicas nas concentrações analisadas. Esses resultados podem ser explicados tanto pelo sinergismo do complexo na formulação, quanto pela baixa seletividade celular. Outra possibilidade pode estar relacionada a limitação da técnica de ensaios *in vitro*, logo quando as formulações entraram em contato com o meio de cultura ocorreu o aumento da viscosidade do meio, o que provavelmente acarretou a redução de trocas gasosas entre célula e ambiente.

Realizando uma análise mais ampla, faz-se necessário enfatizar que os resultados obtidos até o momento são provenientes de testes *in vitro*. Estudos *in vitro*, apesar de vários benefícios, apresentam certas limitações em relação aos ensaios *in vivo*, pois, não é levado em consideração, por exemplo, o metabolismo e a fisiologia de um organismo superior, como por exemplo, de um camundongo (BOECKEL, 2011).

5 CONCLUSÕES

As 14 formulações desenvolvidas inicialmente por Ultra Turrax apresentaram separação de fases, com exceção da F14, enquanto as formulações desenvolvidas por sonificador apresentaram-se homogêneas e translúcidas. Destas, as formulações F32 e F38 constituídas de 2,07% de EP, 2,05% de TGACC e 0,88% de OR 40 OE ou OR, 3% de P-407, 0,5% de BC e água (Milli-Q) se mostraram adequadas para dar seqüência ao trabalho, sendo então selecionadas para a incorporação dos complexos C1, C2 e C3.

As formulações F32 e F38 apresentaram um aumento máximo de Dnm de aproximadamente 33 nm entre os períodos de 24 horas e 30 dias de armazenamento, e IPD próximos a 0,2 no mesmo período, demonstrando que tais formulações apresentaram distribuição de tamanho de partículas monodispersas.

Os complexos C1, C2 e C3 após serem incorporados nos CLNs (F32 e F38) apresentaram significativamente menores variabilidades médias de Dnm, as quais ficaram entre 78 nm e 187 nm, demonstrando estaticamente estáveis em relação ao Dnm. Também apresentaram significativamente menores variabilidades médias de IPD que ficaram entre 0,14 e 0,28, revelando, presença de partículas homogêneas, provavelmente sem aglomerados de partículas nas formulações.

Os CLNs obtidos apresentaram valores de PZ entre 17 mV a 30 mV, revelando boa estabilidade física ao longo dos 60 dias.

A microscopia de força atômica confirmou que os CLNs desenvolvidos tratam-se de dispersões de partículas esféricas em escalas nanométricas.

A análise de calorimetria exploratória diferencial indicou que os componentes lipídicos EP, TGACC, OR 40 OE ou OR, bem como o tensoativo P-407 interagiram para formação do sistema, indicando que os complexos C1, C2, e C3 foram incorporados nos CLNs, uma vez que os valores de entalpia obtidos foram menores que de entalpia esperados.

Os complexos após serem incorporados nos CLNs (F32 e F38) tiveram a concentração inibitória mínima reduzida, mostrando que a atividade frente ao *M. tuberculosis* foi potencializada em 19,8, 15,8 e 19,6 e em 21,2, 14,3 e 12,1 vezes para os compostos C1, C2 e C3, respectivamente.

Os testes de citotoxicidade mostraram que os complexos C1, C2 e C3 após serem incorporados nos CLNs (F32 e F38) apresentaram toxicidade frente a macrófagos (J774.A1) e à linhagem celular MRC-5 (fibroblasto pulmonar). Diante dos resultados obtidos de IS,

nenhuns dos complexos são seletivos, tanto em DMSO quanto incorporados nas formulações desenvolvidas.

Ao serem incorporados nos CLNs (F32 e F38) todos os complexos e as duas formulações desenvolvidas apresentaram $CL_{50} < 5,86 \mu\text{g/mL}$, ou seja, apresentaram-se tóxicos frente ao modelo alternativo de *Artemia salina* L. (Artemiidae).

Contudo, estudos *in vitro*, apresentam limitações quando comparados aos ensaios *in vivo*. Sendo assim a continuidade de estudos *in vivo* se faz necessária, a fim de comprovar as limitações ou as inovações baseadas nos estudos dos CLNs. Desta forma, acredita-se que os sistemas desenvolvidos são promissores para incorporação dos complexos de cobre(II) objetivando sua aplicação no estudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAYAN, R.R.; HORVATH, T.; MCNAUGHTON, B.H.; ANKER, J.N.; KOPELMAN, R. Optical manipulation of metal-silica hybrid nanoparticles. **Proceedings of SPIE**, v. 5514, p. 502-513, 2004.

