

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Nadia Andrade Aleixo

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, CITOTÓXICA,
ANTIPROLIFERATIVA E MUTAGÊNICA DO COMPLEXO DE COBRE (II)
NANOENCAPSULADO EM MATRIZES POLIMÉRICAS**

Araraquara, SP
2020

Nadia Andrade Aleixo

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, CITOTÓXICA,
ANTIPROLIFERATIVA E MUTAGÊNICA DO COMPLEXO DE COBRE (II)
NANOENCAPSULADO EM MATRIZES POLIMÉRICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

Araraquara, SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

A348a Aleixo, Nadia Andrade
Avaliação da atividade antimicrobacteriana, citotóxica,
antiproliferativa, e mutagênica do complexo do cobre (II)
nanoencapsulado em matrizes poliméricas/Nadia Andrade Aleixo. –
Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.
92f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina
Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

1. Compostos de coordenação. 2. Atividade antimicrobacteriana.
3. Citotoxicidade. 4. Mutagenicidade. 5. Nanopartículas poliméricas.
6. Nanotecnologia. I. Título.

CDU 577.1:66



NÁDIA ANDRADE ALEIXO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof^a Dr^a MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. RICARDO ANDRADE FURTADO
Universidade de Franca - UNIFRAN.

Dedicatória

Ao curso que minha vida trilhou, mesmo quando não sabia onde seria levada, decidi confiar. A vida me trouxe ao longo deste tempo, comunhão com companheiros de trabalho, amigos e família, me mostrando a diferença entre experiência e formação (Nádia Aleixo)

Agradecimentos

O maior desafio até aqui foi encontrar palavras para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória acadêmica, sendo 7 anos dela na Universidade de Araraquara; minha dissertação chegou a um porto seguro devido ao apoio de vocês, fundamentais para a realização de mais esta conquista.

Aos meus pais Eduardo e Geiza, pelo amparo e incentivo, pacientemente me conduzindo a caminhos planos, me repreendendo e agindo com benevolência quando preciso, formando assim a minha educação. Fizeram o possível e impossível para que eu chegasse até aqui;

À minha irmã Daiana e sua família, sendo privados muitas das vezes de minha presença pela rotina, mas sem vocês nada seria possível. Cada palavra de conforto e esperança, cada abraço e sorriso. Obrigada!

Ao meu noivo Gabriel, indispensável com sua calma e aconchego, me auxiliando em minhas conquistas, me trazendo paz em minhas tempestades, me estimulando em momentos difíceis. Me ensinou o verdadeiro sentido de “estar junto”;

Aos meus primos que considero irmãos, aos meus tios que considero conselheiros, aos meus amigos que considero família;

À minha sábia orientadora Professora Flávia Resende, por todos os encontros que a vida já nos proporcionou, em todos eles, ela estava de braços e coração abertos para me ensinar, me advertir e afagar. Obrigada por todos “confia em mim”, nunca fui decepcionada.

Igualmente desejo agradecer a meus companheiros de laboratório: Gabriel Marena, Pietra, Rafaela, Vanessa, Maria Julia, Washington, Igor, Gabriela, Beatriz, Luiza.

Obrigada por TODOS os momentos que tivemos juntos;

À Renata Aquino, grande ajuda em momentos em que me senti necessitada, seja afetivamente ou profissional. Ao professor Hernane Barud, mesmo antes de me conhecer já participava de minha formação e me incentivava a querer mais do que eu podia enxergar. Ao professor Guillermo e a todos do laboratório de Nanobiomateriais da Universidade de La Plata – Argentina, que me proporcionaram uma experiência incrível, profissional e de vivência, me fazendo acolhida onde era peregrina;

*Aos meus companheiros e amigos Eduardo Donato, Gabriela Gastaldi, Amanda Claro,
Nayara Cavichioli, Mariana Rios e Guilherme Benevenuto;*

*À secretaria de pós graduação por todo o apoio, em todos os momentos que necessitei,
me assessorando em várias questões, juntamente com a agência de fomento desta
pesquisa, a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior).
À todos funcionários UNIARA, aos professores da PPBG-MRQM, sempre solícitos em
me ajudar, me auxiliando a ultrapassar obstáculos. Quero expressar um sentimento
chamado gratidão, me recordo de cada mensagem, cada auxílio, cada mão estendida,
meu “MUITO OBRIGADA”!!!!*

*Não posso deixar de agradecer cinco grandes incentivadores e amigos; mesmo de
outras instituições, dispuseram tempo e complacência para comigo: Ailton Rissoni,
Maybi Daminhani, Rone De Grandis, Mariana Sato e Débora Leite.*

*À cooperação com os laboratórios de Micobacteriologia, Farmacotécnica e Fisiologia
de Microrganismos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP, coordenados pelos Professores Doutores Fernando Rogério Pavan, Marlus
Chorilli e Tais Maria Bauab.*

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Complexos Metálicos	1
1.2. Nanoencapsulamento	3
1.3. Atividade antimicrobacteriana	5
1.4. Importância da avaliação do potencial citotóxico e mutagênico	6
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Obtenção dos complexos metálicos	11
3.2. Síntese das nanopartículas poliméricas	11
3.2.1. Eficiência de encapsulação (EE%)	12
3.3. Ensaio de liberação	15
3.3.1. Fatores de diferença e de similaridade	15
3.4. Espalhamento dinâmico de Luz	16
3.5. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)	18
3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	18
3.8. Atividade citotóxica	19
3.8.1. Linhagens celulares	19
3.9. Determinação do índice de seletividade	22
3.10. Atividade mutagênica	22
3.11. Análises Estatísticas	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Citotoxicidade dos Complexos metálicos de Cobre	26
4.2. Caracterização das nanopartículas poliméricas	30
4.3. Atividades biológicas in vitro	41
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS	62
8. ANEXO	72

ALEIXO, Nádia Andrade. “Avaliação da atividade antimicobacteriana, citotóxica, antiproliferativa e mutagênica do complexo de Cobre (II) nanoencapsulado em matrizes poliméricas”. 2020. Defesa Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

A tuberculose é uma doença que abrange o contexto individual e coletivo, classificada entre as dez doenças que mais matam em todo o mundo e ligantes orgânicos a metais podem auxiliar na amplificação antimicobacteriana. O centro metálico dos compostos de coordenação apresenta diversas características que permitem domínio catalítico de enzimas, troca de elétrons, funções estruturais, entre outros. O cobre (Cu), terceiro elemento de transição mais abundante no organismo humano, já demonstrou um perfil antimicrobiano em estudos anteriores. Devido a isso, neste estudo avaliamos a citotoxicidade dos complexos de Cu(II) que apresentam como ligante a Isoniazida (INH): $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**I1**), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**I2**), $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**I3**). Destes, **I1** foi encapsulado nas matrizes poliméricas Eudragit® E100 (catiônico), S100 (aniônico) e NE30D (neutro) e as formulações produzidas foram caracterizadas e investigadas quanto ao potencial antimicobacteriano, citotóxico, antiproliferativo e mutagênico. Os resultados obtidos mostraram que **I1**, **I2** e **I3** possuem baixa citotoxicidade. O menor IC_{50} foi observado para **I2**, frente a linhagem celular Caco-2. Sobre as NPPs, NPPNE30D teve o menor valor de diâmetro hidrodinâmico, menor IPD, portanto uma boa uniformidade de distribuição às partículas e uma alteração do PZ a um valor positivo, provavelmente devido a interação eletrostática de **I1** com a matriz polimérica. A citotoxicidade de NPPNE30D foi mais pronunciada após 48 h de tratamento, mas ainda demonstrou maior seletividade contra *M. tuberculosis*, com valor de CIM_{90} menor que os valores de IC_{50} encontrados. NPPE100 apresentou atividade antimicobacteriana, mas alta citotoxicidade frente a células eucarióticas e NPPS100 teve menor efeito citotóxico, mas nenhum potencial frente ao *M. tuberculosis*. NPPE100 e NPPS100 também não foram mutagênicas. Frente a tudo isso, os dados do presente estudo fornecem suporte às propriedades antimicobacterianas de NPPs com complexo metálico, contribuindo na busca de novas formulações com atividades biológicas, além da citotoxicidade e mutagenicidade que provém informações mais aprofundadas sobre se um composto é um candidato promissor para o tratamento da TB. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento da interação celular com nanossistemas.

Palavras-chave: Compostos de coordenação; atividade antimicobacteriana; citotoxicidade; mutagenicidade, nanopartículas poliméricas, nanotecnologia.

Tuberculosis is a disease that encompasses the individual and collective context, ranked among the top ten deadly worldwide and organic metal ligands can aid in antimicrobial amplification. The metallic center of the coordination compounds has several characteristics that allow catalytic domain of enzymes, electron exchange, structural functions, among others. Copper (Cu), the third most abundant transition element in the human body, has already demonstrated an antimicrobial profile in previous studies. Because of this, in this study we evaluated the cytotoxicity of Cu (II) complexes that present Isoniazid (INH) as a binder: $[\text{CuCl}_2 (\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**I1**), $[\text{Cu} (\text{NCS})_2 (\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**I2**), $[\text{Cu} (\text{NCO})_2 (\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**I3**). Of these, I1 was encapsulated in the Eudragit® E100 (cationic), S100 (anionic) and NE30D (neutral) polymeric matrices and the formulations produced were characterized and investigated for antimicobacterial, cytotoxic, antiproliferative and mutagenic potential. The results showed that **I1**, **I2** and **I3** have low cytotoxicity. The lowest IC_{50} was observed for **I2**, compared to the Caco-2 cell line. Regarding NPPs, NPPNE30D had the lowest hydrodynamic diameter value, lowest IPD, therefore a good particle distribution uniformity and a PZ change to a positive value, probably due to the electrostatic interaction of **I1** with the polymer matrix. The cytotoxicity of NPPNE30D was more pronounced after 48 h of treatment, but still showed higher selectivity against *M. tuberculosis*, with a MIC_{90} lower than the IC_{50} values found. NPPE100 showed antimicobacterial activity, but high cytotoxicity against eukaryotic cells and NPPS100 had less cytotoxic effect, but no potential against *M. tuberculosis*. NPPE100 and NPPS100 were also not mutagenic. In light of all this, the data from the present study support the antimicobacterial properties of metal complex NPPs, contributing to the search for new formulations with biological activities, as well as cytotoxicity and mutagenicity that provide more in-depth information on whether a compound is a promising candidate. the treatment of TB. However, further studies are needed to understand the cellular interaction with nanosystems.

Keywords: Coordinating compounds; antimicobacterial activity; cytotoxicity; mutagenicity, polymeric nanoparticles, nanotechnology

	Pag.
Figura 1. Demonstração dos locais de ação no uso dos Eudragit® E100, S100 e NE 30 D por via oral, de acordo com o pH de preferência de ação.....	5
Figura 2. Estrutura química proposta para os complexos I1 , I2 e I3	11
Figura 3. Representação ilustrativa dos polímeros Eudragit® NE 30D (solubilizado em água ultra-purificada), S100 (pó) e E100 (granular).....	12
Figura 4. Representação ilustrativa do preparo das nanopartículas poliméricas.....	14
Figura 5. Sistemas para avaliação da liberação das nanopartículas poliméricas.....	15
Figura 6. Célula eletroforética.....	17
Figura 7. Fotomicrografias das linhagens celulares utilizadas neste estudo. (A) GM07492; (B) HepG2; (C) A549; (D) MRC-5; (E) Caco-2; (F) HU-VE-C; (G) MCF-7; (H) HeLa.....	20
Figura 08. Representação esquemática do Teste de AMES.....	24
Figura 09. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações dos complexos de Cu(II) I1 (A), I2 (B) e I3 (C).....	27
Figura 10. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (A) NE 30 D/ I1 ; (B) E100/ I1 ; (C) S100/ I1	32
Figura 11. Distribuição das partículas e seu tamanho de acordo com a intensidade (A) NE 30D (B) E100 (C) S100.....	33
Figura 12. Espectros do Complexo metálico de Cu(II) I1 e das NPPs de NE30D com e sem I1 obtidos pela técnica FTIR	34
Figura 13. Espectros do Complexo metálico de Cu(II) I1 e das NPPs de E100 com e sem I1 obtidos pela técnica FTIR	35
Figura 14. Espectros do Complexo metálico de Cu(II) I1 e das NPPs de S100 com e sem I1 obtidos pela técnica FTIR	36
Figura 15. Ensaio de liberação comparando as NPPs em pH alcalino e ácido. (a) NPP E100, (b) NPP S100 e (c) NPP NE 30 D.....	38
Figura 16. Ensaio de liberação das NPPs (I) NE 30D, (II) S100 e (III) E100 comparado ao complexo metálico de Cu(II) I1 em pH ácido e em pH alcalino.....	40
Figura 17. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com E100 (A) GM07492 (B) HepG2.....	43

Figura 18. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com NE30D (A) GM07492 (B) HepG2.....	44
Figura 19. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com S100 (A) GM07492 (B) HepG2.....	45

	Pag.
Tabela 1. Classificação da citotoxicidade mediante a análise celular qualitativa morfológica.....	7
Tabela 2. IC ₅₀ dos complexos e sal de Cu(II) sobre as linhagens celulares testadas.....	29
Tabela 3. Médias e desvios-padrão do diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) para as bases e as NPPs, bem como da eficiência de encapsulação (EE%).....	31
Tabela 4. Representação dos valores obtidos após aplicação do fator de diferença (f1) e fator de similaridade (f2) referentes as nanopartículas poliméricas.....	39
Tabela 5. Valores de CIM ₉₀ , IC ₅₀ e a determinação do índice de seletividade (IS) das nanopartículas poliméricas.....	46
Tabela 6. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. Typhimurium</i> após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPPs) compostas por Eudragit® S100 com o complexo de Cu(II) II , em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....	48
Tabela 7. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. Typhimurium</i> após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPPs) compostas por Eudragit® E100 com o complexo de Cu(II) II , em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....	49
Tabela 8. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. Typhimurium</i> após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPPs) compostas por Eudragit® NE 30 D com o complexo de Cu(II) II , em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag – Prata;

ATCC - *American Type Culture Collection*;

Caco-2 - Linhagem celular de adenocarcinoma coloretal humano;

CIM₉₀ – Concentração Inibitória Mínima de 90% da população microbiana;

CL - *Clary Lubs*;

CO₂ - Dióxido de Carbono;

COOH – ácido carboxílico;

COX - Citocromo oxidase;

Cu - Cobre;

°C - Graus Celsius;

DLS - *Dynamic Ligth Scattering*;

DMEM - Dulbecco's modification of Eagle's médium;

DMSO - Dimetilsulfóxido;

DNA - ácido desoxirribonucleico;

DP – desvio padrão

EE – Eficiência de Encapsulamento;

FDA - *Food and Drug Administration*;

Fe - Ferro;

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier;

f₁- Fator de diferença;

f₂- Fator de similaridade;

GM-07492 - Linhagem celular de fibroblástica não transformante;

HeLa - Linhagem celular de adenocarcinoma cervical humano;

HepG2 - Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano;

HU-VE-C - Linhagem celular de endotélio vascular - cordão umbilical;

IC₅₀ - concentração inibitória estimada para afetar o crescimento de 50% da população celular;

IM – índice de mutagenicidade

INH - Isoniazida;

IPD - Índice de polidispersidade;

IS – índice de seletividade

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*;

ISO – *International Organization of Standardization*;

MCF-7 - Linhagem celular de adenocarcinoma de glândula mamária humana;

MET – Microscopia eletrônica de transmissão;

mL - Mililitros;

MRC-5 - Linhagem celular de fibroblastos normais de pulmão humano;

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótico fosfato;

nm – nanômetros;

NPs - nanopartículas;

NPPs – nanopartículas poliméricas;

NPPE100 - Nanopartícula polimérica de Eudragit® E100;

NPPNE30D - Nanopartícula polimérica de Eudragit® NE 30 D;

NPPS100 - Nanopartícula polimérica de Eudragit® S100;

OADC - ácido oleico, albumina, dextrose e catalase;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

PBS – Solução Tampão Fosfato;

Pd – Paládio;

pH - Potencial hidrogeniônico;

Pt - Platina;

PZ – Potencial Zeta;

PZA - Pirazinamida;

REDOX - óxido-redução;

REMA - ensaio de microtitulação com resazurina (*Resazurin Microtiter Assay*)

Rpm – rotação por minuto;

Ru – Rutênio;

SBF - Soro Bovino Fetal;

SOD – Superóxido dismutase;

S9 – Fração microssomal de fígado de rato;

TB - Tuberculose;

TB-MDR - Tuberculose multi-drogas resistente;

TB-XDR - Tuberculose extensivamente droga resistente;

UFC – Unidade formadora de colônias;

µg - Microgramas;

µg/ mL- microgramas por microlitros;

µL - microlitros;

V - Vanádio;

Zn – Zinco.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Complexos Metálicos

O campo da química medicinal inorgânica cresceu consistentemente durante os últimos 50 anos (SPRECKELMEYER et al., 2014), gerando um interesse significativo no desenvolvimento de complexos metálicos como potenciais agentes terapêuticos e para diagnóstico. Existem diversos complexos metálicos que já estão em uso por esses propósitos, o que tem encorajado pesquisas na descoberta de novos metalofármacos com atividades biológicas tais como antibióticos mediados por metais, além de compostos antitumorais, antivirais e para diversas outras finalidades (EKENNIA et al., 2015).

Alguns metais são essenciais para funções vitais das células, participantes de diversos processos biológicos, como atividades celulares, domínio catalítico de enzimas, troca de elétrons, funções estruturais, entre outros (NDAGI et al., 2017). Associado a isso, estudos mostram que os metais podem modificar a ação de alguns fármacos (RONCONI & SADLER, 2007). Assim, uma das estratégias farmacológicas é a interação de um íon metálico a um ligante específico (MANZANO et al., 2017), a fim de formar um complexo metálico.

A cisplatina, uma das primeiras drogas metálicas, totalmente inorgânica, ainda é frequentemente utilizada na clínica por sua ação em células e tecidos através da indução de apoptose, sendo considerada uma droga antineoplásica de primeira geração (BARRA & NETO, 2015; FREIRE et al., 2017; ASADI et al., 2017; MANZANO et al., 2017). No entanto, apresenta efeitos colaterais graves, como o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células tumorais, além de nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, náuseas e vômitos (BARRA & NETO, 2015; FREIRE et al., 2017; ASADI et al., 2017; MANZANO et al., 2017).

Na busca por fármacos mais seletivos, outros centros metálicos, em substituição à platina, têm atraído o interesse de pesquisadores (MUHAMMAD & GUO, 2014; OTT & GUST, 2007; ZHANG & LIPPARD, 2003). Os metais de transição, tais como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), vanádio (V), platina (Pt), paládio (Pd), prata (Ag), entre outros, apresentam propriedades diferenciadas dos demais por conta da formação de orbitais “d”; estes participam de ligações químicas diretamente, se organizando em estruturas razoavelmente previsíveis. Com atividade catalítica profunda, formam

complexos estáveis e com estados de oxidação variáveis (PAIVA et al., 2006; WILSON & VALLET, 2018).

Além das mudanças no estado de oxidação, ainda podemos destacar que variações geométricas e no número de coordenação, alterações na afinidade do ligante pelo metal e a possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica (ALBANI et al., 2014; PRESA et al., 2015) podem ser características a serem investigadas, permitindo, desta maneira, a combinação de diferentes perfis para a obtenção de fármacos menos tóxicos e com melhor potencial terapêutico (HAAS & FRANZ, 2009; BARRA & NETO, 2015; GRAU et al., 2018).

Um dos metais que vem sendo amplamente estudado é o Cu, por ser um oligoelemento e o terceiro elemento de transição mais abundante no organismo humano, apresentando-se com baixa toxicidade. Estudos demonstram potencial atividade antimicrobiana (JIN et al., 2010; SILVA et al., 2016; PAHONTU et al., 2015) e promissores para terapias antineoplásicas (SILVA et al., 2015, 2016; HUSSAIN et al., 2018). O Cu é importante devido às suas propriedades oxidativas e bio-essenciais na respiração, metabolismo e síntese de DNA. Compõe a estrutura de pelo menos dez enzimas, como Superóxido dismutase (SOD), Citocromo oxidase (COX) e Tirosinase (LOH et al., 2009; TISATO et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2013; BARBOSA et al., 2019), além de desempenhar um papel essencial nos processos de neurotransmissão (HUSSAIN et al., 2018).

De acordo com Silva et al. (2015), os complexos de Cu(II) com isoniazida (INH) $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**I1**) e $\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**I2**) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**I3**) analisados neste estudo foram testados isoladamente, onde os resultados obtidos apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCCr25923, *Escherichia coli* ATCCr 25922 (SILVA et al., 2015) e *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (SILVA et al., 2016), além de baixa toxicidade frente as células eucarióticas. Devido ao promissor potencial farmacológico previamente observado, a necessidade de alternativas terapêuticas frente à resistência antimicrobiana e a busca por inovação para criar uma nova geração de tratamentos, no presente estudo, a química bioinorgânica foi associada a nanotecnologia.

1.2. Nanoencapsulamento

A tecnologia de nanoencapsulação consiste na compartimentalização de substâncias em transportadores. Estes carreadores possuem alta superfície de contato e um número elevado de partículas por unidade de peso, com as vantagens de poder alterar propriedades como aumentar a seletividade e eficácia do medicamento ou composto ativo, melhorar a solubilidade, além de proteger contra a degradação térmica ou fotodegradação (CETIN et al., 2010; VACULIKOVA et al., 2012; BARBOSA et al., 2019; DAUDT et al., 2013; SOUSA FILHO & SERRA, 2015; JAIN & THAREJA, 2019).

As nanopartículas (NPs) são sistemas de distribuição de drogas coloidais que variam de 10-1000 nm de diâmetro (GAZI & SILALA, 2018). No entanto, para aplicações biomédicas normalmente possuem tamanhos superiores a 100 nm, a fim de incluir partículas que aproveitam as vantagens anatômicas (AMOABEDINY et al., 2009). São moléculas compostas por três camadas: camada superficial, que pode ser funcionalizada com uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, surfactantes e polímeros, camada de casca, que apresenta um material quimicamente diferente do núcleo em todos os aspectos e por último o núcleo, que é a porção central da NP e geralmente se refere de fato a própria NP (KHAN et al., 2019).

As NPs podem ser compostas por polímeros sintéticos ou semi-sintéticos, permitindo a formulação de novos materiais nanocompósitos poliméricos, do inglês "*polymer nanocomposite*" que transportam drogas ou substâncias proteicas adsorvidas ou dissolvidas na matriz polimérica de maneira física ou química (SOUSA FILHO & SERRA, 2015), onde as propriedades e a funcionalidade da NP e do polímero podem ser combinadas (SMITH & BEDROV, 2009).

Os métodos empregados para a síntese de NPs são tipicamente agrupados em duas classes como: de baixo para cima ou de cima para baixo (KHAN et al., 2019). A divisão de um sólido maciço em porções menores ocorre pelo método de dispersão (de cima para baixo), por exemplo moagem de esferas de alta energia, homogeneização de alta pressão, tecnologia de emulsificação e microfluidização, enquanto que o método de precipitação (de baixo para cima) envolve a condensação de átomos ou entidades moleculares em uma fase gasosa ou em solução como a síntese sol-gel. Outros processos de precipitação conhecidos são spray de congelamento em líquido, precipitação evaporativa em solução

aquosa, precipitação via antissolvente comprimido ou expansão rápida de uma solução supercrítica (VACULIKOVA et al., 2012).

Diferentes tipos de polímeros são usados na indústria farmacêutica com a intenção de desenvolver formulações de liberação controlada visando diferentes partes do sistema gastrointestinal, com o objetivo de alcançar terapias mais eficazes, eliminando o potencial de sub e superdosagem, bem como manter a concentração do fármaco dentro de um intervalo desejado (KADIAN & HARIKUMAR, 2009; BARBOSA et al., 2019).

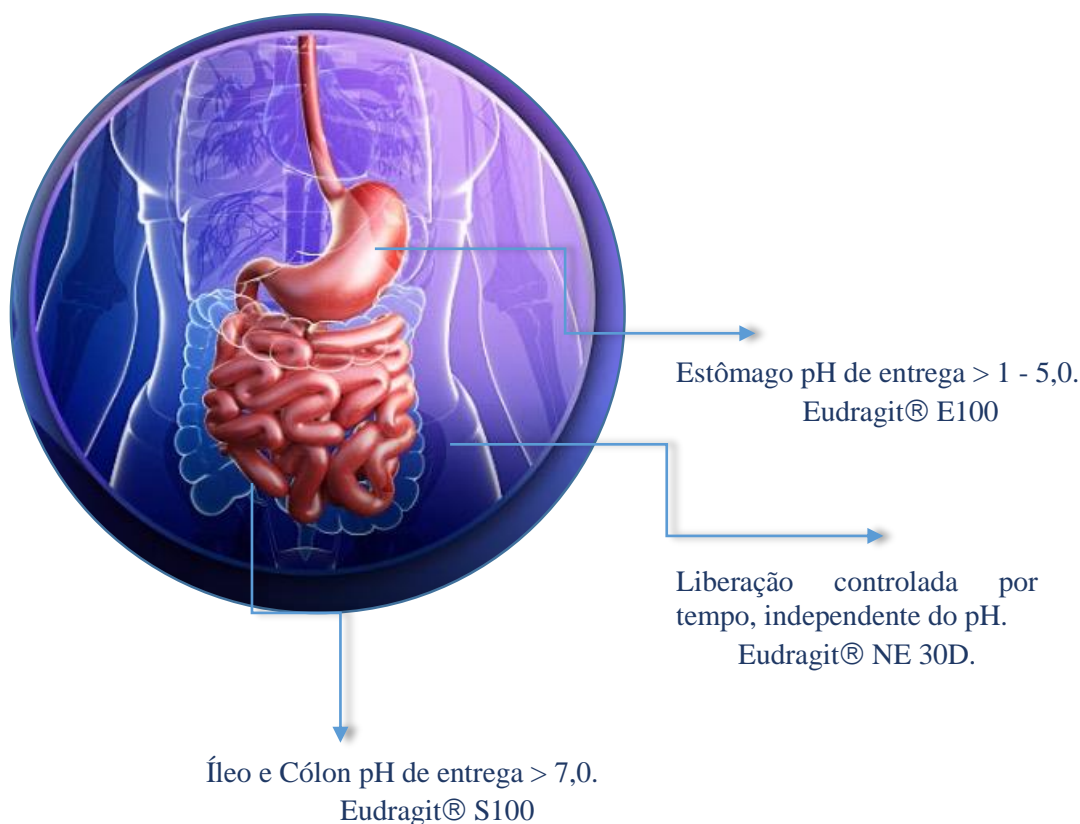
A administração oral é uma das vias de preferência devido à conveniência, adesão do paciente e relação custo-benefício. Quando se administram intravenosamente sistemas de NPs convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação (SCHAFFAZICK et al., 2003). Por isso, estes sistemas têm sido constantemente investigados para a administração oral de um grande número de medicamentos (CETIN et al., 2010).

Os polímeros Eudragit® são copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico e metacrílico, cujas propriedades físico-químicas são determinadas por grupos funcionais de grande importância para aplicações farmacêuticas. Estes polímeros permitem que o ativo em sua forma de dosagem sólida atue durante a passagem no corpo humano.

O Eudragit® S100 apresenta como grupo funcional o ácido carboxílico (COOH), é aniônico com pH preferencial de ação acima de 7,0, além de gastrorresistente e enterossolúvel. O Eudragit® E100, por sua vez, é um copolímero de metacrilato de aminoalquil, com o grupo funcional dimetil aminoetil ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), apresenta-se catiônico, pH preferencial de 1,0 a 5,0, gastrossolúvel e enterorresistente. Já o Eudragit® NE 30 D é composto por ésteres neutros, com grupo funcional COOCH_3 ou COOC_4H_9 , independente de pH, insolúvel e permeável (CRUZ et al., 2009; NGWULUKA et al., 2015; KADIAN & HARIKUMAR, 2009).

Os locais de ação preferenciais dos Eudragit® E100, S100 e NE 30 D estão ilustrados na **Figura 1**.

Figura 1. Demonstração dos locais de ação no uso dos Eudragit[®] S100, E100, e NE 30 D por via oral, de acordo com o pH de preferência de ação



Fonte: Adaptado de Evonik Industries – Eudragit Acrylic Polymers for Solid Oral dosage forms.

1.3. Atividade antimicobacteriana

A tuberculose (TB), uma doença que já existe por milênios, é um problema de saúde pública global relatado até os dias atuais e se classifica entre as dez doenças que mais matam em todo o mundo (FIRMINO et al., 2016; RABAHI et al., 2017).

No ano de 2017 totalizou 6,4 milhões de pessoas diagnosticadas; já em 2018, 7 milhões de pessoas foram diagnosticadas e tratadas para TB, sendo que destes, 1,5 milhão de pessoas foram a óbito (OMS, 2018).

Na década de 40 foram desenvolvidos os primeiros tratamentos eficazes contra TB, utilizando quatro drogas de primeira linha por um período de seis meses: INH, etambutol, pirazinamida e rifampicina (RABAHI et al., 2017), atualmente ineficaz contra

microrganismos multi-droga resistente (TB-MDR) e tuberculose extensivamente droga resistente (TB-XDR), sendo que a segunda situação já foi relatada por 117 países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS). Nesses casos, o tratamento se torna ainda mais tóxico e longo, podendo chegar a 20 meses de medicação com drogas de segunda linha, além de ter um custo elevado (cerca de R\$4000,00 a R\$10000,00 por pessoa) (OLIVEIRA et al., 2006; PAVAN et al., 2010; DE GRANDIS et al., 2016; OMS, 2016).

O surgimento das cepas resistentes tem relação direta com o comprometimento do tratamento efetivo da doença, evidenciando a urgência no desenvolvimento de novos agentes contra a TB. Nesse contexto, tem se destacado a química de coordenação, produzindo e avaliando as atividades biológicas dos complexos metálicos no combate ao *M. tuberculosis* (OLIVEIRA et al., 2006, FIRMINO et al., 2016; DE GRANDIS et al., 2016).

Muitos complexos metálicos já foram testados com finalidade anti-*M. tuberculosis*, como exemplo complexos de Fe, Rutênio (Ru) e Cu, principalmente tendo fármacos (antibióticos) como ligantes orgânicos, dos quais a presença dos metais ajudou a amplificar a ação antimicobacteriana, constituindo assim um rápido e inovador campo em desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2006; DRZEWIECKA-ANTONIK et al., 2017).

A química medicinal inorgânica mostra ser uma ferramenta em potencial para minimizar os problemas no tratamento da TB, tanto na modificação de drogas já existentes quanto no desenvolvimento de novos compostos ativos que melhoram a terapia (FIRMINO et al., 2016).

1.4. Importância da avaliação do potencial citotóxico e mutagênico

Visando a segurança toxicológica de novas moléculas para a terapia de diversas doenças, métodos para a avaliação da citotoxicidade estão cada vez mais sendo utilizados como *screening*, certificados por parâmetros que abrangem desde a alteração do metabolismo a morte celular, seja apoptose, autofagia ou necrose (BRAS et al., 2005; ESCOBAR et al., 2015).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são relativamente econômicos, rápidos e permitem uma correlação com os ensaios *in vivo* de modelos convencionais, além de

reduzir o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; CINGI et al., 1991; KEAWPRADUB, 1999; FRESHNEY, 2005).

Segundo a ISO 10993-5 (2009), a redução na viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico. Para a avaliação de compostos é realizado o cálculo do valor de IC₅₀ (concentração inibitória estimada para afetar o crescimento de 50% da população celular), que permite a graduação do efeito citotóxico, além de também poder ser avaliado de forma qualitativa, conforme demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação da citotoxicidade mediante a análise celular qualitativa morfológica

Grau	Reatividade	Condições da Cultura
0	Nenhuma	Grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular, sem redução do crescimento celular
1	Ligeira	Células arredondadas somam no máximo 20%, presença de poucas células lisadas, apenas uma ligeira inibição do crescimento observável
2	Suave	A inibição do crescimento não é observável como superior a 50%. Estas células apresentam-se desprovidas de grânulos intracitoplasmáticos e sem lise extensa
3	Moderado	Não mais de 70% das camadas celulares contêm células arredondadas ou lisadas, mas mais de 50% de inibição do crescimento observável
4	Grave	Destruição das camadas celulares de forma quase/ou completa

A inadequação da substância avaliada não deve ocorrer apenas com base nos dados de citotoxicidade. No entanto, este é uma principal indicação para a toxicidade in vivo (ISO 10993-5, 2009).

Além da citotoxicidade, compostos com potencial farmacológico devem ser assegurados por meio de ensaios genotoxicológicos, a fim de esclarecer sua atividade quanto a essa interação (De OLIVEIRA et al., 2013). A interação com a molécula de

DNA pode resultar em danos gênicos e/ou cromossômicos (ALVES DOS SANTOS et al., 2008; AMANI et al., 2019), que apesar da existência do mecanismo de reparo, dependendo da gravidade da lesão, são ocasionadas mutações (SHRIVASTAV et al., 2010; De OLIVEIRA et al., 2013).

A análise mutagênica é realizada por centros de pesquisas e indústrias farmacêuticas, por meio de ensaios como o teste de mutação gênica em bactérias, utilizando linhagens das bactérias *Salmonella Typhimurium* ou *E. coli* (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; ARAYA et al., 2015), testes citogenéticos in vitro para avaliação de danos cromossômicos em células de mamíferos, além de testes in vivo para avaliação de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (BARROS et al., 2005). Os compostos que apresentam resultados “positivos” nos testes com procariontos e/ou citogenéticos são potencialmente agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos para seres humanos (ANVISA, 2010).

O ensaio de mutação gênica reversa (Teste de Ames) é um dos testes mais utilizados para a identificação de substâncias mutagênicas. No teste, as linhagens de *Salmonella* mais usadas são TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538. Elas carregam um gene mutante que as impedem de sintetizar o aminoácido essencial histidina em um meio de cultura bacteriano padrão. Já a linhagem de *E. coli*, WP2 uvrA pKM101 rotineiramente utilizada, é portadora de um gene mutante que impede a síntese do aminoácido essencial triptofano. Assim, estas bactérias só podem sobreviver e crescer em meio contendo excesso de histidina (ou triptofano no caso da *E. coli*). No entanto, na presença de um mutágeno, os genes mutados podem sofrer uma nova mutação, permitindo que as bactérias cresçam em meios contendo apenas traços de histidina ou triptofano adicionais, levando a uma recuperação da atividade ou função normal (MORTELMANS & ZEIGER 2000; MARON & AMES, 1983).

As linhagens foram especialmente construídas para detectar mutações, como substituições de bases (linhagens TA1535, TA100, TA102 e TA104) e deslocamento no quadro de leitura “*frameshift*” (linhagens TA1537, TA1538, TA97a e TA98) (MORTELMANS & ZEIGER 2000; NUNES et al., 2012; HEBERT et al., 2015).

Outro ponto que deve ser considerado é que em seres humanos e outros mamíferos, o sistema metabólico baseado no citocromo P450, presente principalmente no fígado, é capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos eletrófilos que se tornam reativos ao DNA, ou seja, muitos produtos químicos não são mutagênicos (ou carcinogênicos) em suas formas nativas, mas podem ser convertidos em substâncias

mutagênicas pelo metabolismo no fígado. Como as bactérias não têm a capacidade metabólica, um sistema de ativação exógeno de mamífero deve ser adicionado ao teste. Os protocolos do teste de Ames recomendam enzimas hepáticas de rato ou hamster, o que é chamado de fração microsomal S9. Este sistema de ativação metabólica consiste na fração sobrenadante de homogeneizado de fígado de rato incorporado no sistema-teste na presença de NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) e co-factores para oxidação (mistura S-9) (MORTELMANS & ZEIGER 2000; MARON & AMES, 1983).

Frente a tudo isso, este ensaio pode fornecer uma alta previsibilidade de carcinogenicidade, sendo um bom indicador na triagem de novos produtos químicos e drogas (OLIVEIRA et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a citotoxicidade dos complexos de Cu(II) com INH $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**I1**) e $\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**I2**) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**I3**) e direcionar o complexo **I1** aos estudos do potencial antimicobacteriano, citotóxico, antiproliferativo e mutagênico encapsulado em matrizes poliméricas da marca Eudragit[®] (S100, E100 e NE 30 D).

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a atividade citotóxica dos complexos metálicos de Cu(II) **I1**, **I2** e **I3** em diversas linhagens celulares;
- Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas (NPPs) com o complexo de Cu(II) **I1** e matrizes poliméricas da marca Eudragit[®] (S100, E100 e NE 30 D).
- Avaliar a atividade antimicobacteriana das NPPs desenvolvidas;
- Avaliar a atividade citotóxica das NPPs frente a linhagem fibroblástica não transformante GM07492 e a linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2 nos tempos de tratamento de 24 e 48 h;
- Avaliar a atividade mutagênica das NPPs pelo teste de Ames.

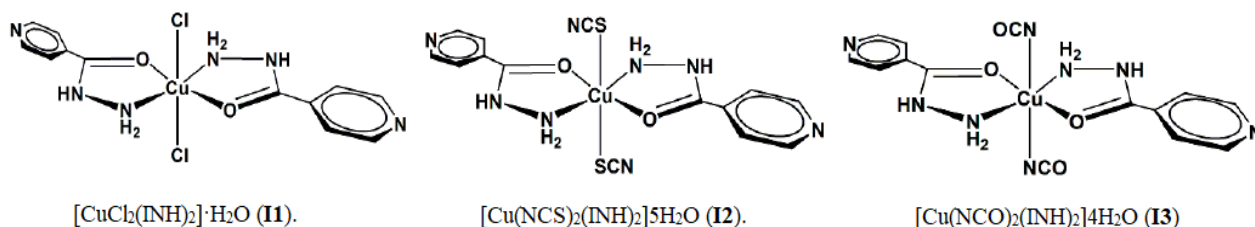
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos complexos metálicos

Os complexos metálicos avaliados neste estudo foram sintetizados e fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Química de Coordenação e Organometálicos do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a responsabilidade da pós-doutoranda Patrícia Bento da Silva.

Os três complexos de Cu(II) com INH, tiveram sua síntese publicada por Silva e colaboradores (2015), bem como a comprovada atividade contra *E. coli*, *S. aureus* (Silva et al., 2015) e *M. tuberculosis* (Silva et al., 2016), nos trabalhos intitulados como: “A Nanostructured Lipid System as a Strategy to Improve the *in Vitro* Antibacterial Activity of Copper(II) Complexes” e “*In Vitro* Activity of Copper(II) Complexes, Loaded or Unloaded into a Nanostructured Lipid System, against *Mycobacterium tuberculosis*”, respectivamente. As estruturas químicas dos complexos avaliados neste estudo estão apresentadas na **Figura 2**.

Figura 2. Estrutura química proposta para os complexos **I1**, **I2** e **I3**



Fonte: Adaptado de: SILVA et al., 2015.

3.2. Síntese das nanopartículas poliméricas

A síntese das NPPs foi realizada no Laboratório de Nanobiomateriais da Universidade Nacional de La Plata – UNLP - Argentina, sob supervisão do Prof. Dr. Guillermo Raul Castro.

Dos complexos de Cu(II), **I1** foi escolhido para o encapsulamento por apresentar melhor solubilidade quando adicionado nas matrizes poliméricas.

As NPPs foram preparadas usando o método de precipitação seguido de ultrassom com os polímeros Eudragit® S100, E100 e NE 30 D (**Figura 3**), sendo nomeadas neste estudo quando na presença de **I1** de NPPS100, NPPE100 e NPPNE30D, respectivamente.

Primeiramente, 50 µL da solução do polímero Eudragit® NE 30 D previamente preparada com água ultra purificada (0,01 g/mL) foram adicionados em 900 µL de etanol absoluto. Enquanto que os polímeros Eudragit® E100 e S100 (0,05 g) foram solubilizados diretamente em etanol absoluto (900 µL). Em seguida, 0,01 g de **I1** inicialmente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL) foram acrescentados em cada solução de polímero e então todas essas preparações foram independentemente adicionadas em 10 mL de Pluronic® F68 a 1% para estabilização.

As formulações permaneceram em agitação constante (600 rpm) até sua dissolução. Posteriormente, foram sonicadas em ultrasonic processor (130W, Cole-Parmer, USA) por 5 minutos em amplitude de 80% em ponta de 3 mm.

As NPPs foram produzidas seguindo todos os procedimentos descritos sem a adição do complexo **I1**, a fim de servir como controle para os diversos parâmetros analisados neste estudo.

Figura 3. Representação ilustrativa dos polímeros Eudragit® NE 30 D (solubilizado em água ultra-purificada), S100 (pó) e E100 (granular)



Fonte: Própria autora

3.2.1. Eficiência de encapsulação (EE%)

As formulações, após serem sonicadas, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos em microtubos ultrafiltration centrifugal device (MWCO 10,000, Microcon, Millipore, MA, USA). Em seguida, foram diluídas em água destilada (1/10) e analisadas

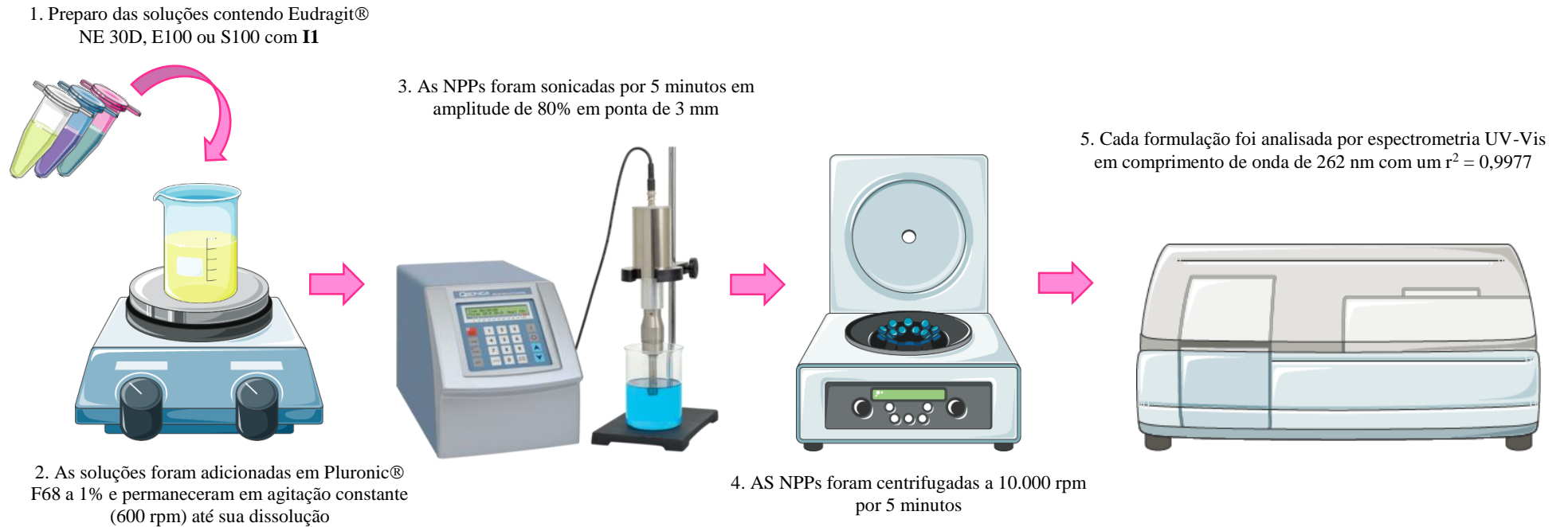
por espectrometria UV-Vis em comprimento de onda de 262 nm com um $r^2 = 0,9977$. A **Figura 4** ilustra o preparo das NPPs para que seja calculado a EE%.