ALLEN-JUNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9. ed. USA:Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

AYLA-TORRES, C.; HERNÁNDEZ, N.; GALEANO, A.; NOVOA-APONTE, L.; SOTO, C. Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. **Ann Microbiol**, 2013.

BHAVE, D.P.; MUSE, W.B.; CAROLL, S.K. Drug targets in Mycobacterial sulfur metabolism. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 140-158, 2007.

BOECKEL, D.G. **Ensaio de citotoxicidade do Ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado Prótese Dentária) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2011.

BOEHME, C.C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M.P.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ELLEN, J.; TECH, B.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMIEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; BRIEN, O.S.M.; PERSING, D.H.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES, C.; ALLAND, D.; PERKINS, M. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1005-1015, 2010.

BONIFÁCIO, B.V.; SILVA, P.B. RAMOS, M.A.S.; NEGRI, K.M.S.; BAUAB, T.M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

Referências Bibliográficas

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization of molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of pharmaceutics**, v. 92, p. 47-53, 1999.

BRANCO, F.S.C.; PINTO, A.C.; BOECHAT, N.A. Química medicinal de novas moléculas em fase clínica para o tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 287-328, 2012. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/243/244> Acesso em: 10 de jan. 2016.

BUNJES, H.; KOCH, M.H.J.; WESTESEN, K. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 7, p. 1509–1520, 2003.

CHUAN, J.; LI, Y.; YANG, L.; SUN, X.; ZHANG, Q.; GONG, T.; ZHANG, Z. Enhanced rifampicin delivery to alveolar macrophages by solid lipid nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1634-1642, 2013.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n.3, p. 113-118, 2007.

COLETTE, A.; ONDOH, A.M.; YUFANYI, D.M.; SADO, GAELLE, D.S.Y. Synthesis, crystal structure and antimicrobial properties of na anhydrous copper(II) complex of pyridine-2-carboxylic acid. **International Journal of Chemistry**; v. 7, n. 1, 2015.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DAS, S.; KIONG-NG, W.; TAN, R.B.H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139-151, 2012.

Referências Bibliográficas

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2013.

DROBNIEWSKI, F.; NIKOLAYEVSKY, V.; MAXEINER, H.; BALABANOVA, Y.; CASALI, N.; KONTSEVAYA, I.; IGNATYEVA, O. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. **BMC Medicine**, v. 11, n. 190, p. 1-11, 2013.

DUBES, A.; PARROT-LOPEZ, H.; ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H.; SHAHGALDIAN, P.; COLEMAN, A.W. Coleman. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 279-282, 2003.

EFTHIMIADOU, E.K.; KATSAROU, M.E.; KARALIOTA, A.; PSOMAS, G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure activity relationship. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 910-920, 2008.

EKAMBARAM, P.; EKAMBARAM, A.; SATHALI, A.; PRIYANKA, K. Solid lipid nanoparticles: A review. **Space Science Reviews**, v. 2, n. 1, p. 80-102, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo:Atheneu, 2000.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FERRAZ, K. O.; WARDELL, S. M. S. V.; WARDELL, J. L.; LOURO, S. R. W.; BERALDO, H. Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: spectral studies and toxicity against Artemiasalina. **Spectrochimica ActaA**, v. 73, p. 140-145, 2009.

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

Mariana Rillo Sato

FREITAS, E.S.; SILVA, P.B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A.A.; LOPES, E.O.; SILVA, M.M.; LEITE, C.Q.F.; PAVAN, F.R. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the *in Vitro* cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, p. 5999-6008, 2014.

FREITAS, C.; MÜLLER, R.H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221-229, 1998.

GONZÁLEZ-MIRA, E.; NIKOLIC, S.; GARCÍA, M.L. ; EGEA, M.A. ; SOUTO, E.B.; CALPENA, A.C. Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of Flurbiprofen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, 2011.

HEAURTAULT, B.; SSULNIER, P.; PECH B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

KAUR, T.; SLAVCEV, R. Solid lipid nanoparticles: Tuneable anti-cancer gene/drug delivery systems. *Novel Gene Therapy Approaches*, **Intech**, 2013.