Os cálculos da EE% foram realizados seguindo a fórmula:

$$EE(\%) = \frac{(Q_0 - (Cr \times V)) \times 100}{Q_0}$$

onde Q_0 é a quantidade inicial de **II**, Cr é a concentração de **II** na solução filtrada e V é o volume final após a preparação.

Figura 4. Representação ilustrativa do preparo das nanopartículas poliméricas



Fonte: Própria autora

3.3. Ensaio de liberação

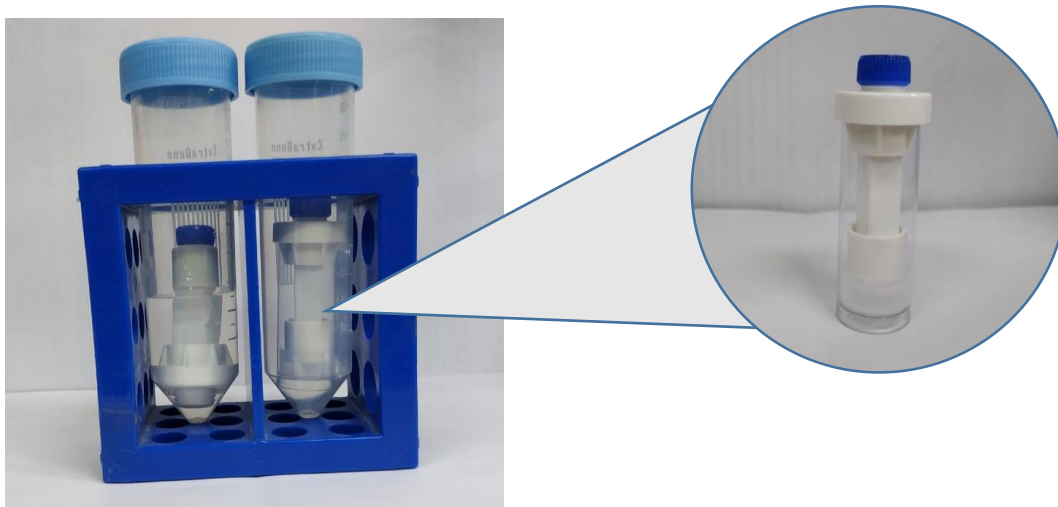
No ensaio de liberação, as formulações NPPS100, NPPE100 e NPPNE30D, bem como o complexo **II** livre (sem encapsulação) foram avaliados.

Cada amostra foi inserida em um dispositivo de liberação (Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2, 100 kDa, MWCO), que por sua vez foram colocados dentro de tubos Falcon contendo 15 mL de solução tampão fosfato (PBS) a 0,1 M, pH = 7,4 para testes alcalinos e solução *Clary Lubs* (CL) a 0,01 M, pH 1,2 para testes ácidos (**Figura 5**).

Os sistemas de liberação permaneceram em um agitador orbital (DLAB - HM100 Pro), a 200 rpm, 37°C, por 48 h.

Alíquotas de cada amostra foram coletadas em intervalos pré-determinados de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48 horas, posteriormente analisadas em espectrômetro UV-Vis (TECAN - infinite M200 Pro).

Figura 5. Sistemas para avaliação da liberação das nanopartículas poliméricas



Fonte: Própria autora

3.3.1. Fatores de diferença e de similaridade

Para avaliação e comparação da cinética e eficiência de liberação das NPPs foram aplicados os testes combinados como os fatores f1 (fator de diferença) e f2 (fator de similaridade). Neste modelo avalia-se a curva como um todo, empregando um método modelo independente simples (ANVISA, 2010), onde é comparado diretamente a

diferença entre a porcentagem de amostra dissolvida para os produtos teste e a referência em uma unidade de tempo (SERRA & STORPIRTIS, 2007).

As concentrações das NPPs foram aferidas em espectrofotômetro UV-Vis (TECAN - infinite M200 Pro) no comprimento de onda de 268 nm para pH ácido e 264 nm para pH básico com auxílio de uma curva de calibração previamente construída garantindo linearidade no intervalo de 18,75 a 300 µg/mL ($r^2 = 0,9999$ para PBS e $r^2 = 0,9988$ para CL).

O f1 indica a porcentagem de diferença entre os dois perfis de dissolução e pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$f1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} * 100$$

onde n = número do tempo; R_t = valor de referência da dissolução do grupo de tempo t; T_t = valor do teste de dissolução do grupo de tempo t.

O f2 é um logaritmo recíproco da transformação da raiz quadrada da soma do erro quadrado e indica a média da similaridade da porcentagem de dissolução entre os dois perfis. É calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$f2 = 50 * \log \{ [(1+1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} * 100 \}$$

onde n = número do tempo; R_t = valor de referência da dissolução do grupo de tempo t; T_t = valor do teste de dissolução do grupo de tempo t.

3.4. Espalhamento dinâmico de Luz

O diâmetro médio das NPPs, o índice de polidispersidade (IPD) e o potencial Zeta (PZ) foram obtidos através da análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) e mobilidade eletroforética das partículas usando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Quando um feixe de luz é lançado através de uma dispersão coloidal, as partículas são capazes de espalhar a luz em todas as direções, permitindo que flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento sejam analisadas através de um detector que

processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calculou-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais através da equação de Stokes-Einstei:

$$D = KT/6\pi\eta Rh$$

sendo que: D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T: temperatura absoluta (293,15 K); π : 3,141592; η : viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}\text{s}$); Rh: raio hidrodinâmico.

As NPPs foram analisadas na célula eletroforética (**Figura 6**) de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas 3 determinações do diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e PZ das partículas de cada amostra (NE 30 D, S100 e E100 diluídas em água ultra-purificada 1:10, 1:50 e 1:100, respectivamente e suas NPPs, a fim de adequar a intensidade de dispersão) após 30 e 60 dias de armazenamento para analisar a estabilidade.

A análise do PZ reflete a carga elétrica entre a superfície da partícula e o meio, e avalia o grau de repulsão/atração entre as partículas adjacentes indicando a estabilidade física de um sistema coloidal (OBEIDAT et al., 2010).

Figura 6. Célula eletroforética



Fonte: Própria autora.

3.5. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)

O complexo metálico **II** e as NPPs com e sem **II** foram analisados em um equipamento Agilent Cary 630 acoplado a um módulo ATR (detector de refletância atenuada). A faixa de varredura usada nas análises foi de 650 a 4000 cm^{-1} . As saídas espectrais foram registradas no modo de transmitância em função do número de onda.

3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

20 μL das NPPs previamente diluídas em água ultra purificada (1:10) junto com uma gota de ácido fosfotúngstico para melhorar o contraste da imagem foram espalhados sobre uma grade de Cu revestida com colódio (malha 400) e analisados no microscópio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, MA, EUA).

3.7. Atividade antimicobacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM_{90}) das amostras frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi determinada pelo ensaio de microtitulação com resazurina (REMA - *Resazurin Microtiter Assay*) descrito por Palomino e colaboradores (2002).

As NPPs com e sem **II** foram diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco / Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) suplementado a 10% com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), em uma proporção de 50% v/v, a fim de obter concentrações de **II** nas NPPs de 4,78 a 1223 $\mu\text{Mol/L}$.

A rifampicina (Sigma-Aldrich®) solubilizada em DMSO foi usada como controle do experimento em concentrações de 0,004-1,0 $\mu\text{g/mL}$. Esta foi escolhida por ser fármaco padrão da terapia preconizada.

Uma suspensão de *M. tuberculosis* cultivada em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC por, aproximadamente, 10 dias, foi ajustada a partir da concentração de 1 Mc Farland para 10^5 UFC/mL e foram adicionados 100 μL do inóculo a cada poço de uma microplaca de 96 poços juntamente com 100 μL das amostras-teste.

As placas foram incubadas em estufa por 7 dias a 37 °C e atmosfera a 5% de CO_2 . No sétimo dia, foram adicionados 30 μL de resazurina a 0,01%, solubilizada em água. A

fluorescência dos poços foi lida após 24 h utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®). A CIM₉₀ foi definida como a menor concentração na qual houve 90% de inibição do crescimento das bactérias.

3.8. Atividade citotóxica

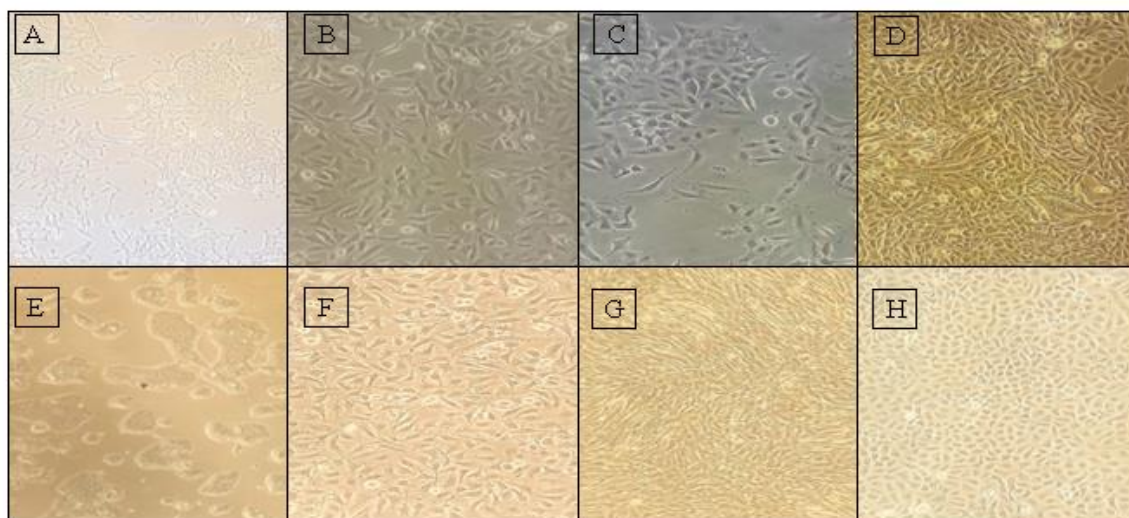
Os ensaios de citotoxicidade também foram realizados utilizando-se como substância reveladora o cloridrato de resazurina (Sigma), realizado segundo o protocolo descrito por Pagé et al. (1993) e indica o status do perfil metabólico celular.

3.8.1. Linhagens celulares

As linhagens utilizadas neste estudo (**Figura 7**) foram obtidas no Laboratório de Micobacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma - Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco), constituindo o denominado "meio de cultura completo". As linhagens foram repicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

- GM07492 (Esta linhagem foi cedida gentilmente por Denise Crispim Tavares, Universidade de Franca, São Paulo, Brasil), fibroblastos não transformantes;
- MRC-5 (ATCC® CCI-171™), fibroblastos normais de pulmão humano;
- HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC® CRL-1730™), endotélio vascular – cordão umbilical;
- A549 (ATCC® CCL-185™), adenocarcinoma pulmonar;
- HepG2 (ATCC® HB-8065™), carcinoma hepatocelular humano;
- HeLa (ATCC® CCI-2™), adenocarcinoma cervical humano;
- MCF-7 (ATCC® HTM-22™), adenocarcinoma mamário humano;
- Caco-2 (BCRJ nº 0059), adenocarcinoma coloretal humano.

Figura 7. Fotomicrografias das linhagens celulares utilizadas neste estudo. **(A)** GM07492; **(B)** HepG2; **(C)** A549; **(D)** MRC-5; **(E)** Caco-2; **(F)** HU-VE-C; **(G)** MCF-7; **(H)** HeLa



Fonte: Própria autora

Até o momento do uso, as linhagens foram mantidas congeladas (-80°C) em tubos criogênicos (alíquota) contendo SFB e 5 % de DMSO.

Para o descongelamento das células, o vial criogênico retirado do -80°C permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrifugação estéril (15 mL) contendo 2 mL de meio de cultura completo e submetido à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* ressuspensionado foi acrescentado 2 mL de meio. A suspensão celular foi transferida para uma nova garrafa de cultivo, a qual foi incubada nas condições previamente descritas até atingir a confluência celular.

Para a tripsinização, após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando-se tripsina (Gibco-Invitrogen). Após o desprendimento das células, 2 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco para a inativação da tripsina e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos de cultura contendo 5 mL de meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de saturação de umidade) até a preparação da próxima subcultura.

Para a realização do teste, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço seguida de incubação por 24 h para adesão celular.

Para os tratamentos, os complexos foram pesados e solubilizados em meio DMEM, sem SFB em uma concentração inicial de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ contendo 5% de DMSO que equivale a 24.460 $\mu\text{mol/L}$ para **I1**, 18.370 $\mu\text{mol/L}$ para **I2** e 20.240 $\mu\text{mol/L}$ para **I3**. Em seguida, foram diluídos em meio de cultura completo para a realização dos testes. A escolha das concentrações foi baseada em testes preliminares, a fim de observar uma curva dose resposta das concentrações avaliadas.

Os complexos **I1**, **I2** e **I3** foram avaliados frente as 8 linhagens celulares propostas, enquanto que as NPPs foram avaliadas somente frente as células GM07492 e HepG2 nos tempos de tratamento de 24 e 48 h, nas concentrações de 19,1 a 1223 $\mu\text{mol/L}$ de **I1** nas NPPs.

As células também foram tratadas com DMSO (0,5% - controle solvente dos complexos), NPPs sem **I1** (controle para as NPPs) e azida sódica (200 $\mu\text{g/mL}$ – controle positivo). Tivemos poços com células sem qualquer tratamento (controle negativo), além do controle de esterilidade e falso-positivos de óxido-redução, ou seja, poços com complexos sem células.

Após 24 h com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e 50 μL de solução aquosa de resazurina a 0,04 mM foram adicionados. As microplacas foram novamente incubadas (2 a 4 h) e por fim, realizou-se a leitura no leitor de microplacas Cytation (Biotek®), onde foram utilizados filtros de excitação (530 nm) e emissão (590 nm).

3.9. Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) pode ser calculado dividindo o valor de IC₅₀ pelo valor da CIM₉₀. Um IS maior ou igual a 10 indica que o composto-teste pode ser aplicado em uma concentração dez vezes maior que o valor da CIM sem exibir citotoxicidade (ORME, 2001).

3.10. Atividade mutagênica

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron & Ames (1983), cinco diferentes concentrações das NPPs foram avaliadas. Neste estudo, foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium*, em experimentos sem e com ativação metabólica.

Com auxílio de alça de inoculação, uma pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37°C, por 14-16 horas, em shaker incubador (37°C – 100 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁹ bactérias/mL.

As concentrações das NPPs (152,9 – 2446 µmol/L) foram adicionados 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37°C por 20 - 30 minutos.

A fração microssomal S9, um homogeneizado de fígado de rato *Sprague Dawley*, foi adquirida sob a forma liofilizada da Moltax Molecular Toxicology Inc., Boone, USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril (MARON & AMES, 1983).

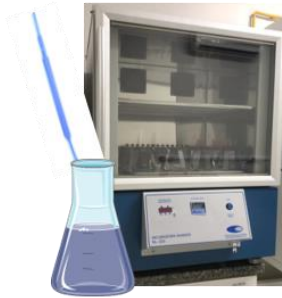
Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top agar” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao final desse período foi realizada manualmente a

contagem do número de colônias revertentes por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A **figura 8** é um esquema representativo do teste.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram 4 -nitro-o-fenilenodiamina (10 µg / placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg /placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg / placa) para TA102. 2-aminoantraceno (1,25 µg / placa) foi utilizado para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/ placa), para TA102 nos experimentos com ativação metabólica. Além disso, foram incluídos o controle espontâneo (sem qualquer tratamento) referente a taxa de reversão espontânea de cada linhagem e as NPPs sem **I1** (100 µL)

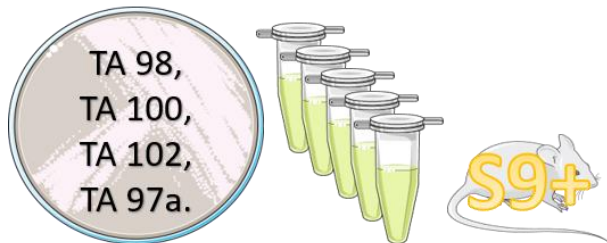
Figura 8. Representação esquemática do Teste de Ames

1. Incubação a 37°C por 14-16 horas:

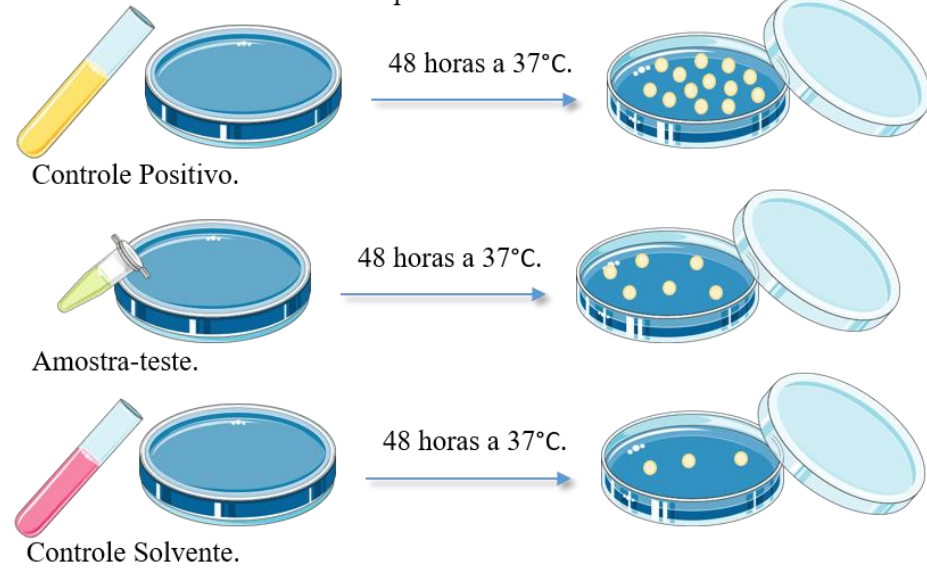


2. Tratamentos :

- Amostra-teste (5 Concentrações)
- Controle Positivo
- Controle Espontâneo
- Controle Solvente
- Tampão ou S9+

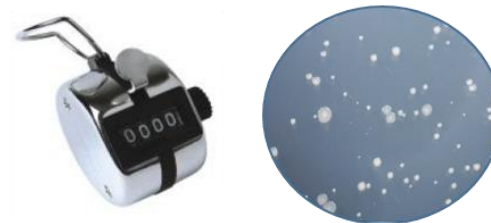


3. Plaqueamento:



4. Contagem:

As colônias revertentes são contadas manualmente.



Fonte: Própria autora

3.11. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos da atividade mutagênica pelo Teste de Ames foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV*, versão 1.0, do *Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM for maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Os demais dados foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 5; os resultados de DLS por análise de variância *t test (and nonparametric tests)* e os resultados de citotoxicidade utilizando análise de variância *One-way Anova* para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$. Os testes de citotoxicidade foram feitos em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como uma porcentagem do controle negativo (meio de cultura completo) que foi considerado 100%. Além disso, foi calculado o IC_{50} de acordo com *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* que representa a concentração requerida do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento celular, mediante ao *software GraphPad Prism 5*.

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade dos Complexos metálicos de Cobre

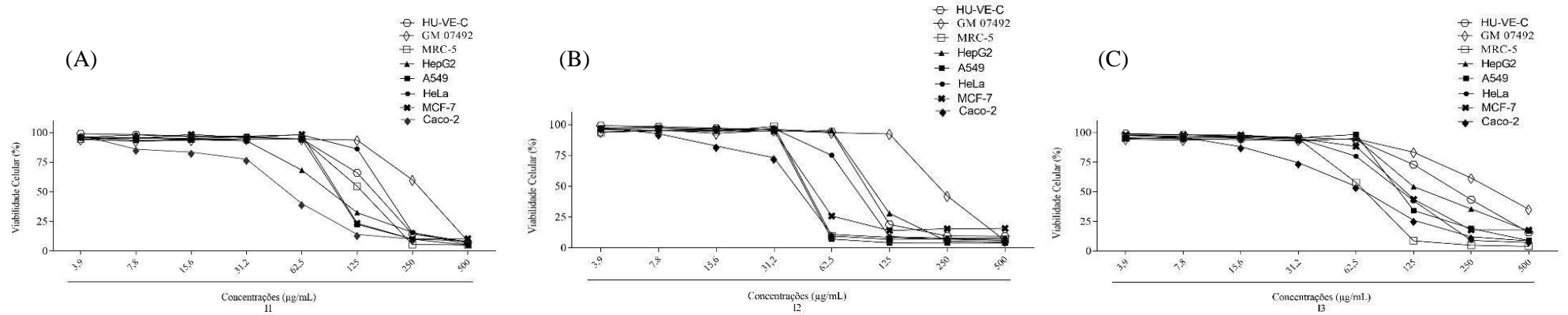
A **Figura 9** mostra a média da viabilidade frente às linhagens celulares após os tratamentos com as diferentes concentrações dos complexos de Cu(II) **I1** (A), **I2** (B) e **I3** (C), que variaram de 3,9 a 500 µg/mL.

De acordo com os resultados obtidos, os complexos apresentaram perfil de citotoxicidade variado, sendo que frente a maioria das células, o complexo **I2** (**Figura 9B**) mostrou-se o mais citotóxico.

Com relação ao complexo **I1**, a linhagem mais sensível foi a intestinal Caco-2 com diferença estatisticamente significativa comparado ao controle negativo a partir da concentração de 7,8 µg/mL. No entanto, acima de 31,25 µg/mL, essa viabilidade foi reduzida a de 70%. Sobre as outras células, **I1** induziu citotoxicidade nas concentrações acima de 125 µg/mL, exceto frente a MRC-5 que foi somente em 250 e 500 µg/mL e HepG2 que foi a partir de 62,5 µg/mL (**Figura 9A**).

I2 reduziu principalmente a viabilidade das células A-549 e Caco-2 a partir das concentrações de 3,9 e 7,8 µg/mL, respectivamente (**Figura 9B**). Enquanto que **I3** foi o menos citotóxico, sendo que a redução na viabilidade foi no máximo na concentração de 31,25 µg/mL para as células Caco-2 e HeLa (**Figura 9C**).

Figura 9. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações dos complexos de Cu(II) **I1** (A), **I2** (B) e **I3** (C)



Os valores são apresentados como média da viabilidade celular. Controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); Controle positivo (Azida Sódica 200 µg/mL; viabilidade celular de 1,68% em GM07492, 0,93% em MRC-5, 0,92% em HU-VEC, 0,69% em HepG2, 0,77% em HeLa, 0,74% em A549, 0,56% em MCF-7 e 1,02 em Caco-2.).

Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos, foi calculado o IC_{50} dos diferentes complexos. Os dados de média e desvio-padrão apresentados na **Tabela 2** mostram que o padrão de citotoxicidade foi **I2>I1>I3**, frente a maioria das células. A célula mais resistente para os três complexos foi a linhagem normal de fibroblastos GM07492 com IC_{50} acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ e a mais sensível foi a linhagem tumoral Caco-2, com menor IC_{50} de $38,4 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ para o complexo **I2**. O sal CuCl_2 utilizado para preparar os complexos também foi avaliado, demonstrando citotoxicidade contra todas as linhagens testadas, com menor IC_{50} para a linhagem normal MRC-5 de $22,2 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$. Os valores de IC_{50} convertidos em $\mu\text{mol/L}$ também estão representados na **Tabela 2**.

Os resultados referentes a avaliação da citotoxicidade dos complexos **I1**, **I2** e **I3** encontram-se no manuscrito intitulado *Cyto-genotoxic evaluation of novel anti-tubercular Copper (II) complexes containing isoniazid-based ligands* submetido para publicação no periódico *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Tabela 2. IC₅₀ dos complexos e sal de Cu(II) sobre as linhagens celulares testadas

IC ₅₀ (µg/mL)								
	GM07492	MRC-5	HU-VE-C	HepG2	A-549	Caco-2	HeLa	MCF-7
CuCl₂	58,9 ± 1,7	22,2 ± 1,6	52,4 ± 0,7	58,6 ± 4,8	36,2 ± 2,2	91,2 ± 3,9	122,0 ± 0,8	82,5 ± 1,3
I1	275,2 ± 9,8	130,2 ± 2,7	152,0 ± 11,3	92,2 ± 8,5	100,8 ± 4,0	51,4 ± 5,1	179,3 ± 0,9	105,8 ± 0,5
I2	232,2 ± 25,8	49,0 ± 0,8	98,0 ± 1,1	105,2 ± 4,5	46,0 ± 1,8	38,4 ± 1,5	78,6 ± 0,7	51,9 ± 2,7
I3	344,6 ± 17,6	68,0 ± 3,8	214,9 ± 4,4	173,8 ± 43,8	112,2 ± 0,6	66,8 ± 10,0	109,2 ± 2,2	124,4 ± 1,5
IC ₅₀ (µmol/L)								
	GM07492	MRC-5	HU-VE-C	HepG2	A-549	Caco-2	HeLa	MCF-7
CuCl₂	438,1 ± 12,6	165,1 ± 11,9	389,7 ± 5,2	435,8 ± 35,7	269,2 ± 16,4	678,3 ± 29,0	907,4 ± 5,9	613,6 ± 9,7
I1	673,3 ± 23,9	318,6 ± 6,6	371,9 ± 27,6	225,6 ± 20,8	246,6 ± 9,8	125,8 ± 12,5	438,7 ± 2,2	258,9 ± 1,2
I2	426,7 ± 47,4	90,0 ± 1,5	180,1 ± 2,0	193,3 ± 8,3	84,5 ± 3,3	70,6 ± 2,7	144,4 ± 1,3	95,4 ± 4,9
I3	697,7 ± 35,6	137,7 ± 7,7	435,1 ± 8,9	351,9 ± 88,7	227,2 ± 1,2	135,2 ± 20,2	221,1 ± 4,4	251,9 ± 3,04

CuCl₂: Cloreto de Cobre, sal metálico dos complexos I1, I2 e I3; GM07492: Fibroblastos não transformante; MRC-5: Fibroblastos normais de pulmão humano; HU-VE-C: linhagem de endotélio vascular – cordão umbilical; HepG2: carcinoma hepatocelular humano; A549: linhagem de adenocarcinoma pulmonar; Caco-2: adenocarcinoma coloretal humano; HeLa: adenocarcinoma cervical humano; MCF-7: adenocarcinoma mamário humano.

4.2. Caracterização das nanopartículas poliméricas

A **Tabela 3** apresenta os valores das médias e os desvios-padrão dos diâmetros hidrodinâmicos, o IPD e PZ das NPPs com e sem **I1**, além dos valores obtidos do cálculo da EE%.

Em geral, o tamanho das partículas variou de 65,4 a 735,5 nm; as menores com NE 30 D e as maiores com S100. De acordo com os resultados obtidos, podemos observar um aumento estatisticamente significativo no diâmetro hidrodinâmico das NPPs após a incorporação de **I1**.

NPPNE30D mostrou uma EE de $26,3 \pm 5,7\%$, NPPS100 de $22,6 \pm 0\%$ e NPPE100 de $94,5 \pm 2,2\%$.

Com relação ao IPD, os valores diminuíram com a incorporação de **I1**, demonstrando que a sonicação reduziu a agregação e produziu NPPs monodispersas principalmente na formulação com NE 30 D.

Os valores do PZ apresentaram flutuações de -24,5 a 56,5 mV. Um alto valor de PZ, como observado nas formulações do presente estudo, seja ele positivo ou negativo, indica que as NPPs em suspensão apresentam tendência a se repelir (LUXBACHER, 2014).

As análises de 30 e 60 dias mostraram uma diferença estatística entre o diâmetro hidrodinâmico somente da NPPS100. Quanto ao IPD e ao PZ, a NPPE100 e as NPPs de E100 e S100 sem **I1** demonstraram uma instabilidade na amostra de acordo com o tempo de armazenamento, pois foram diferentes estatisticamente comparando os períodos de análise.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão do diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) para as NPPs com e sem **I1**, bem como da eficiência de encapsulação (EE%)

Dias	Diâmetro (nm)		IPD		PZ (m.V)		EE(%)
	Com I1	Sem I1	Com I1	Sem I1	Com I1	Sem I1	
NE 30D							
30	181,5±2,2 ^a	82,3±0,1 ^b	0,165±0,005 ^a	0,261±0,006	28,8±0,4 ^a	-24,5±1,0	26,3 ± 5,7
60	-	65,4±0,3 ^b	-	0,263±0,01	-	-18,8±3,9	
E100							
30	319,5±68,2	304,4±9,6	0,597±0,004 ^{a, b}	0,35±0,02 ^b	49,9±0,5 ^{a, b}	18,7±0,3 ^b	94,5 ± 2,2
60	302,4±16,6	299,4±17,2	0,353±0,01 ^{a, b}	0,506±0,06 ^b	56,5±2,78 ^b	44,9±0,5 ^b	
S100							
30	735,5±50,7 ^{a, b}	517,9±48,7	0,409±0,04	0,445±0,03 ^b	-12,6±0,6 ^a	-6,9±0,05 ^b	22,6 ± 0
60	696,4±53,6 ^b	569,6±82,7	0,334±0,04 ^a	0,601±0,1 ^b	-11,1±0,5 ^a	-21,5±0,4 ^b	

NPPs: nanopartículas poliméricas; I1: complexo metálico [CuCl₂(INH)₂].H₂O

IPD: índice de polidispersidade; PZ: Potencial Zeta; EE(%): eficiência de encapsulação; (-): não avaliado

^a estatisticamente diferente da nanopartícula polimérica sem **I1**;

^b com diferença estatística entre os tempos de análise

A morfologia das NPPs recém preparadas foi analisada por MET (**Figura 10**) e os resultados estão de acordo com a representação gráfica obtida por DLS, com a capacidade de demonstrar populações (**Figura 11**). As imagens revelaram que as NPPNE30D e NPPE100 exibem formas esféricas. A formulação com NE 30 D apresentou uma única população, sendo, portanto, mais homogênea, enquanto que em NPPE100 uma segunda população foi expressa, visualmente com mais agregados na microscopia. As imagens observadas da NPPS100 apresentaram aglomerações, com algumas formas de bastonetes, não sendo possível definir com clareza a morfologia, o que dificulta a quantificação. Na representação gráfica foi possível identificar três populações, sendo uma delas mais discreta.

O diâmetro das partículas obtido por MET foi de $168 \pm 21,7$ nm para NPPNE30D, $224 \pm 70,9$ nm para NPPE100 e $567 \pm 175,3$ nm para NPPS100.

Figura 10. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (A) NPPNE30D; (B) NPPE100; (C) NPPS100

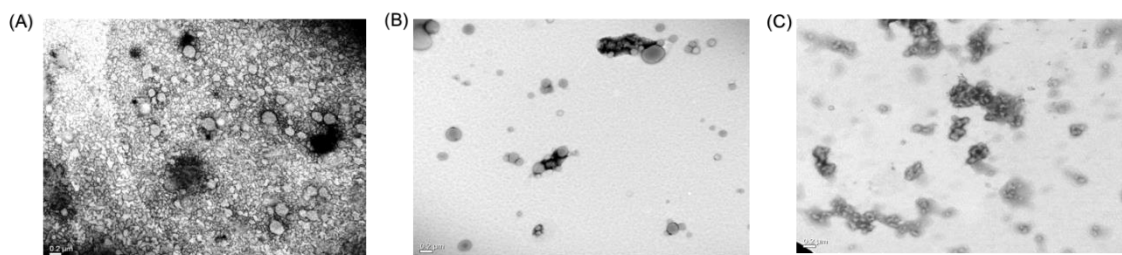
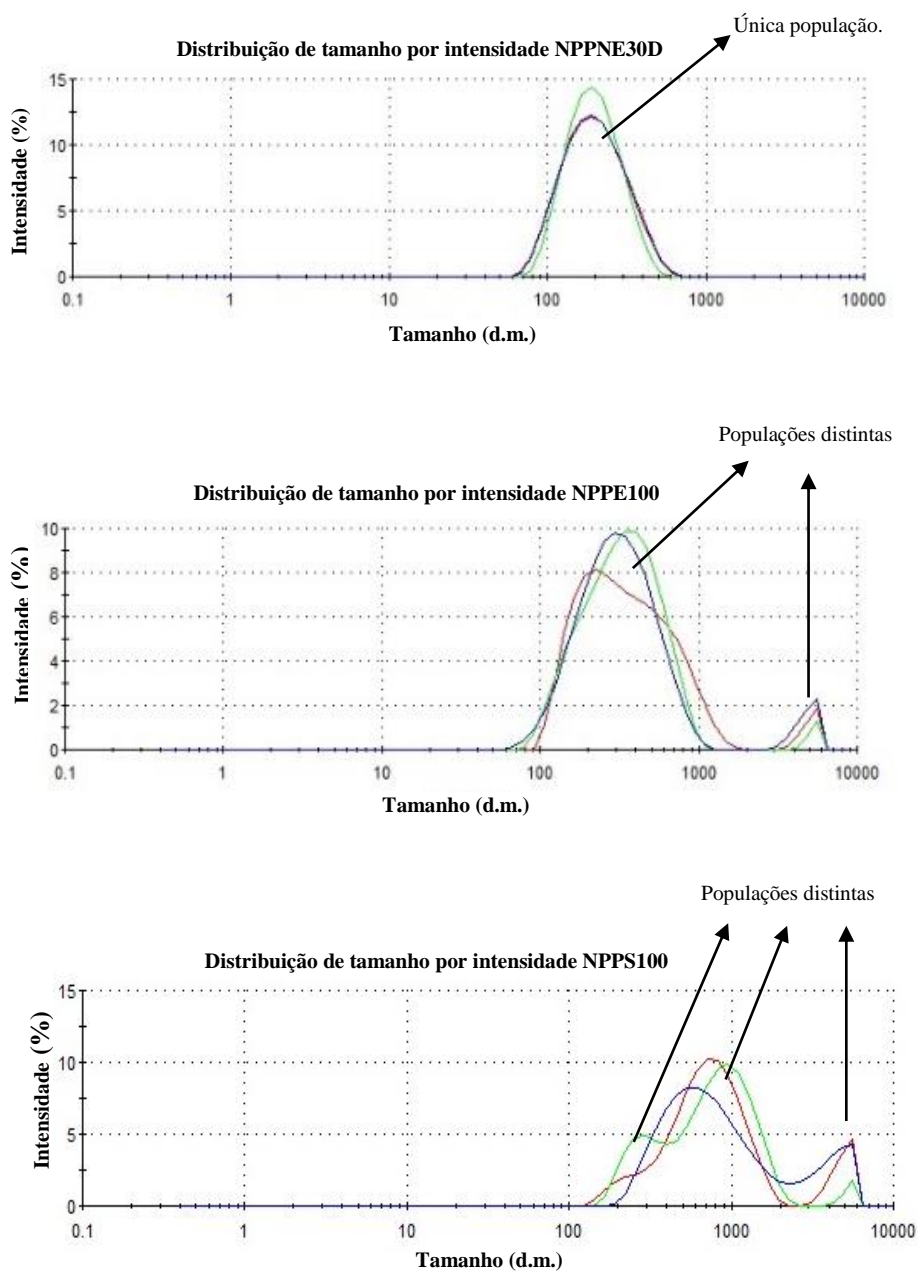


Figura 11. Distribuição das partículas e seu tamanho de acordo com a intensidade (A) NPPNE30D; (B) NPPE100; (C) NPPS100



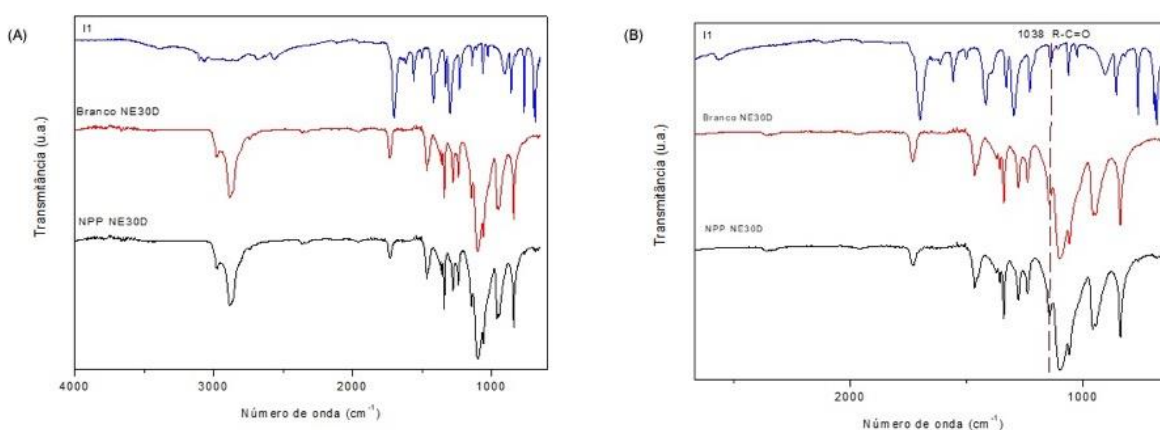
As análises obtidas por FTIR do complexo **I1** e NPPs com e sem **I1** estão apresentadas nas **Figuras 12-14**. As análises foram realizadas com as formulações obtidas sem qualquer etapa prévia de filtração, contendo, dessa maneira, **I1** livre e encapsulado, como já apresentado nos resultados da EE%.

O espectro do complexo **I1** indicou a presença de grupamentos químicos C-Cl através da vibração dos picos na região de 698 cm^{-1} , -CH_2 em 765 cm^{-1} , C-O-C em 1063 cm^{-1} , C-NH em 1498 e 1558 cm^{-1} , -NH_2 em 1608 cm^{-1} , C=O em 1618 cm^{-1} e em 1720 cm^{-1} (**Figuras 13-15**).

A matriz polimérica NE 30 D foi evidenciada pela presença da vibração das ligações relacionadas aos grupamentos químicos R-C=O na banda próxima a 1062 cm^{-1} , -C-O-H em 1101 cm^{-1} , -OH em 1343 cm^{-1} e, CH_2 e CH_3 em 2879 a 2972 cm^{-1} (**Figura 12**).

Em NPPNE30D podemos observar os picos referentes à matriz polimérica sobressalentes ao do complexo metálico. O pico que provavelmente evidencia a presença de **I1** na formulação encontra-se na zona de 1064 cm^{-1} . No entanto, a maioria dos picos correspondentes a **I1** também são observados na matriz, o que dificultou a análise (**Figura 12**), não sendo possível observar diferenças entre os picos da NPPNE30D com a NPP sem **I1**.

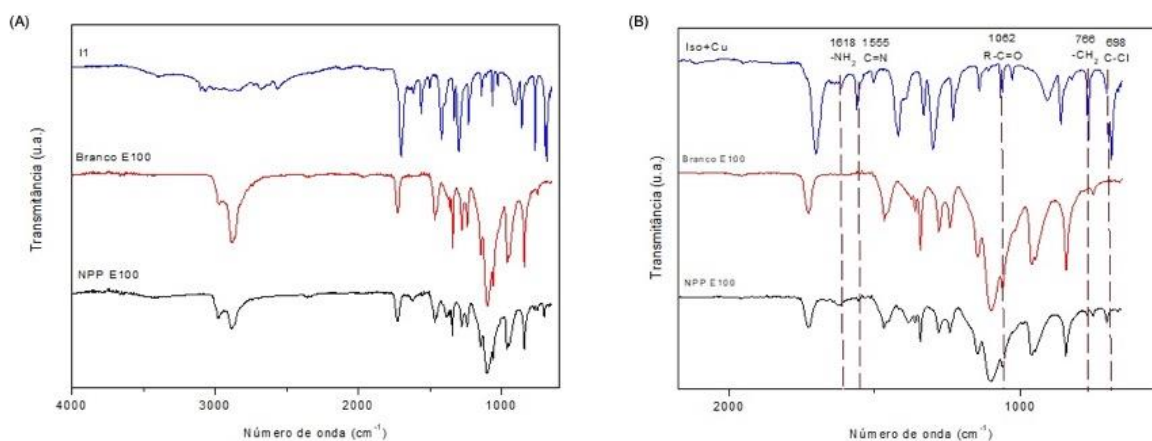
Figura 12. Espectros do complexo metálico de Cu(II) **I1** e das NPPs de NE30D com e sem **I1** obtidos pela técnica FTIR



Com relação a matriz polimérica composta por E100, o espectro indicou a presença da vibração das ligações referentes aos grupamentos químicos C-O-C na região de 1101 cm^{-1} , C=O em 1237 e 1729 cm^{-1} , -OH em 1339 cm^{-1} e CH_2 e CH_3 em 2877 a 2976 cm^{-1} (**Figura 13**).

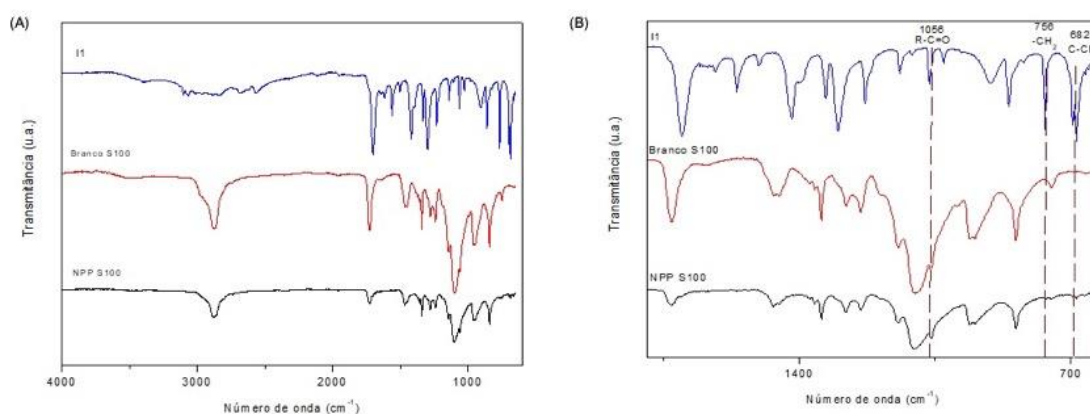
Quando comparados os espectros da NPPE100 com a NPP sem **II**, foi possível observar os picos referentes à matriz polimérica com representação majoritária (EE% 94,5%) no espectro e também a presença de picos provenientes do complexo metálico. Os picos indicativos da presença de **II** no espectro encontram-se nas regiões de 698, 766, 1062, 1555 e 1618 cm^{-1} . Os resultados indicam a somatória dos picos da NPP sem **II** (visualmente claro) com o complexo **II** (**Figura 13**). Além destas observações, no espectro da NPPE100 verifica-se o surgimento de um pico na região de 1618 cm^{-1} (**Figura 14**), indicativo do deslocamento do pico de 1697 cm^{-1} de **II**, sugerindo a possibilidade de interação dos COOH do complexo com a matriz, possivelmente por ligações de hidrogênio.

Figura 13. Espectros do complexo metálico de Cu(II) **II** e das NPPs de E100 com e sem **II** obtidos pela técnica FTIR



Sobre S100, o espectro da matriz polimérica indica a presença da vibração das ligações referentes aos grupamentos químicos C-O-H na região de 1101 cm^{-1} , -OH em 1341 cm^{-1} , -C=O em 1239 e 1729 cm^{-1} , CH₂ em 1455 cm^{-1} e, CH₂ e CH₃ em 2870 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} (**Figura 14**). Na NPPS100, os picos referentes à matriz S100 são predominantes. As bandas indicativas da presença de **I1** são identificadas nas regiões 682 e 762 cm^{-1} , além de ser possível observar o deslocamento dos picos relativos ao espectro de **I1**, sugerindo a interação química entre os componentes da amostra (**Figura 14**).