KHOO, T.J.; BREAK, M.K.B.; CROUSE, K.A.; TAHIR, M.I.M.; ALI, A.M.; COWLEY, A.R.; WATKIN, D.J.; TARAFDER, M.T.H. Synthesis, characterization and biological activity of two Schiff base ligands and their nickel(II), copper(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes derived from S-4-picolylthiocarbamate and X-ray crystal structure of cadmium(II) complex derived from pyridine-2-carboxaldehyde. **Inorganica Chimica Acta**, v. 413, p. 68–76, 2014.

KOCH, R. An address on bacteriological research. **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 3, n. 3, 1890.

KOLENYAK-SANTOS, F.; GARNERO, C.; OLIVEIRA, R.N.; SOUZA, A.L.R.; CHORILLI, M.; ALLEGRETTI, S M.; LONGHI, M.R.; CHAUD, M.V.; GREMIÃO, M.P.D. Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the *in vitro* schistosomiasis activity of praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-12, 2014.

Referências Bibliográficas

KOUL, A.; ARNOULD, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 4, p. 6-9, 2011.

KRAUSE, B.; MENDE, M.; PÖTSCHKE, P.; PETZOLD, G. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Carbon**, v. 48, n. 10, p. 2746-2754, 2010.

LEE, K.; SHIN, S.C.; OH, I. Fluorescence Spectroscopy Studies on Micellization of Poloxamer 407 Solution. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 8, p. 653-658, 2003.

LOURENÇO, C.; TEIXEIRA, M.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.138, p.1-12, 1996.

MACIEL, E.L.; GUIDONI, L.M.; FAVERO, J.L.; HADAD, D.J.; MOLINO, L.P. JONHSON, J.L.; DIETZE, R. Adverse effects of the new tuberculosis treatment regimen recommended by the brazilian ministry of health. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, p. 232-238, 2010.

MALVERN INSTRUMENT. **Zetasizer nano series user manual**. Malvern, 2003. 256p.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 1-37, 2009.

MAZUR, L.; BANACHIEWICZ, B.M.; PAPROCKA, R.; ZIMECKI, M.; WAWRZYNIAK, U.E.; KUTKOWSKA, J.; ZIÓLKOWSKA, G. Synthesis, crystal structure and biological activities of a novel amidrazone derivative and its copper(II) complex — A potential antitumor drug. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 114, p. 55–64, 2012.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELM, C.; MÜLLER, R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n.1-2, p. 267-275, 2011.

MULLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 131-155, 2002.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NOGUEIRA, F.A.; FACCHINETTI, V.; SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n.1, p. 3-9, 2012.

OBEIDAT, W.M.; SCHWABE, K.; MULLER, R.H.; KECH, C.M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 56-67, 2010.

ORME, I.; SECRIST, J.; ANATHAN, S.; KWONG, C.; MADDRY, J.; REYNOLDS, R.; POFFENBERGER, A.; MICHAEL, M.; MILLER, L.; KRAHENBUH, J.; ADAMS, L.; BISWAS, A.; FRANZBLAU, S.; ROUSE, D.; WINFIELD, D.; BROOKS, J. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

PAHONTU, E.; ILIES, D.C.; SHOVA, S.; PARASCHIVESCU, C.; BADEA, M.; GULEA, A.; ROSU, T. Synthesis, characteriation, crystal structure and antimicrobial activity of copper(II) complexes with the schiff base derived from 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. **Molecules**, v. 20, p. 5771–5792, 2015.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for
Mariana Rillo Sato

Referências Bibliográficas

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R.S.; SARDINAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PATEL, M.N.; JOSHI, H.N.; PATEL, C.R. Copper(II) complexes with norfloxacin and neutral terpyridines: cytotoxic, antibacterial, superoxide dismutase and DNA-interaction approach. **Polyhedron**, v. 40, p. 159–167, 2012.

PAVAN, F.R.; POELHSITZ, G.V.; NASCIMENTO, F.B.; LEITE, S.R.A.; BATISTA, A.A.; DEFLON, V.M.; SATO, D.N.; FRAZBLAU, S.G.; LEITE, C.Q. Ruthenium(II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598-601, 2010.

PAVAN, F.R.; POELHSITZ, G.V.; DA CUNHA, L.V.P.; BARBOSA, M.I.F.; LEITE, S.R.A.; BATISTA, A.A.; CHO, S.H.; FRANZBLAU, S.G.; CAMARGO, M.S.; RESENDE, F.A.; VARANDA, A.; LEITE, C.Q.F. In vitro and in vivo activities of ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**, v. 8, n.5, p. 1-10, 2013.