Figura 14. Espectros do complexo metálico de Cu(II) **I1** e das NPPs de S100 com e sem **I1** obtidos pela técnica FTIR



Para a realização do experimento de liberação, alíquotas das amostras foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48 horas em soluções com pH ácido e alcalino. Para avaliar e comparar a cinética e eficiência de liberação das NPPs foram aplicados os testes combinados como os fatores f1 (fator de diferença) e f2 (fator de similaridade).

De acordo com os dados da literatura, a semelhança ou equivalência de dois perfis é observada quando os valores de f1 se apresentarem entre 0 e 15 e os de f2 entre 50 e 100 (SERRA & STORPIRTIS, 2007; ANVISA, 2010). Os valores obtidos neste estudo após os cálculos estão apresentados na **Tabela 4**.

De acordo com os resultados apresentados nas **Figuras 15 e 16**, pode-se observar uma maior taxa de liberação no período de 1 h para todas amostras avaliadas, indicando uma característica de liberação rápida.

Em pH ácido, na primeira hora de liberação, a NPPNE30D (carga neutra) apresentou uma porcentagem de liberação de 29%, enquanto que em pH alcalino foi de

29,6%. O alto desvio padrão observado no gráfico da NPP em pH alcalino deve-se a instabilidade no meio (**Figura 15 A**).

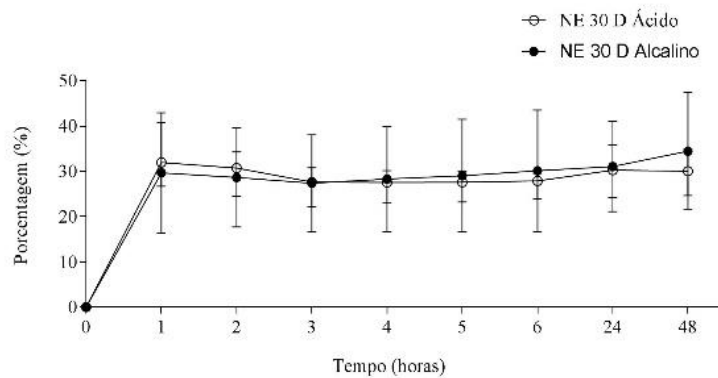
De maneira semelhante, em NPPS100 (polímero aniônico) podemos observar que a maior liberação também foi em pH ácido com aproximadamente 44% e 28% em pH alcalino (**Figura 15 B**).

Com relação aos fatores de similaridade, f_1 foi de 20,7 para NPPNE30D e 15,6 para NPPS100, ou seja, um pouco acima do esperado, mas f_2 foi de 60,3 para NPPNE30D e 66,7 para NPPS100, demonstrando que o pH pouco interfere no perfil de liberação das NPPNE30D e NPPS100 (**Tabela 4**).

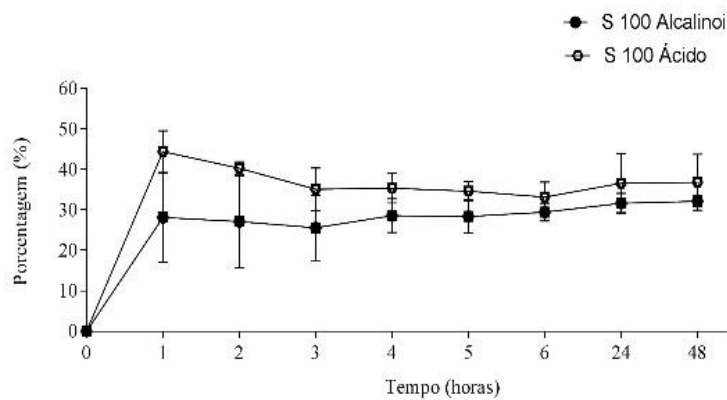
Já NPPE100 (polímero catiônico), em pH ácido, a porcentagem de liberação foi cerca de 30,9% enquanto que em pH alcalino foi de 7,93% (Figura 16 C). f_1 foi de 100 e f_2 36,3, indicando uma diferença no perfil de liberação dependente do pH (**Tabela 4**).

Figura 15. Ensaio de liberação comparando as NPPs em pH alcalino e ácido. **(A)** NPPNE30D; **(B)** NPPS100; **(C)** NPPE100

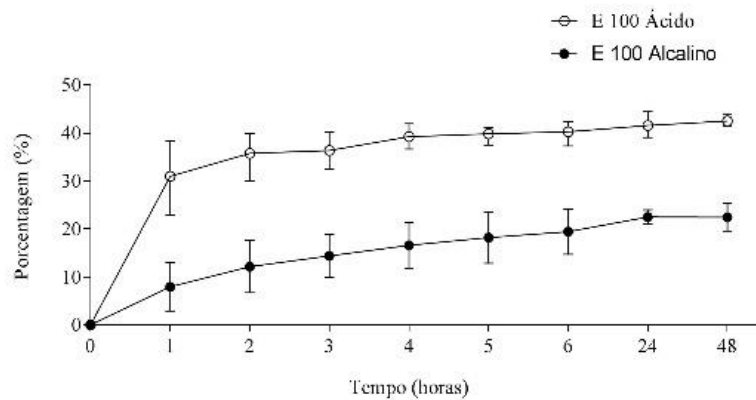
A



B



C



Com relação ao complexo **II**, em pH ácido, a liberação foi de 39% e em pH alcalino de 2,88%.

Comparando o perfil de liberação da NPPNE30D com o do complexo **II**, em pH alcalino, f_1 foi de 100 e f_2 de 31,9, caracterizando, dessa maneira, a diferença entre os perfis de liberação, já em pH ácido, f_1 foi de 18,5, um pouco acima do esperado, no entanto f_2 foi de 62,5, ou seja, dentro dos parâmetros de similaridade (**Tabela 4, Figura 16 I**). Assim como NPPS100, que em pH alcalino, f_1 foi de 100 e f_2 36,6, apresentando diferença e em pH ácido, f_1 foi de 6,0 e f_2 de 82,1, mostrando semelhança entre os perfis de liberação (**Tabela 4, Figura 16 II**).

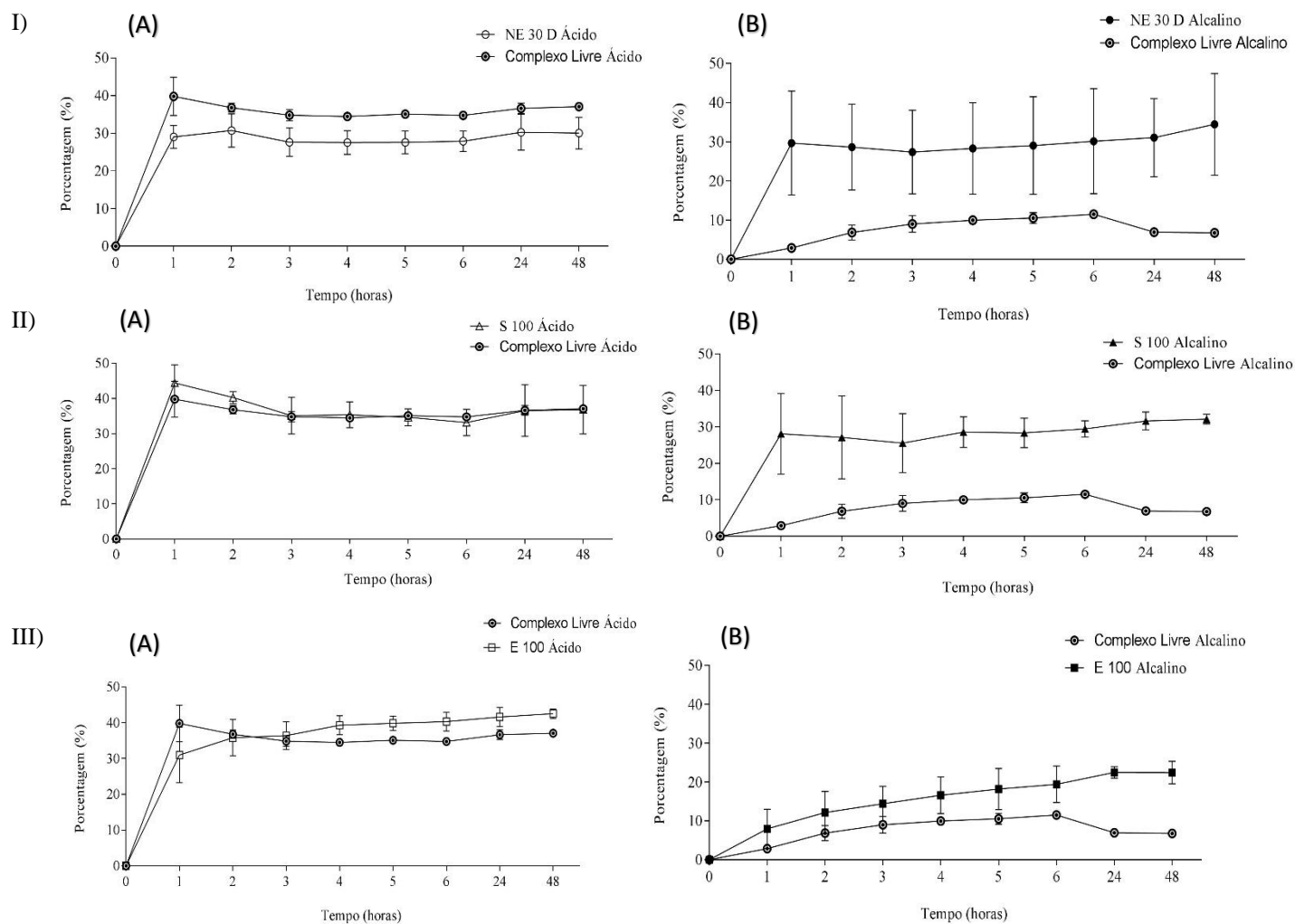
A NPPE100 em comparação ao complexo **II**, em pH alcalino, f_1 foi de 86,3 e f_2 58,3, enquanto que em pH ácido, f_1 foi de 12,5 e f_2 69,3, demonstrando maior similaridade em pH ácido do que em pH alcalino (**Tabela 4, Figura 16 III**).

Tabela 4. Representação dos valores obtidos após aplicação do fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2) referentes as nanopartículas poliméricas

Cinética I	Cinética II	f_1	f_2
NE 30 D Alcalino	II Alcalino	100,0	31,9
NE 30 D Ácido	II Ácido	18,5	62,5
NE 30 D Ácido	NE 30 D Alcalino	20,7	60,3
S 100 Alcalino	II Alcalino	100,0	36,6
S 100 Ácido	II Ácido	6,0	82,1
S 100 Ácido	S 100 Alcalino	15,6	66,7
E 100 Alcalino	II Alcalino	86,3	58,3
E 100 Ácido	II Ácido	12,5	69,3
E 100 Ácido	E 100 Alcalino	100,0	36,3

f_1 :fator de diferença; f_2 :fator de similaridade; NE 30 D: Nanopartícula composta pela matriz polimérica de Eudragit®NE 30 D; S 100: Nanopartícula composta pela matriz polimérica de Eudragit® S 100; E100: Nanopartícula composta pela matriz polimérica de Eudragit®E 100.

Figura 16. Ensaio de liberação das NPPs (I) NE 30D, (II) S100 e (III) E100 comparado ao complexo metálico de Cu(II) **II** em pH ácido e em pH alcalino



4.3. Atividades biológicas in vitro

As NPPs com e sem **II** foram avaliadas contra *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) pelo método REMA e os resultados da CIM₉₀ e o IS estão apresentados na **Tabela 5**.

As NPPs de Eudragit® S100, com ou sem **II**, não demonstraram atividade contra *M. tuberculosis*, dessa maneira, não foi possível calcular o IS. No entanto, a CIM₉₀ da NPPNE30D foi de $15,62 \pm 13,27$ $\mu\text{mol/L}$ e da NPPE100 de $1,53 \pm 1,90$ $\mu\text{mol/L}$. Quando as NPPs foram avaliadas sem **II**, NE30D não demonstrou atividade antimicobacteriana, mas E100 apresentou CIM₉₀ de $0,71 \pm 0,88$ $\mu\text{mol/L}$.

Os resultados de IC₅₀ das NPPs também estão apresentados na **Tabela 5**. As NPPs foram avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico frente as linhagens celulares humanas GM07492 e HepG2 nos tempos de tratamento de 24 e 48 h por meio de ensaio de viabilidade celular da resazurina (**Figuras 17-19**).

De acordo com os resultados obtidos, as NPPs apresentaram um potencial citotóxico variado, sendo que as produzidas com E100 foram as mais citotóxicas (**Figura 17**) nas condições experimentais utilizadas neste estudo, com IC₅₀ menor que 19,1 $\mu\text{mol/L}$ (menor concentração avaliada) em GM07492 e HepG2, tanto com 24 quanto com 48 h de tratamento (**Tabela 5**). Apesar da promissora atividade antimicobacteriana observada, as NPPE100 não demonstraram seletividade, induzindo também uma forte redução na viabilidade de células eucarióticas.

Com relação as produzidas com NE30D, os valores de IC₅₀ frente as células GM07492 foram de $569,6 \pm 6,9$ $\mu\text{mol/L}$ (24 h) e $56,5 \pm 7,4$ $\mu\text{mol/L}$ (48h) e HepG2 de $414,6 \pm 19,2$ $\mu\text{mol/L}$ (24 h) e $65,7 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/L}$ (48 h) (**Tabela 5**). Dessa maneira, os valores de IS foram 36,47 (GM07492-24h), 26,5 (HepG2-24h), 3,6 (GM07492-48h) e 4,2 (HepG2-48h) (**Tabela 5**), demonstrando ser um promissor candidato para o tratamento da tuberculose. Em 24 h de tratamento, induziram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular de GM07492 até na concentração de 152,8 $\mu\text{mol/L}$, e HepG2 até 76,4 $\mu\text{mol/L}$, enquanto que com 48 h, a redução estatisticamente significativa foi em todas as concentrações testadas em ambas as células quando comparado ao controle negativo (**Figura 18**).

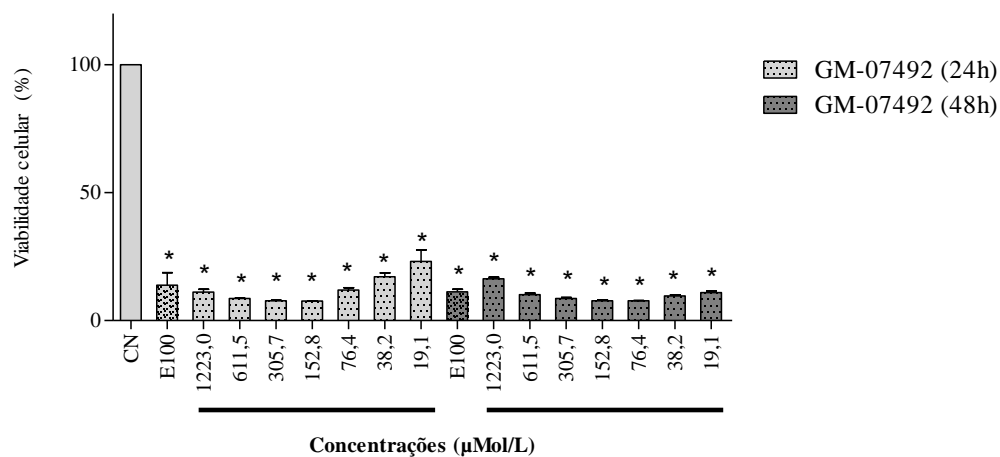
Sobre NPPS100, o perfil de citotoxicidade foi menor comparado a NPPE100 e NPPNE30D. Os valores de IC₅₀ foram de $642,4 \pm 23,6$ $\mu\text{mol/L}$ (24 h) e $517,5 \pm 28,7$

$\mu\text{mol/L}$ (48h) frente a GM07492 e $457,0 \pm 52,9 \mu\text{mol/L}$ (24 h) e $270,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$ (48 h) frente a HepG2 (**Tabela 5**). No entanto, a mesma não induziu qualquer potencial antimicrobacteriano. De acordo com a análise estatística, a viabilidade celular de GM07492 (24 h) e HepG2 (24 e 48h) foi diferente estatisticamente do controle negativo até na concentração de $152,8 \mu\text{mol/L}$, já frente a GM07492 com 48 h, essa diferença estatística foi somente nas duas maiores concentrações (1223 e $611,5 \mu\text{mol/L}$) (**Figura 19**).

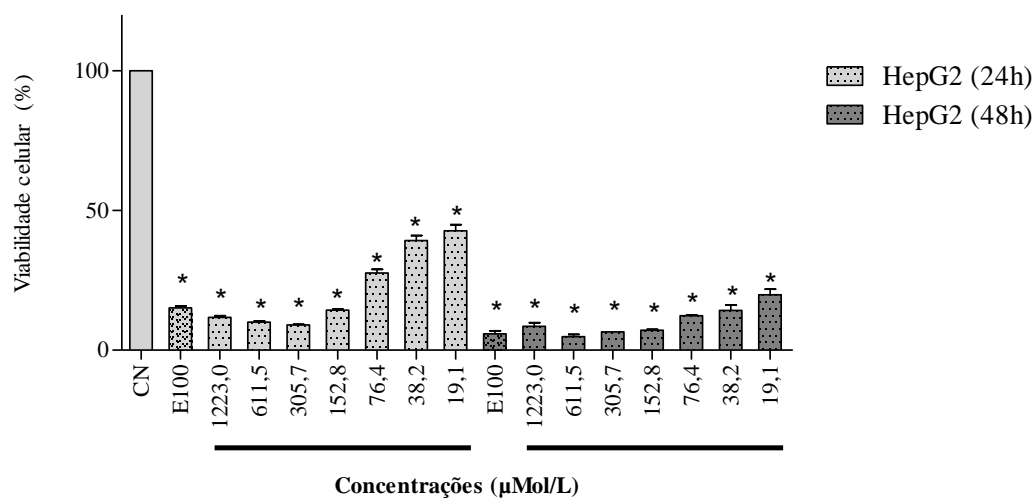
As NPPs sem **I1** também foram avaliadas e todas foram capazes de reduzir de maneira estatisticamente significativa a viabilidade das linhagens celulares nos dois tempos de tratamento, sendo E100 a mais citotóxica, e S100 e NE 30 D com um padrão de citotoxicidade semelhante.

Figura 17. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com E100 **(A)** GM07492 **(B)** HepG2

A



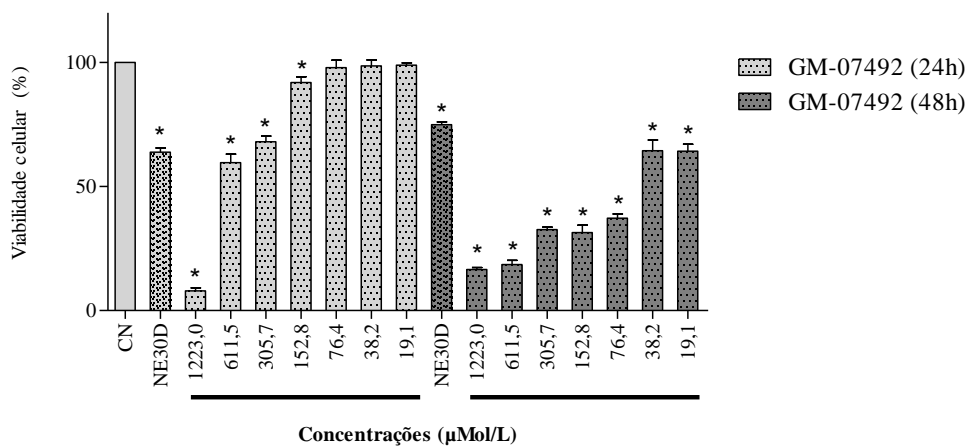
B



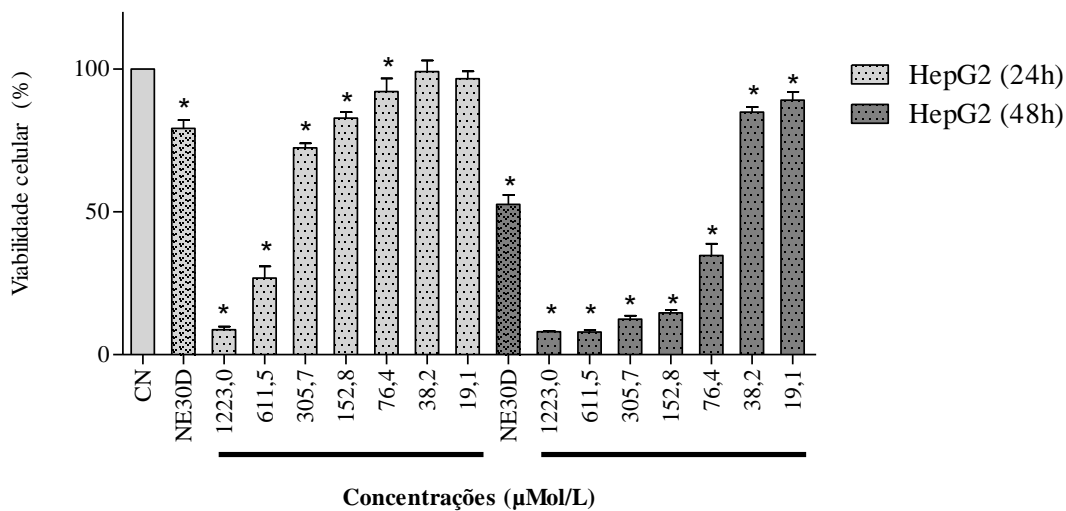
Os valores são apresentados como média e desvio-padrão da viabilidade celular. Controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); Controle positivo (azida sódica 200 µg/mL; viabilidade celular de 3,92% em GM07492, 1,24% em HepG2).

Figura 18. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com NE30D (A) GM07492 (B) HepG2

A



B

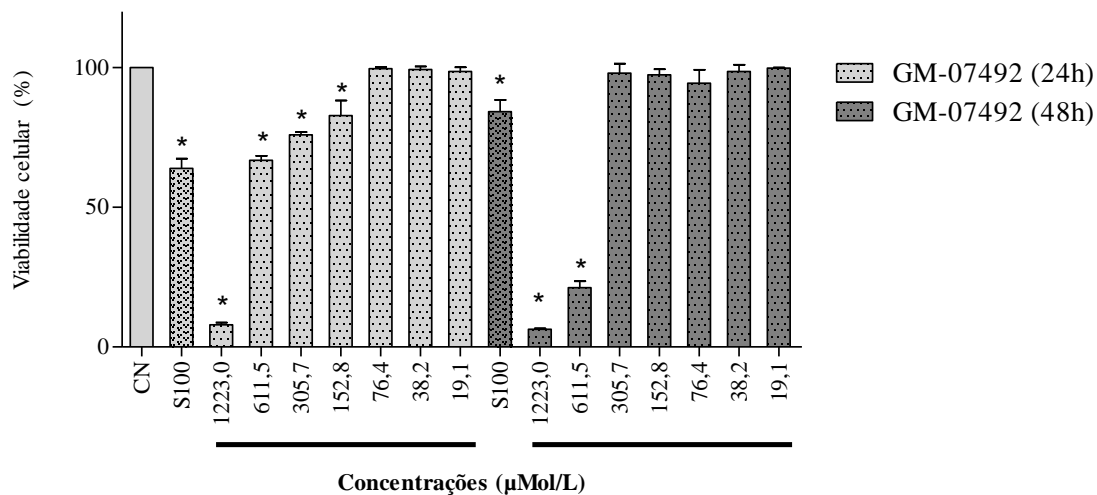


Os valores são apresentados como média e desvio-padrão da viabilidade celular. Controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); Controle positivo (azida sódica 200 µg/mL; viabilidade celular de 3,92% em GM07492, 1,24% em HepG2).

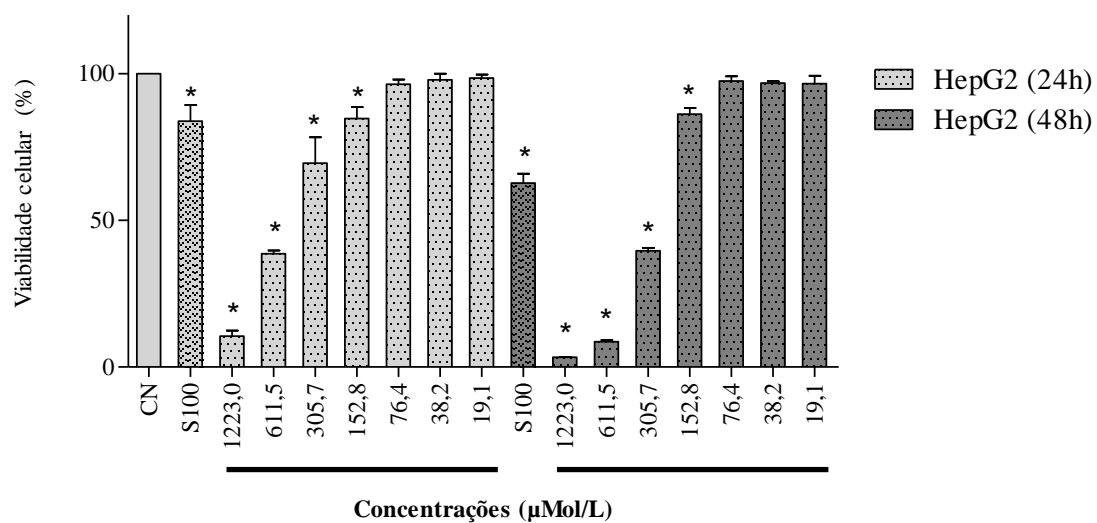
Figura 19. Ensaio de viabilidade celular com as linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações das nanopartículas poliméricas com S100 (A) GM07492 (B)

HepG2

A



B



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão da viabilidade celular. Controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); Controle positivo (azida sódica 200 µg/mL; viabilidade celular de 3,92% em GM07492, 1,24% em HepG2).

Tabela 5. Valores de CIM₉₀, IC₅₀ e a determinação do índice de seletividade (IS) das nanopartículas poliméricas

		GM07492 (24h)			HepG2 (24h)		GM07492 (48 h)		HepG2 (48 h)	
		CIM ₉₀ (µmol/L)	IC ₅₀ (µmol/L)	IS	IC ₅₀ (µmol/L)	IS	IC ₅₀ (µmol/L)	IS	IC ₅₀ (µmol/L)	IS
NE30D	Com I1	15,62 ± 13,27	569,6 ± 6,9	36,47	414,6 ± 19,2	26,5	56,5 ± 7,4	3,6	65,7 ± 2,7	4,2
	Sem I1	>1223	-	-	-	-	-	-	-	-
S100	Com I1	>1223	642,4 ± 23,6	-	457,0 ± 52,9	-	517,5 ± 28,7	-	270,1 ± 0,4	-
	Sem I1	>1223	-	-	-	-	-	-	-	-
E100	Com I1	1,53 ± 1,90	<19,1	-	<19,1	-	<19,1	-	<19,1	-
	Sem I1	0,71 ± 0,88	-	-	-	-	-	-	-	-

>1223: não possui atividade contra *M. tuberculosis*; - não determinado, IS: índice de seletividade

Com relação a mutagenicidade, os resultados da média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com as NPPs observados nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. Typhimurium*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica estão apresentados nas **Tabelas 6-8**.

As NPP não induziram qualquer aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes quando comparado com o controle negativo em nenhuma das concentrações avaliadas, com um índice de mutagenicidade inferior a 2,0, em todas as linhagens testadas, demonstrando, dessa maneira, ausência de atividade mutagênica nas condições utilizadas deste estudo, com e sem ativação metabólica.

As linhagens foram mais sensíveis, principalmente nas maiores concentrações, provavelmente aos efeitos tóxicos dos nanocompósitos, por isso os baixos valores dos IM.

As NPPs sem **II** também não induziram potencial mutagênico avaliado pelo teste de Ames.

Tabela 6. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPP) compostas por Eudragit® NE30D, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Cesp	27 ± 2	20 ± 3	102 ± 8	119 ± 15	256 ± 36	354 ± 22	168 ± 6	187 ± 22
C+	727 ± 56 ^a	1524 ± 69 ^d	1239 ± 102 ^b	1872 ± 211 ^d	1882 ± 103 ^c	1720 ± 99 ^e	1028 ± 62 ^a	1256 ± 95 ^d
NE30D	25 ± 1 (0,93)	26 ± 0 (1,30)	104 ± 9 (1,02)	122 ± 14 (1,03)	299 ± 30 (1,17)	330 ± 35 (0,93)	147 ± 2 (0,88)	178 ± 3 (0,95)
NPPNE30D								
μL/ placa								
12,5	24 ± 0 (0,89)	31 ± 6 (1,53)	118 ± 7 (1,15)	94 ± 4 (0,92)	303 ± 17 (1,18)	349 ± 27 (1,06)	171 ± 9 (1,02)	184 ± 4 (0,98)
25	23 ± 1 (0,85)	22 ± 2 (1,10)	93 ± 2 (0,91)	98 ± 2 (0,96)	253 ± 28 (0,99)	269 ± 42 (0,81)	159 ± 5 (0,95)	168 ± 12 (0,90)
50	24 ± 3 (0,89)	27 ± 2 (1,33)	89 ± 4 (0,87)	88 ± 10 (0,86)	211 ± 31 (0,83)	216 ± 13 (0,66)	162 ± 10 (0,97)	145 ± 11 (0,78)
75	22 ± 2 (0,81)	27 ± 5 (1,33)	89 ± 7 (0,87)	24 ± 8 (0,24)	246 ± 19 (0,96)	142 ± 22 (0,43)	147 ± 11 (0,87)	112 ± 8 (0,60)
100	13 ± 1 (0,48)	17 ± 1 (0,85)	86 ± 3 (0,84)	3 ± 0 (0,03)	224 ± 22 (0,87)	140 ± 14 (0,42)	111 ± 3 (0,66)	39 ± 2 (0,21)

Controle espontâneo (Cesp): taxa espontânea de reversão; NE30D: NPP de Eudragit®NE30D sem **I1** (100 μL/placa); NPPNE30D: NPP de Eudragit®NE30D com **I1**; M ± DP = média e desvio padrão; IM: índice de mutagenicidade; Controle positivo (C +): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 μg/ placa – TA98, TA97a); ^bAzida Sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 μg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^d2-aminoantraceno (1,25 μg/ placa – TA98, TA97a e TA100); ^e2-aminofluoreno (10 μg/ placa – TA102), na presença de S9

Tabela 7. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPP) compostas por Eudragit® S100, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Cesp	27 ± 2	20 ± 3	102 ± 8	119 ± 15	256 ± 36	354 ± 22	168 ± 6	187 ± 22
C+	727 ± 56 ^a	1524 ± 69 ^d	1239 ± 102 ^b	1872 ± 211 ^d	1882 ± 103 ^c	1720 ± 99 ^e	1028 ± 62 ^a	1256 ± 95 ^d
S100	30 ± 3 (1,11)	19 ± 3 (0,95)	114 ± 4 (1,12)	120 ± 11 (1,01)	280 ± 14 (1,10)	321 ± 55 (0,91)	158 ± 6 (0,94)	135 ± 12 (0,72)
NPPS100								
μL /placa								
12,5	29 ± 1 (1,07)	24 ± 2 (1,18)	115 ± 5 (1,13)	127 ± 9 (1,25)	300 ± 12 (1,17)	368 ± 22 (1,04)	152 ± 5 (0,91)	213 ± 11 (1,14)
25	26 ± 3 (0,96)	27 ± 6 (1,33)	108 ± 12 (1,06)	142 ± 12 (1,39)	250 ± 12 (0,98)	366 ± 39 (1,03)	149 ± 6 (0,89)	238 ± 18 (1,27)
50	22 ± 2 (0,81)	24 ± 1 (1,20)	106 ± 6 (1,04)	130 ± 23 (1,27)	235 ± 27 (0,92)	287 ± 31 (0,81)	160 ± 7 (0,95)	164 ± 15 (0,88)
75	21 ± 1 (0,78)	16 ± 1 (0,80)	71 ± 4 (0,70)	129 ± 18 (1,26)	229 ± 18 (0,89)	257 ± 25 (0,73)	170 ± 2 (1,01)	149 ± 6 (0,80)
100	7 ± 1 (0,24)	17 ± 2 (0,85)	80 ± 2 (0,78)	133 ± 14 (1,30)	190 ± 5 (0,74)	262 ± 34 (0,74)	143 ± 2 (0,85)	93 ± 8 (0,50)

Controle espontâneo (Cesp): taxa espontânea de reversão; S100: NPP de Eudragit®S100 sem **II** (100 μL/placa); NPPS100: NPP de Eudragit®S100 com **II**; M ± DP = média e desvio padrão; IM: índice de mutagenicidade; Controle positivo (C +): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 μg/ placa – TA98, TA97a); ^bAzida Sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 μg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^d2-aminoantraceno (1,25 μg/ placa – TA98, TA97a e TA100); ^e2-aminofluoreno (10 μg/ placa – TA102), na presença de S9

Tabela 8. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após o tratamento com várias concentrações das nanopartículas poliméricas (NPP) compostas por Eudragit® E100, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Cesp	27 ± 2	20 ± 3	102 ± 8	119 ± 15	256 ± 36	354 ± 22	168 ± 6	187 ± 22
C+	727 ± 56 ^a	1524 ± 69 ^d	1239 ± 102 ^b	1872 ± 211 ^d	1882 ± 103 ^c	1720 ± 99 ^e	1028 ± 62 ^a	1256 ± 95 ^d
E100	24 ± 6 (0,87)	26 ± 4 (1,30)	108 ± 4 (1,06)	91 ± 8 (0,76)	202 ± 21 (0,79)	317 ± 35 (0,89)	173 ± 15 (1,03)	173 ± 19 (0,93)
NPPE100								
μL/ placa								
12,5	26 ± 2 (0,96)	18 ± 1 (0,90)	106 ± 5 (1,04)	107 ± 9 (0,89)	260 ± 13 (1,02)	362 ± 30 (1,02)	171 ± 21 (1,02)	173 ± 12 (0,93)
25	24 ± 3 (0,89)	21 ± 5 (1,05)	104 ± 12 (1,02)	146 ± 12 (1,23)	280 ± 8 (1,10)	355 ± 15 (1,00)	175 ± 4 (1,04)	168 ± 5 (0,90)
50	25 ± 1 (0,93)	22 ± 3 (1,10)	100 ± 6 (0,98)	110 ± 15 (0,92)	231 ± 11 (0,90)	324 ± 43 (0,92)	198 ± 17 (1,18)	155 ± 11 (0,83)
75	20 ± 0 (0,74)	17 ± 1 (0,83)	79 ± 4 (0,77)	6 ± 2 (0,05)	196 ± 9 (0,77)	213 ± 17 (0,60)	195 ± 8 (1,16)	135 ± 16 (0,72)
100	14 ± 2 (0,52)	18 ± 2 (0,90)	66 ± 2 (0,65)	2 ± 1 (0,01)	205 ± 12 (0,80)	208 ± 21 (0,59)	189 ± 8 (1,13)	89 ± 5 (0,48)

Controle espontâneo (Cesp): taxa espontânea de reversão; E100: NPP de Eudragit®E100 sem **II** (100 μL/placa); NPPE100: NPP de Eudragit®E100 com **II**; M ± DP = média e desvio padrão; IM: índice de mutagenicidade; Controle positivo (C +): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 μg/ placa – TA98, TA97a); ^bAzida Sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 μg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^d2-aminoantraceno (1,25 μg/ placa – TA98, TA97a e TA100); ^e2-aminofluoreno (10 μg/ placa – TA102), na presença de S9

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que os complexos de Cu(II) **I1**, **I2** e **I3**, apresentam promissora atividade contra o *M. tuberculosis*, o principal agente da tuberculose (SILVA et al., 2016). Considerando os requisitos pré-clínicos, neste estudo, determinamos o potencial citotóxico frente a diversas linhagens celulares. Os resultados obtidos da avaliação da viabilidade celular complementaram um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, onde também foi investigado o potencial genotóxico/mutagênico destes complexos de Cu(II) pelo teste de Ames, ensaio do micronúcleo/citoma e ensaio do Cometa. Todos estes dados encontram-se no manuscrito intitulado *Cyto-genotoxic evaluation of novel anti-tubercular Copper (II) complexes containing isoniazid-based ligands* submetido para publicação no periódico *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Com uma proposta inovadora, neste trabalho, continuou-se a investigação com o complexo **I1** produzindo formulações com matrizes poliméricas contendo Eudragit® E100, S100 e NE 30 D, a fim de gerar NPPs. As NPPs produzidas foram caracterizadas e analisadas quanto ao seu potencial antimicobacteriano, citotóxico, antiproliferativo e mutagênico.

O íon Cu (II) possui alta afinidade pelos grupos amino presentes na molécula INH, descoberta em 1952 por Bernstein et al. (1952) e usado como um antibiótico importante no tratamento de infecções por *M. tuberculosis*. O INH atua inibindo a síntese de lipídios e ácidos nucléicos da parede celular, além da diminuição da respiração (MANNING et al., 2015). De acordo com MANNING et al. (2015), o cátion pode aumentar a estabilidade da INH.

Neste estudo, os ensaios de viabilidade celular foram realizados usando resazurina para determinar os valores de IC₅₀ para cada complexo de Cu(II) e as NPPs. De acordo com a literatura, a resazurina atua como um aceitador intermediário na cadeia de transporte de elétrons entre a redução final de oxigênio e o citocromo oxidase. No entanto, as evidências sugerem que não apenas as enzimas mitocondriais, mas também outras enzimas citosólicas e microssômicas podem reduzir o corante. As células metabolicamente ativas reduzem a resazurina a resorufina. Portanto, a taxa de redução da resazurina provavelmente indica o metabolismo celular, em vez de especificamente a função mitocondrial. Por isso, existe uma correlação direta entre a redução da resazurina e a proliferação celular (RISS et al., 2016).

Os valores de IC₅₀ obtidos neste estudo indicaram que os complexos **I1**, **I2** e **I3** possuem baixa citotoxicidade. As células pulmonares (GM07492, MRC-5 e A-549) foram escolhidas com base em sua importância como local de infecções por *M. tuberculosis*. As células HepG2

são amplamente utilizadas para avaliar a toxicidade de compostos bioativos devido às habilidades de biotransformação (CHOI et al., 2015) e um efeito essencial é a toxicidade para locais de absorção, por isso, foi avaliado a citotoxicidade em células intestinais Caco-2. Além disso, usamos células HUVEC que expressam muitos marcadores endoteliais importantes, bem como moléculas de sinalização associadas à fisiologia vascular (CAO et al., 2017), as células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) que possuem pouca atividade funcional da p53 e podem ser originalmente resistentes à apoptose induzida por estresse genotóxico (MINAGAWA et al., 1999) e as células MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) que apresentam positividade para o receptor de estrógeno e progesterona, além de ser uma linhagem celular pouco agressiva e não invasiva (COMSA et al., 2015).

As células Caco-2 foram mais sensíveis aos efeitos dos complexos. **I1** apresentou IC₅₀ de $51,4 \pm 5,1 \mu\text{g/ mL}$ ($125,8 \pm 12,5 \mu\text{mol/L}$), **I2** de $38,4 \pm 1,5 \mu\text{g/ mL}$ ($70,6 \pm 2,7 \mu\text{mol/L}$) e **I3** de $66,8 \pm 10,0 \mu\text{g/ mL}$ ($135,2 \pm 20,2 \mu\text{mol/L}$). Mesmo assim os valores encontrados foram superiores a CIM dos complexos contra *M. tuberculosis* apresentados por Silva et al. (2016): 2 vezes para **I1** (CIM: $20,46 \mu\text{g/ mL}$), 6 vezes para **I2** (CIM: $5,913 \mu\text{g/ mL}$) e 45 vezes para **I3** (CIM: $1,459 \mu\text{g/ mL}$), mostrando que esses complexos são seletivos para *M. tuberculosis*, o que representa grandes avanços na terapia anti-TB.

Silva et al. (2016) também avaliaram os efeitos da citotoxicidade desses complexos nas linhagens celulares de rim de macaco verde (VERO), macrófagos murinos (J774A) e fibroblastos pulmonares (MRC-5) pelo método da resazurina e foram considerados não citotóxicos contra as células testadas.

Diante da promissora atividade contra *M. tuberculosis*, em um estudo anterior, o ensaio do Cometa que detecta danos ao DNA, do micronúcleo que avalia a clastogenicidade e aneugenicidade e o teste de Ames que investiga mutações gênicas foram realizados. **I1** não foi genotóxico/mutagênico, conforme indicado pelos parâmetros avaliados. Já os complexos **I2** e **I3** foram mutagênicos nas maiores concentrações utilizadas (dados não publicados). Por isso, **I1** foi o complexo de escolha para dar continuidade aos estudos, além de ter sido o complexo com maior solubilidade quando associado com as matrizes poliméricas.

A baixa solubilidade em água é uma das principais desvantagens dos complexos metálicos, entrando neste contexto, os complexos de Cu. Assim, os pesquisadores buscam alternativas através de estratégias tecnológicas para efetivamente compartimentar esse grupo diversificado de moléculas e modificar seu comportamento no corpo. As melhorias na adesão

terapêutica e a eficácia do tratamento são importantes benefícios na busca de formulações farmacológicas inovadoras (SILVA et al., 2015).

Os copolímeros de polimetacrilato (Eudragit®) são amplamente utilizados para revestimentos de filmes de liberação controlada ou como formadores de matriz em formulações farmacêuticas orais. Esses polímeros são de grande interesse, devido à sua alta estabilidade química e boas propriedades de compatibilidade. Uma grande variedade de produtos com diferentes características físico-químicas está disponível comercialmente, podendo ser polímeros catiônicos, aniônicos e neutros sintéticos de metacrilatos de dimetilaminoetil, ácido metacrílico e ésteres de ácido metacrílico em proporções variáveis. Suas propriedades físico-químicas são determinadas pelos grupos funcionais (MASKOVÁ et al., 2019).

No presente estudo, foram produzidas formulações do complexo **II** com os polímeros Eudragit® NE 30 D, E100 e S100.

A caracterização adequada das nanopartículas é extremamente importante para o desenvolvimento de formulações bem definidas e de relevância terapêutica. As medições do espalhamento dinâmico de luz e PZ ganharam popularidade como ferramentas simples, fáceis e reproduzíveis para verificar o tamanho das partículas e a carga superficial (BHATTACHARJEE, 2016).

Está bem documentado que o tamanho dos sistemas de administração de medicamentos influencia a farmacocinética, a distribuição nos tecidos e a depuração. Certos processos fisiológicos, como captação e acumulação hepática, difusão tecidual, extravasamento tecidual e excreção renal dependem significativamente do tamanho das partículas (DANAIEI et al., 2018). As nanoestruturas que exibem uma dimensão inferior a 1000 nm, têm recebido constantemente atenção para aplicações nas ciências biológicas (FREY et al., 2018).

Muitos autores limitam o tamanho dos nanomateriais a 100 nm (BORM et al., 2006) justificando-se a escolha desse limite superior pelo fato de que algumas propriedades físicas das nanopartículas se aproximam das do granel (no seu estado bruto, sem estar fracionado) quando seu tamanho atinge esses valores. No entanto, esse limite de tamanho varia de acordo com o tipo de material e não pode ser a base para essa classificação. Uma definição legítima estende esse limite superior de tamanho para 1 µm, sendo o intervalo submicrônico classificado como nano (BUZEA et al., 2007).