PAZ, L.N.F.; OHNISHI, M.D.O.; BARBAGELATA, C.M.; BASTOS, F.A.; OLIVEIRA III, J.A.F.; PARENTE, I.C. Efetividade do tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 4, p. 503-510, 2012.

PRADO, T.N.; CAUS, A.L.; MARQUES, M.; MACIEL, E.L.; GOLUB, J.E.; MIRANDA, A.E. Perfil epidemiológico de pacientes adultos com tuberculose e AIDS no estado do Espírito Santo, Brasil: Relacionamento dos bancos de dados de tuberculose e AIDS. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n.1, p. 93-99, 2011.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, p. 295-304, 2008.

RIGON, R.B. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de *trans-resveratrol***. 2013. 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.

ROCHA, D.P.R.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; TAVARE, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, J.M.E. **Preparação de poliuretana à base de óleo de mamona**. 2005. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

RODRIGUES, M.A.; SILVA, P.P.; GUERRA, W. Cobre. **Química Nova Na Escola**, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5. ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

SANTOS, P.R. **Compostos de coordenação do ácido valpróico e metais de transição como medicamentos**. 2014. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PANTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 196-203, 2007.

SATO, M.R.; SILVA, P.B.; SOUZA, R.A.; SANTOS, K.C.; CHORILLI, M. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 287-297, 2015.

Referências Bibliográficas

SAUPE, A.; GORDON, C.K.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 314, p. 56-62, 2006.

SEVERINO, P.; PINHO, S.C.; SOUTO, E.B.; SANTANA, M.H.A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 125-130, 2011.

SHI, J.; VOTRUBA, A.R.; FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223-3230, 2010.

SILVA, G.B.R.F. **Desenvolvimento e análise estrutural de microemulsões lipídicas contendo a substância antitumoral metiljasmonato. Estudos da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação *in vitro* e toxicidade aguda.** 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SILVA, P.B. **Síntese, caracterização e investigação das atividades biológicas de complexos de cobre(II) contendo moléculas bioativas e ligantes nitrogenados.** 2012. 215f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SILVA, P.B.; BONIFÁCIO, B.V.; FREM, R.C.G.; NETTO, A.V.G.; MAURO, A.E.; FERREIRA, A.M.C.; LOPES, E.O.; RADDI, M.S.G.; BAUAB, T.M.; PAVAN, F.R.; CHORILLI, M. A nanostructured lipid system as a strategy to improve the *in vitro* antibacterial activity of copper(II) complexes. **Molecules**, v. 20, n.12, p. 22534-22545, 2015.

SILVA, P.B.; RAMOS, M.A.S.; BONIFÁCIO, B.V.; NEGRI, K.M.S.; SATO, M.R.; BAUAB, T.M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for vaginal administration of Drugs - A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218-2243, 2014.

Referências Bibliográficas

SILVA, R.C.; ESCOBEDO, J.P.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 330-335, 2008.

SINGHAL, G.B.; PATEL, R.P.; PRAJAPATI, B.G.; PATEL, N.A. Solid lipidi nanoparticles and nano lipidi carriers: as novel solid lipid based drug carrier. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 40-52, 2011.

SOBOLA, A.O.; WATKINS, G.M.; BRECHT, B.V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) complexes of some ortho-substituted aniline schiff bases; crystal structure of bis(2-methoxy-6-imino)methylphenol copper(II) complex. **South African Journal of Chemistry**, v. 67, p. 45–51, 2014.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídicos sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

STOKES, R.W.; NORRIS-JONES, R.; BROOKS, D.E.; BEVERIDGE, T.J.; DOXSEE, D.; THORSON, L.M. The Glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5676-5686, 2004.

TAN, S.W.; BILLA, N.; ROBERTS, C.R.; BURLEY, J.C. Surfactant effects on the physical characteristics of amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects*, v. 372, p. 73-79, 2010.

UNER, M. Preparation, characterization and physicochemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

ZHANG, T.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; SHEN, Q.; PAN, W. Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 174-179, 2011.

Referências Bibliográficas

WENDLANDT, W.W. **Thermal methods of analysis**. 2. ed. New York:Wiley, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global tuberculosis report 2014**. Geneva, 2014. 147 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global tuberculosis report 2015**. Geneva, 2015. 155 p.

YADAV, N.; KHATAK, S.; SARA, U.V.S. Solid lipid nanoparticles - a review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 8-18, 2013.

YANG, Y.; CORRONA, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M.A. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 261-272, 2014.

YOON, G.; PARK, J.W.; YOON, I.S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, p. 353-362, 2013.