Com relação ao IPD, o termo "polidispersão" (ou "dispersão", conforme recomendado pela IUPAC) é usado para descrever o grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas. Esse índice é adimensional e redimensionado, de modo que valores

menores que 0,05 são vistos principalmente com padrões altamente monodispersos e raramente observado em sistemas biológicos. Valores de IPD maiores que 0,7 sugere ampla distribuição de tamanhos macromoleculares em solução e métodos de distribuição não monomodais, provavelmente não sendo adequado para análise pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Algoritmos de distribuição de tamanhos diferentes trabalham com dados que se enquadram entre esses dois valores extremos de IPD, ou seja, 0,05-0,7, representando uma preparação quase monodispersa (STETEFELD et al., 2016; DANAEI et al., 2018).

O PZ reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). De acordo com Clogston & Patri (2011), nanopartículas com PZ entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto nanopartículas com PZ maior que +30 mV ou menor que -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente.

As análises do presente estudo demonstraram que o tamanho médio da matriz polimérica NE 30 D foi de $82,3 \pm 0,1$ nm (30 dias) e $65,4 \pm 0,3$ nm (60 dias), com um baixo IPD ($0,261 \pm 0,006$ -30dias- e $0,263 \pm 0,01$ - 60dias) e valores de PZ negativos ($-24,5 \pm 1,0$ mV -30 dias -e $-18,8 \pm 3,9$ mV - 60dias). A incorporação de **II** aumentou o tamanho da NPP para $181,5 \pm 2,2$ nm (30 dias), observou-se uma menor heterogeneidade da amostra (IPD: $0,165 \pm 0,005$) e uma alteração na carga superficial a um valor positivo (PZ: $28,8 \pm 0,4$ mV). Ying et al. (2011) modificaram nanopartículas lipídicas sólidas com oligossacarídeo de quitosana e observaram uma mudança do PZ de -20mV para 30mV, devido a adsorção do oligossacarídeo de quitosana na superfície de carga negativa da nanopartícula por meio da interação eletrostática, o que provavelmente possa ter acontecido neste estudo, uma interação eletrostática de **II** e a matriz polimérica NE 30 D.

A NPPNE30D não foi avaliada com 60 dias devida a necessidade de manutenção do equipamento.

A adição de **II** com os polímeros E100 e S100 também gerou um aumento no diâmetro das NPPs. Em E100 de $304,4 \pm 9,6$ para $319,5 \pm 68,2$ nm (30 dias) e $299,4 \pm 17,2$ para $302,4 \pm 16,6$ nm (60 dias) e em S100 de $517,9 \pm 48,7$ para $735,5 \pm 50,7$ nm (30 dias) e $569,6 \pm 82,7$ para $696,4 \pm 53,6$ nm (60 dias). Os valores de IDP diminuíram, exceto E100 analisado após 30 dias. De maneira geral, as NPPs com NE30D foram mais uniformes, enquanto que com E100 e S100 foram mais polidispersas com diferentes populações de tamanhos de partículas. Por fim,

os valores do PZ foram positivos para E100 e negativos para S100, demonstrando, assim, os efeitos da composição das diferentes formulações sobre os valores do PZ. Além disso, considerando essas amostras polidispersas, o PZ foi relatado como uma média de todas as espécies carregadas.

A morfologia e o tamanho das amostras recém preparadas também foram analisados por MET e as NPPNE 30D, NPPE100 e NPPS100 apresentaram um diâmetro médio de $168 \pm 21,7$, $224 \pm 70,9$ e $567 \pm 175,3$ nm, respectivamente. A diferença nos resultados após a comparação com as análises de DLS pode estar relacionada à técnica de dispersão de luz dinâmica que mede o raio hidrodinâmico das partículas (movimento browniano das macromoléculas em solução), enquanto que na microscopia, o índice de refração da nanopartícula formada é desconhecido, o que o torna ligeiramente menor. Além disso, deve ser considerado o fato de a distribuição da amostra não estar perfeitamente monodispersa (CASSANO et al., 2016; BARRERA, 2018) e a condição de vácuo em que o MET é operado (KONG et al., 2011).

A fim de complementar os dados para a caracterização das NPPs, a análise por FTIR foi realizada. A composição química e as interações entre os grupos funcionais em uma mistura de polímeros podem ser obtidas diretamente por essa análise, que fornece medições de alta precisão e reproduzíveis, aceitas para a maioria dos fins industriais e de pesquisa (RIAZ & ASHRAF, 2015). Essa técnica espectroscópica refere-se à absorção da radiação infravermelha e depende da absorção de energia de um fóton que posteriormente promove a transição de um estado de baixa energia para um estado de energia mais alta ou um estado excitado. Os estados excitados resultam em vibrações de ligações moleculares (isto é, alongamento, flexão, torção, balanço, abanamento e deformação fora do plano) ocorrendo em vários números de onda (ou frequências) na região infravermelha do espectro de luz. O número de onda de cada pico de absorvância de infravermelho é determinado pelas propriedades físico-químicas intrínsecas da molécula correspondente. Portanto, isso é diagnosticado como uma impressão digital desse grupo funcional específico (por exemplo, C-H, O-H, C = O, etc.) (LOPES et al., 2018).

No presente estudo, claramente foi evidenciado a presença do complexo metálico **II** nas NPPs formadas por Eudragit® S100 e E100, com vibrações de ligações que permitiram identificar os grupamentos químicos correspondentes ao complexo metálico. Além disso, foi possível observar deslocamento de picos sugerindo a possibilidade de interação dos COOH do complexo com a matriz, possivelmente por ligações de hidrogênio. Oliveira (2015) relata em seu trabalho a possibilidade de ácidos carboxílicos formarem ligações de hidrogênio, realçando assim o caráter eletrostático entre as formas iônica e covalente dos grupos COOH.

A técnica FTIR não foi suficiente para detectar o complexo **II** na NPPNE 30 D, o que mostra a importância e necessidade dos outros dados de caracterização obtidos neste estudo que se complementaram e demonstraram a presença de **II** na formulação.

A respeito da EE% obtida neste estudo, a NPPE100 apresentou alta eficiência, com um percentual de $94,5 \pm 2,2\%$, porém para as NPPS100 e NPPNE 30 D, estes valores foram de $22,6 \pm 0$ e $26,3 \pm 5,7$, respectivamente. Podemos observar no presente estudo que a modificação das características de superfície das partículas resulta em diferentes taxas de associação do fármaco apesar de ser a mesma concentração inicial de **II** utilizada. O que variou neste estudo e deve ser levado em consideração com relação aos resultados de EE% foram as concentrações de polímeros utilizadas.

Shams e colaboradores (2018) desenvolveram cinco formulações com diferentes proporções do polímero Eudragit L100-55 contendo prednisolona. Os resultados mostraram que a EE% foi maior (93%) quando a concentração de polímero em relação ao fármaco estava mais alta.

Já Rodenak-Kladniew et al. (2019) observaram uma forte diminuição na EE% quando quitosana foi incorporada na formulação de nanopartícula lipídica sólida com ofloxacina. A EE% de 22,8% pode ser atribuída à presença de quitosana livre, que não está revestindo a nanopartícula; nos meios circundantes, a ofloxacina pode ter sido deslocada da superfície da nanopartícula em direção à solução, devido à formação de complexos de quitosana com ofloxacina.

De acordo com a literatura, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas, a natureza do óleo utilizado (no caso das nanocápsulas) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; JAIN e THAREJA, 2019).

Por sua vez, o que pode interferir no padrão de liberação do fármaco é a taxa inicial de carga do fármaco, a concentração do polímero, as propriedades específicas da rede de cadeias poliméricas (por exemplo, o comprimento da cadeia, sua flexibilidade e mobilidade, seu comportamento de captação e dilatação da água) ou interações potenciais entre polímero e medicamento. Geralmente, a liberação rápida de medicamentos é atribuída a maior captação de água, taxa de intumescimento e/ ou degradação de polímeros (CETIN et al., 2010).

No presente estudo, podemos observar os perfis de liberação dependentes do pH, que foi estabelecido principalmente pela utilização de polímeros que contêm grupos ácido fraco, por exemplo, ácido carboxílico, no caso Eudragit® S100 ou base com aminas primárias e terciárias, por exemplo Eudragit® E100, com um pKa que permite mudanças bruscas no estado de ionização no pH desejado.

A principal interferência do pH foi observada na avaliação da NPPE100, que teve uma liberação mais acentuada em pH ácido, aproximadamente de 30,9%, enquanto que em pH alcalino foi de 7,93%. As NPPS100 e NPPNE 30 D também tiveram maior liberação em pH ácido de aproximadamente 44% e 29% respectivamente e em pH alcalino de 28% e 29,6%, respectivamente. No entanto, a diferença não foi tão evidente. Um efeito de liberação rápido inicial é observado em todas as análises, em seguida o perfil de liberação atingiu o platô, resultando em pouca liberação adicional até o final do teste, durante 48 h.

Dai et al. (2004) propuseram melhorar a biodisponibilidade oral da ciclosporina A, preparando nanopartículas sensíveis ao pH. De acordo com os autores, polímeros acrílicos como Eudragit® E100, Eudragit® L100, Eudragit® L100-55 e Eudragit® S100 são comumente usados para revestimento de comprimidos e preparação de formulações de liberação controlada. Estes polímeros podem dissolver-se rapidamente por desprotonação de grupos de ácidos carboxílicos a valores de pH específicos. Assim, os perfis de liberação dessas nanopartículas exibem significativa sensibilidade ao pH, o que é possível fazer com que a ciclosporina A seja liberada principalmente em sua parte específica de absorção do trato gastrointestinal, diminuindo a degradação pelo ácido gástrico e o metabolismo de primeira passagem pelas enzimas gastrointestinais, aumentando a biodisponibilidade via oral.

Sobre da atividade antimicobacteriana avaliada pelo ensaio de microtitulação com resazurina contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, os resultados mostraram que as NPPE100 e NPPNE30D melhoraram o efeito previamente observado em **II**. De 50,06 µmol/L (20,46 µg/mL) (Silva et al., 2016) para 1,53 ± 1,90 µmol/L para NPPE100 e 15,62 ± 13,27 µmol/L para NPPNE30D. A NPP com NE30D sem **II** não exibiu atividade, bem como as NPPs de S100 com e sem **II** que não demonstraram qualquer potencial antimicobacteriano. Por outro lado, a NPP de E100 sem **II**, por si só, induziu atividade nas condições experimentais utilizadas.

A citotoxicidade das formulações também foi avaliada pelo método da resazurina após 24 e 48 h de incubação, a fim de estabelecer a faixa de concentração na qual o dano celular foi produzido. As células GM07492 e HepG2 foram selecionadas como modelos para estudar o efeito citotóxico das NPPs.

I1, como já discutido anteriormente, apresentou IC_{50} de $673,3 \pm 23,9$ $\mu\text{mol/L}$ frente a GM07492 e de $225,6 \pm 20,8$ $\mu\text{mol/L}$ frente a HepG2 após 24 h de incubação. As NPPs apresentaram maior citotoxicidade, com destaque para as produzidas com E100, que foram altamente citotóxicas, independente da linhagem celular, do tempo de incubação e das concentrações avaliadas, com IC_{50} menor que $19,1$ $\mu\text{mol/L}$ (menor concentração avaliada). As produzidas com NE30D demonstraram maior potencial citotóxico após 48 h de incubação, com IC_{50} de $56,5 \pm 7,4$ $\mu\text{mol/L}$ frente as células GM07492 e $65,7 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/L}$ frente a HepG2, mesmo assim, ainda foram mais seletivos para o *M. tuberculosis*. Com 24 h de incubação, os valores foram semelhantes ao do complexo **I1**, com IC_{50} de $569,6 \pm 6,9$ $\mu\text{mol/L}$ e $414,6 \pm 19,2$ $\mu\text{mol/L}$ quando testadas em GM-07492 e HepG2, respectivamente. Já NPPS100 foram as que apresentaram menor citotoxicidade, tanto com 24 quanto com 48 h, com valores de IC_{50} de $642,4 \pm 23,6$ $\mu\text{mol/L}$ (24 h) e $517,5 \pm 28,7$ $\mu\text{mol/L}$ (48h) frente a GM07492 e $457,0 \pm 52,9$ $\mu\text{mol/L}$ (24 h) e $270,1 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/L}$ (48 h) frente a HepG2. No entanto, não foram ativas para o tratamento da TB.

As NPPs de NE30D e S100 sem **I1** apresentaram citotoxicidade relativamente baixa contra células GM07492 e HepG2. Mas, a E100 por si só foi citotóxica, induzindo baixa viabilidade celular, explicando, assim, o efeito observado das NPPE100.

Silva et al. (2016) também demonstraram o aprimoramento da atividade contra *M. tuberculosis* quando os complexos de Cu(II) **I1**, **I2** e **I3** foram incorporados em um sistema lipídico nanoestruado. De acordo com os autores, as formulações com alto grau de estruturação aumentaram a estabilidade e retenção na membrana biológica, permitindo uma maior duração do fármaco no local alvo. A melhoria na atividade biológica foi explicada pelos parâmetros reológicos, porque todos os sistemas carregados com os complexos apresentaram um alto índice de consistência e elasticidade, formando assim uma formulação mais estruturada com a incorporação complexa. Entretanto, os complexos induziram uma maior toxicidade quando incorporados, o que foi relacionado a uma maior sensibilidade das linhagens celulares devido a uma alta concentração de lipídios que compõem o nanossistema.

A literatura mostra que partículas menores têm uma área de superfície relativamente grande em comparação com as maiores; isso aumenta a interação com elementos biológicos e, conseqüentemente, desencadeia efeitos tóxicos e adversos (BARAR, 2015). Mas, neste estudo, o tamanho das partículas não implicou necessariamente nas maiores respostas exibidas.

É geralmente aceito que as nanopartículas que apresentam cargas mais positivas podem facilitar um efeito biológico devido à sua afinidade com a membrana com carga negativa, o que

também leva a uma maior citotoxicidade (HWANG et al., 2015, BARAR, 2015). As NPPs E100 com e sem **II** exibiram a carga positiva mais alta. As NPPs NE 30 D e S100 sem **II** apresentaram cargas negativas. Com a incorporação de **II**, NPPS100 continuou negativa, enquanto NPPNE30D alterou para um valor positivo. Está evidente no presente estudo a influência da carga superficial das NPPs na regulação da interação com as células, tanto para citotoxicidade quanto para atividade antimicobacteriana.

Por fim, os resultados da avaliação da mutagenicidade mostraram que todas as diferenças observadas na caracterização das NPPs não alteraram o potencial mutagênico. As NPPs não induziram atividade mutagênica quando avaliadas pelo teste de Ames.

O ensaio de mutação reversa bacteriana em *S. Typhimurium* (teste de Ames) não só é financeiramente viável, como reconhecido pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) e reproduzível. De acordo com a literatura, tem sido capaz de detectar cerca de 90% dos carcinogênicos humanos conhecidos. Por isso, é o método de primeira escolha para uma avaliação preliminar da mutagenicidade e carcinogenicidade. É considerado o melhor ensaio autônomo para identificação da mutagenicidade, sendo amplamente utilizado para detectar mutações gênicas em diversos segmentos (MAHADEVAN et al., 2011; BARBEZAN et al., 2017).

Frente a tudo isso, os dados do presente estudo fornecem suporte às propriedades antimicobacterianas de NPPs com complexo metálico, contribuindo na busca de novas formulações com atividades biológicas, além da citotoxicidade e mutagenicidade que provém informações mais aprofundadas sobre se um composto é um candidato promissor para o tratamento da TB.

6. CONCLUSÕES

As análises realizadas no presente estudo levaram as seguintes conclusões:

- Os complexos **I1**, **I2** e **I3** demonstraram baixa citotoxicidade. O menor IC₅₀ foi observado para **I2**, frente a linhagem celular Caco-2;

- Das NPPs desenvolvidas, NPPNE30D teve o menor valor de diâmetro hidrodinâmico, menor IPD, conferindo uma boa uniformidade de distribuição às partículas e uma alteração do PZ a um valor positivo, provavelmente devido a interação eletrostática de **I1** com a matriz polimérica;

-A modificação das características de superfície das partículas, assim como as concentrações de polímeros utilizadas resultaram em diferentes taxas de associação de **I1** nas NPPs, alterando a EE%;

- No ensaio de liberação, a NPP que teve maior diferença dependente do pH foi NPPE100;

- Sobre a atividade antimicobacteriana, a NPP com melhor atividade foi NPPE100. No entanto, a NPP de E100 sem **I1** teve um potencial ainda maior. Além disso, NPPE100 apresentou-se altamente citotóxica, assim como NPP de E100 sem **I1**, para as linhagens celulares GM07492 e HepG2, nos períodos de tratamento de 24 e 48 h. NPPE100 apresentou EE% de 94% e liberação de 30,9% em pH ácido e 7,93% em pH alcalino, o que nos leva a concluir que a atividade antimicobacteriana e citotóxica observada é da própria matriz polimérica.

- A NPPS100 demonstrou menor atividade citotóxica, mas não induziu qualquer inibição no crescimento do *M. tuberculosis*;

- NPPNE30D demonstrou maior citotoxicidade após 48 h de tratamento, mas menos assim os valores de CIM₉₀ encontrados foram menores que os valores de IC₅₀, demonstrando seletividade para *M. tuberculosis*. A NPP de NE30D sem **I1** não teve efeito contra *M. tuberculosis*;

- Analisando os parâmetros de caracterização, possivelmente a carga superficial das NPPs foi determinante na regulação da interação com as células e nas atividades citotóxica e antimicobacteriana avaliadas;

- As NPPs não induziram mutagenicidade nas condições experimentais utilizadas.

De uma maneira geral, NPPNE30D demonstrou os melhores resultados com relação a caracterização, promitente atividade antimicobacteriana e menor potencial citotóxico e ausência do potencial mutagênico. Das NPPs avaliadas neste estudo é mais promissora como candidato ao tratamento de TB, devido a seletividade apresentada contra *M. tuberculosis*. No entanto, fica claro quando observamos os resultados do presente estudo que apesar de grandes conquistas no campo emergente da nanotecnologia, mais estudos são necessários para o entendimento da interação celular com nanossistemas.

7. REFERÊNCIAS

1. ALBANI, B. A., PENA, B., LEED, N. A., PAULA, N. A. B. G. DE, PAVANI, C., BAPTISTA, M. S., TURRO, C. Marked Improvement in Photoinduced Cell Death by a New Tris- heteroleptic Complex with Dual Action: Singlet Oxygen Sensitization and Ligand Dissociation. **Journal of the American Chemical Society**, V. 136, N.49, 17095-101, 2014.
2. ALVES DOS SANTOS, R.; CABRAL, T.R.; CABRAL, I.R.; ANTUNES, L.M.; PONTES ANDRADE, C.; CERQUEIRA, dos S. C. P.; DE OLIVEIRA, B. M.; PESSOA, C.; MARTINS, do N. J. L.; RODRÍGUEZ, B. R.; TAKAHASHI, C.S.. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, v. 32, p. 195-200, 2008.
3. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. RESOLUÇÃO-RDC Nº 31, DE 11 DE AGOSTO DE 2010. Art. 24. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8> Acesso em: 11/12/2019.
4. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Brasília, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>> Acesso em: 15/11/2019.
5. AMANI, Z.; GANDOMI, H.; BASTI, A. A.; DERAKHSHANDEH, A.; NOORI, N. Cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity potential of ethanolic extract of *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer. **Journal of Safety**, e12640, 2019.
6. ARAYA, S.; LOVSIN-BARLE, E.; GLOWIENKE, S. Mutagenicity assessment strategy for pharmaceutical intermediates to aid limit setting for occupational exposure. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 515-520, 2015.
7. ASADI, P.; KHODARAHMI, G.; FARROKHPOUR, H.; HASSANZADEH, F.; SAGHAEI, L. Quantum mechanical/molecular mechanical and docking study of the novel analogues based on hybridization of common pharmacophores as potential anti-breast cancer agents. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 233-240, 2017.
8. ASSIS, L.M. de; ZAVAREZE, E. da R.; PRENTICE-HERNÁNDES, C.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Review: characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109,, 2012.

9. BARAR, J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? **Bioimpacts**, v. 5, n. 3, p. 103-115, 2015.
10. BARBEZAN, A. B.; MARTINS, R.; BUENO, J.B.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Ames test to detect mutagenicity of 2-Alkylcyclobutanones: a review. **Journal of Food Science**. v. 82, n. 7, 2017
11. BARBOSA, J.A.C.; ABDELSADIG, M.S.E.; CONWAY, B.R.; MERCHANT, H.A. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pK_a. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v.1, 100024, 2019.
12. BARRA, C.V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Mealointercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.
13. BARRERA, N.; GUERRERO, L.; DEBUT, A.; SANTA-CRUZ, P. Printable nanocomposites of polymers and silver nanoparticles for antibacterial devices produced by DoD technology. **PLOS ONE**, 13 (7), e0200918. (2018).
14. BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorpheumbellata*L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 53-61, 2005.
15. BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337-351, 2016.
16. BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267–281, 1982.
17. BORM, P.J.A.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHNBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 11, p. 1-35, 2006.
18. BRAS; M., QUEENAN; B., SUSIN; S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 231-9, 2005.
19. BUZEA, C.; PACHECO, II; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v.2, n.4, MR17–MR71, 2007.
20. CAO, Y.; GONG, Y.; LIU, L.; ZHOU, Y.; FANG, X.; ZHANG, C.; LI, Y.; LI, J. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 12, p. 1359-1369, 2017.

21. CASSANO, R.; FERRARELLI, T.; MAURO, M.V.; CAVALCANTI, P.; PICCI, N.; TROMBINO, S. Preparation, characterization and in vitro activities evaluation of solid lipid nanoparticles based on PEG-40 stearate for antifungal drugs vaginal delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p.1047-56, 2016.
22. CETIN, M.; ATILA, A.; KADIOGLU, Y. Formulation and In vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1250–1256, 2010.
23. CHELOPO, M. P.; PAWAR, S. A.; SOKHELA, M. K., GOVENDER, T.; KRUGER, H. G., MAQUIRE, G. E. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal Medicine Chemistry**, v. 66, p. 407–414, 2013.
24. CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KWAK, H. C.; LEE, J. Y.; KANG, K. W.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 691-704, 2015.
25. CINGI, M. R.; De ANGELIS, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in Vitro**, v. 5, p. 119-125, 1991.
26. CLOGSTON, D.J.; PATRI, A.K. Zeta potential measurement. **Methods in Molecular biology**, v. 697, p. 63-70, 2011.
27. COMSA, S.; CIMPEAN, A.M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p.3147-54, 2015.
28. CRUZ, L.; ASSUMPÇÃO, E.; GUTERRES, S. S.; POHLMAN, A. R. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in eudragit S100/HPMC blend microparticles. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1170-1174, 2009.
29. DAI, J.; NAGAI, T.; WANG, X.; ZHANG, T.; MENG, M.; ZHANG, Q. pH-sensitive nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 229-240, 2004.
30. DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH, D. F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, E57, 2018.
31. DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; Külkamp-Guerreiro, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28-31, e15235, 2013.
32. DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; DA SILVA, M.M.; PAVAN, F. R.; BATISTA, A. A.; VARANDA E. A. In vitro evaluation of the cyto-genotoxic potential of Ruthenium(II) SCAR complexes: a promising class of antituberculosis agentes. **Mutation Research**, v. 798–799, p. 11-18, 2016.

33. De OLIVEIRA, A.P.; de SOUZA, J. F.; da SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; de CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; dos SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and Chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, n. 11, p. 1053-1063, 2013.
34. DRZEWIECKA-ANTONIK, A.; REJMAK, P.; KLEPKA, M. T.; WOLSKA, A.; PIETRZYK, P.; STEPIEN, K.; SANNA, G.; STRUGA, M. Synthesis, structural studies and biological activity of novel Cu(II) complexes with thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p. 8-16, 2017.
35. ESCOBAR, M. L.; ECHEVERRÍA, O. M.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Necrosis as Programmed Cell Death. **Intech Open Science/open mind**, Chapter 19, p.419-434, 2015.
36. EKENNIA, A.; ONWUDIWE, D. C.; OLASUNKANMI, L. O.; OSOWOLE, A. A.; EBENSO, E. E. Synthesis, DFT Calculation, and Antimicrobial Studies of Novel Zn(II), Co(II), Cu(II), and Mn(II) Heteroleptic Complexes Containing Benzoylacetone and Dithiocarbamate. **Bionorganic Chemistry and Applications**, v. 2015, ID789063, 2015.
37. EVONIK INDUSTRIES – Eudragit Acrylic Polymers for Solid Oral dosage forms. Disponível em: < https://healthcare.evonik.com/sites/lists/NC/DocumentsHC/Evonik-Eudragit_brochure.pdf>. Acesso em: 07/01/2020.
38. FIRMINO, G. S.; SOUZA, M.V. de; PESSOA, C.; LOURENÇO, M. C.; RESENDE, J. A.; LESSA J. A. Synthesis and evaluation of copper(II) complexes with isoniazid-derived hydrazones as anticancer and antitubercular agents. **Biomaterials**, v. 29, n. 6, p. 953-963, 2016.
39. FREIRE; R. L. M.; MARQUES, M. B. de F.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. de S.; OLIVEIRA, R. B. de; ALVES, R. A. Synthesis and evaluation of platinum complexes with potential antitumor activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, 2017.
40. FREY, M.; BOBBALA, S.; KARABIN, N.; SCOTT, E. Influences of nanocarrier morphology on therapeutic immunomodulation. **Nanomedicine**, v. 13, n. 14, p.195-1811, 2018.
41. FRESHNEY, I. R. Culture of animal cells. **A manual of Basic Technique**. 5ª edição. 2005.
42. GAZI, A.S.; SAILAJA, A.K. Preparation and Characterization of Paracetamol Loaded Eudragit S100 Nanoparticles by Salting Out Technique. **Journal of Developing Drugs**, v. 7, n. 1, 2018.
43. GONZÁLEZ, S. E. F.; ANGUIANO, E. A.; HERRERA, A. M.; CALZADA, D. E.; PICHARDO, C. O. Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities

- of a novel copper(II) complex against human cervical cancer. **Toxicology**, v. 314, p. 155-165, 2013.
44. GRAU, J.; RENAU, C.; CABALLERO, C. R.; CAUBET, A.; POCKAT, M.; LORENZO, J.; GAMEZ, P. Evaluation of the metal-dependent cytotoxic behaviour of coordination compounds. **The Royal Society of Chemistry**, v. 47, p. 1-6, 2018.
 45. HAAS; K. L., FRANZ; K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. **Chemistry Review**, v. 109, n. 10, p. 4921-4960, 2009.
 46. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.
 47. HEBERT, A.; BISHOP, M.; BHATTACHARYYA, D.; GLEASON, K.; TOROSIAN, S. Assessment by Ames test and comet assay of toxicity potential of polymer used to develop field-capable rapid-detection device to analyze environmental samples. **Applied Nanoscience**, v. 5, p. 763-769, 2015.
 48. HUDMAN, D.A.; SARGENTINI, N.J. Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity. **Springerplus**; v. 2, p. 55, 2013.
 49. HUSSAIN, A.; ALAJMI, M. F.; REHMAN, M. T.; KHAN, A. A.; SHAIKH, P. A.; KHAN, R. A. Evaluation of Transition Metal Complexes of Benzimidazole-Derived Scaffold as Promising Anticancer Chemotherapeutics. **Molecules**, v. 23, n.5, p.1232, 2018.
 50. HWANG, T. L.; ALJUFFALI, I. A.; LIN, C. F.; CHANG, Y. T.; FANG, J. Y. Cationic additives in nanosystems activate cytotoxicity and inflammatory response of human neutrophils: lipid nanoparticles versus polymeric nanoparticles. **Internacional Journal of nanomedicine**, v. 7, n. 10, p. 371-85, 2015.
 51. ISO 10993-5. International Organization for Standardization – ISO 10993-5:2009(E). Biological evaluation of medical devices: Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
 52. JAIN, A.K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 524-539, 2019.
 53. KADIAN, S.S.; HARIKUMAR, S.L. Eudragit and its Pharmaceutical Significance. **Pharmainfo.net**. 2009.
 54. KEAWPRADUB, N.; ENO-AMOOQUAVE, E.; BURKE, P. J.; HOUGHYON, P. J. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. **Planta Médica**, v. 65, n. 4, p. 311-315, 1999.
 55. KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

56. KITTELSON, B. Proceedings of the Conference on Current Research on Diesel Exhaust Particles of the Japan Association of Aerosol Science and Technology, Tokyo, 9 January 2001 (unpublished), and references therein.
57. KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAMAM, L.M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.
58. SMITH, G.D.; BEDROV, D. Dispersing nanoparticles in a polymer matrix: are long, dense polymer tethers really necessary? **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 19, p. 1239-43, 2009.
59. LOH, D. S.; ER, H. M.; CHEN, Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, p. 406–414, 2009.
60. LOPES, C. de C.A.; LIMIRIO, P. H. J. O.; NOVAIS, V. R.; DECHICHI, P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 53, n. 1, p. 747-769, 2018.
61. LUXBACHER, T (2014). The zeta guide: principles of the streaming potential technique¹. ed. **Anton Paar GmgH**, p. 123 [Internet]. Published 2014; Last Update: January 17, 2020.
62. MAHADEVAN, B.; SNYDER, R. D.; WATERS, M. D.; BENZ, R. D., KEMPER, R. A.; TICE, R. R., RICHARD, A. M. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 339-54, 2011.
63. MANNING, T.; PLUMMER, S.; BAKER, T.; WYLIE, G.; CLINGENPEEL, A. C.; PHILLIPS, D. Development of a three component complex to increase isoniazid efficacy against isoniazid resistant and nonresistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 20, p. 4621-7, 2015.
64. MANZANO, C. M.; BERGAMINI, F. R. G.; LUSTRI, W. R.; RUIZ, A. L. T. G.; de OLIVEIRA, E. C. S.; RIBEIRO, M. A.; FORMIGA, A. L. B.; CORBI, P. P. et al. Pt(II) and Pd(II) complexes with ibuprofen hydrazide: Characterization, theoretical calculations, antibacterial and antitumor assays and studies of interaction with CT-DNA. **Journal of Molecular Structure**, v. 1154, p. 469–479, 2017.
65. MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.
66. MASKOVÁ, E.; NAISEROVÁ, M.; KUBOVÁ, K.; MASEK, J.; PAVLOKOVÁ, S.; URBANOVÁ, M.; BRUS, J.; VYSLOUZIL, J.; VETCHÝ, D. Highly Soluble Drugs Directly Granulated by Water Dispersions of Insoluble Eudragit® Polymers as a Part of Hypromellose K100M Matrix Systems, **Biomed Research International**, v. 19, ID:8043415, p.13, 2019.

67. MERCK. Polymeric Drug Delivery Techniques, 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/drug-delivery/drug-delivery-questions.html> >. Acesso em: 17/12/19.
68. MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.
69. MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agent. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19; p.144-153, 2014.
70. NDAGI; U., MHLONGO; N., SOLIMAN; M.E. Metal complexes in câncer therapy – na update from drug design perspective. **Drug Design Development and Therapy**, v. 11, p. 599-616, 2017.
71. NGWULUKA, N. C.; NEP, E. I.; OCHEKPE, N. A.; ODUMOSU, P. O.; OLORUNFEMI, P. O. Eudragit E100 and Polysaccharide Polymer Blends as Matrices for Modified-Release Drug Delivery I: Physicomechanical Properties. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research December**, v. 14, n. 12, p. 2155-2162, 2015.
72. NUNES, L. G., GONTIJO, D. C., SOUZA, C. J. A., FIETTO, L. G., CARVALHO, A. F., LEITE, J. P. V. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra*(Jacq.) K. Schum. **Environmental Toxicology Pharmacology**. v. 33, p. 297-303, 2012.
73. OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MULLER, H. R.; KECK, M. C. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 56–67, 2010.
74. O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n.17, p. 5421-5426, 2000.
75. OLIVEIRA, N. de M.S.; RESENDE, M. R.; MORALES, D. A.; UMBUZEIRO, G. de A.; BORIOLLO, F.G. In vitro mutagenicity assay (Ames test) and phytochemical characterization of seeds oil of *Helianthus annuus* Linné (sunflower). **Toxicology Reports**, v. 3, p. 733–739, 2016.
76. OLIVEIRA, J. S.; de SOUZA, E.H.; de SOUZA, O.N.; MOREIRA, I.S.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A. Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 19, p. 2409-2424, 2006.
77. OLIVEIRA, B. G. State of the art in hydrogen bond. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1313-1322, 2015.
78. OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018. Número de pessoas tratadas para tuberculose bate recorde em 2018; no entanto, mais de 3 milhões ainda não têm acesso. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=604

[5:numero-de-pessoas-tratadas-para-tuberculose-bate-recorde-em-2018-no-entanto-mais-de-3-milhoes-ainda-nao-tem-acesso&Itemid=812](#)> Acesso em 11/11/2019.

79. ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 45, p. 1943–1946, 2001.
80. OTT, I.; GUST, R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. **Archiv Der Pharmazie**, v. 340, n. 3., p. 117-126, 2007.
81. PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal Oncology**, v. 3, p. 473-476, 1993.
82. PAHONTU, E.; ILIES, D.C.; SHOVA, S.; PARASCHIVESCU, C.; BADEA, M.; GULEA, A.; ROSU, T. Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Antimicrobial Activity of Copper(II) Complexes with the Schiff Base Derived from 2-Hydroxy4-Methoxybenzaldehyde. **Molecules**, v. 20, p. 5771-5792, 2015.
83. PAIVA, R., NOGUEIRA, R.A., ALVES, J.L.A. Calculations of the atomic and the electronic structures of 4d-transition-metal nitrides. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, p. 470-473, n. 2, 2006.
84. PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAEL, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p.2720–2722, 2002.
85. PAVAN, F. R.; DA SILVA, M. P. I.; LEITE, S. R.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S.G.; LEITE, C. Q. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1898–1905, 2010.
86. PRESA, A., BRISSOS, R. F., CABALLERO, A. B., BORILOVIC, I., KORRODI-GREGÓRIO, L., POREZ-TOMUS, R. GAMEZ, P. Photoswitching the Cytotoxic Properties of Platinum (II) Compounds Angewandte. **Drug Design**, v. 54, p. 1–6, 2015.
87. RABAHI, M. F.; SILVA JUNIOR, J.L.R. da; FERREIRA, A.C.G.; TANNUS-SILVA, D.G.S.; CONDE, M.B. Tratamento da Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 5, p. 472-486, 2017.
88. RODENAK-KLADNIEWA, B. Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, 118575, 2019.
89. RONCONI, L., & SADLER, P. J. (2007). Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1633-1648. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.017

90. RIAZ, U.; ASHRAF, S.M. Characterization of Polymer Blends: Characterization of Polymer Blends with FTIR Spectroscopy. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**. Weinheim, Germany, Chapter 20, 2015.
91. RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual [Internet]. Published May 1, 2013; Last Update: July 1, 2016. (PMID: 23805433)
92. SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. de L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.726, p. 726-737, 2003.
93. SERRA, C. H. dos R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, p. 79-88, 2007.
94. SHAMS, T. et al. Electrospayed microparticles for intestinal delivery of prednisolone. **Journal of the royal society interface**, v.15, p. 491-451, n.145, 2018.
95. SHRIVASTAV, N.; DEYU LI, D.; ESSIGMANN J., M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 59–70, 2010.
96. SILVA, P. B.; BONIFÁCIO, B. V.; FREM, C. G.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FERREIRA, A. M. C.; LOPES, E. O.; RADDI, M. S.; 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, p. 22534-22545, 2015.
97. SILVA, P. B.; FREITAS, E. S.; BERNEGOSI, J.; GONÇALEZ, M. L.; SATO, G.; LEITE, C. Q.; PAYAN, F. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p. 241–260, 2016
98. SOUSA FILHO, P.C. DE; SERRA, O.A. Liquid phase synthesis methodologies for the obtainment of rare earth-based inorganic nanomaterials. **Química Nova**, v. 38, p. 679-696, n. 5, 2015.
99. SPRECKELMEYER, S; ORVIG, C; CASINI, A. Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallo drugs: An Overview beyond Cisplatin. **Molecules**, v. 19, p. 15584-15610, 2014.
100. STETEFELD, J.; MCKENNA, S.A.; PATEL, T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v.8, n.4, p. 409–427, 2016.
101. VACULIKOVA, E. et al. Primary Investigation of the Preparation of Nanoparticles by Precipitation. **Molecules**, v.17, n.9, p.11067–11078, 2012.

102. VEGA-AVILA, E., PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the West Pharmacology Society**, v.54, p.10–14, 2011.
103. WILSON; R.E., DE SIO; S., VALLET; V. Protactinium and the intersection of actidine and transition metal chemistry. **Nature Communications**, v.9, n.622, 2018.
104. JIN, X-D; WANG, H.; XIE, X-K.; SUN, J-Y.; LIANG, H-M. Synthesis, characterization, crystal structure, and biological activity of the copper complex. *Russ. Journal of Coordination Chemistry*, v.36, p.458–462, 2010.
105. YING, X.Y.; CUI, D.; YU, L; DU, Y-Z. Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1357–1364, 2011.
106. ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 481-489, 2003.

8. ANEXO

Cyto-genotoxic evaluation of novel anti-tubercular Copper (II) complexes containing isoniazid-based ligands

Nathália Ferreira Fregonezi¹, Fabiana Aparecida de Souza¹, Nadia Andrade Aleixo¹, Pietra Stefany da Silva Gomes¹, Rafaela Baldassari Silvestre¹, Rone Aparecido De Grandis^{1,2}, Patricia Bento da Silva², Fernando Rogério Pavan², Marlus Chorilli², Flavia Aparecida Resende^{1*}

¹UNIARA- University of Araraquara, Department of Biological Sciences and Health, CEP 14801-340, Araraquara, São Paulo, Brazil

²UNESP-São Paulo State University, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara- Department of Biological Sciences, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil

*Dr. Flávia A. Resende, UNIARA - Carlos Gomes, 1338, 14801-334, Araraquara, São Paulo, Brazil. E-mail: flaviabiomed@yahoo.com.br Phone: +55 16 33017358

ABSTRACT

Considering the promising previous results of Cu (II) complexes with isoniazid active ligand against *Mycobacterium tuberculosis*, the main causative agent of tuberculosis, novel biological assays evaluating its toxicogenic potential were performed to ensure the safe use. The genotoxicity/mutagenicity of the complexes CuCl₂(INH)₂.H₂O (**I1**), Cu(NCS)₂(INH)₂.5H₂O (**I2**) and Cu(NCO)₂(INH)₂.4H₂O (**I3**) was evaluated by the Comet, Micronucleus-cytome and *Salmonella* microsome (Ames test) assays. The cell viability using resazurin assay indicated that **I1**, **I2** e **I3** had moderate to low capacity to reduce the viability of colorectal cells (Caco-2), liver cells (HepG2), lung cells (GM 07492 and A549) and endothelial cells (HU-VE-C). On genotoxicity/mutagenicity, **I1** complex did not induce sizable levels of DNA damage in HepG2 cells (Comet assay), and gene (Ames test) and chromosomal (Micronucleus-cytome assay)

mutations. Already, **I2** and **I3** complexes were considered mutagenic in the highest concentrations used. In light of the above, these results contribute to valuable data on the safe use of Cu(II) complexes. Considering the absence of mutagenicity and cytotoxicity of **I1**, this complex is a potential candidate for the development of a new drug to the treatment tuberculosis, while **I2** and **I3** require caution in its use.

Keywords: Copper(II) complexes, citotoxicity, Ames test, Micronucleus-cytome assay, Comet assay.

1. Introduction

Since the discovery of the antiproliferative activity of cisplatin, medicinal chemistry has seen impressive advances in bioinorganic chemistry, with a crescent interest in study the biological activities of metal complexes (Gasser & Metzler-Nolte, 2012).

The effectiveness of cisplatin in cancer chemotherapy with serious side effects as ototoxicity, neurotoxicity, nephrotoxicity and the development of resistance mechanisms by tumor cells (Shen et al., 2012; Sheth et al., 2017; Kanat et al., 2017) has stimulated the investigation of other metal complexes, as iron, ruthenium, silver, gold and copper complexes (Oliveira et al., 2006; Lai et al., 2015; Asadi et al., 2017; Dias et al., 2018, Bollu et al., 2019), allowing the discovery of other biological activities, such as antibacterial, antiparasitic and anti-inflammatory action (Silva et al., 2016; Miranda et al., 2018).

The versatility in the biological and pharmacological activities afforded by coordination compounds is not determined just by the presence of the metal itself, but also by the oxidation state, number and types of ligands, redox behavior, kinetic liability, hydro- and lipophilicity and the coordination geometry of the complex may also affect their mechanisms of action (Chen et al., 2009; Tisato et al., 2010; Gasser & Metzler-Nolte, 2012).

In this context, several groups have studied and developed copper (Cu) based complexes with potential use as therapeutic agents (Para et al., 2001; Iakovidis et al., 2011; Serment-Guerrero et al., 2017; Bollu et al., 2019), with the hypothesis that essential metal atoms may be less toxic than other metal-based compounds. One of the applicabilities related to Cu(II) complexes, especially with isoniazid (INH) as a biological ligand, is the activity against *Mycobacterium tuberculosis*, the main causative agent of tuberculosis (TB) (Silva et al., 2016; Firmino et al., 2016). INH was first introduced in tuberculosis therapy in the 50s. Since then, it

is regarded as one of the most commonly used and efficient drugs in treatment for new cases of drug-susceptible TB, among with rifampicin, ethambutol and pyrazinamide, both first-line drugs, in a 6-month regimen of treatment (WHO, 2018).

However, the increased incidence of multidrug-resistant (MDR-TB), and more recently, extensively drug resistant (XDR-TB) strains of *Mycobacterium tuberculosis*, compromises the effectiveness of the treatment, rendering the patients infected practically without any pharmacological alternative and supporting the urgency for novel antituberculosis agents (Firmino et al., 2016; De Grandis et al., 2016, WHO, 2018).

Considering the activity showed by the Cu(II) complexes against *Mycobacterium tuberculosis* and the recommended pre-clinical studies, we aim to investigate the genetic toxicity profile of three new Cu(II) complexes: $\text{CuCl}_2(\text{INH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**I1**); $\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**I2**) and $\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**I3**), whose the proposed structures for the compounds are shown in Figure 1, ensuring their genetic safe development as possible candidates in the anti-TB therapy.

→Insert Fig. 1

2. Methods

The synthesis and characterization procedures of the complexes **I1**, **I2** and **I3** are detailed in Silva et al. (2015).

2.1. Chemicals and Culture Media

Dimethyl sulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride (MgCl_2), potassium chloride (KCl), L-histidine monohydrate, D-biotin, cytochalasin B, 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), aflatoxin B₁ (AFB₁), methyl methanesulfonate (MMS), mitomycin C (MMC), sodium azide (SA), 2-anthracene (2-AA), 2-aminofluorene (2-AF), resazurin sodium salt, and hydrogen peroxide solution 30% (w/w) were purchased from Sigma-Aldrich® MERCK (St. Louis, MO, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, Basingstoke, HAM, UK) and Bacto Agar (BD Bacto™, Sparks, MD, USA) were used as bacterial media. D-Glucose, magnesium sulfate, citric acid monohydrate, anhydrous dibasic potassium phosphate, sodium

ammonium phosphate, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

2.2. Cell lines and Culture Conditions

The cell lines used were human lung fibroblasts (GM07492-A), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, ATCC - CRL-1730TM), human colorectal adenocarcinoma (Caco-2, Rio de Janeiro Cell Bank no. 0059), human hepatocellular carcinoma (HepG2, ATCC-HB-8065TM), lung adenocarcinoma cells (A549, ATCC-CCL-185TM). The cells were maintained as monolayer in plastic culture flasks (25 cm²) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Nutricell), at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air under saturating humidity.

2.3. Cytotoxicity assay

The resazurin redox assay was used as indicator of cell viability. Cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/well in 96-well microplates (TPP[®]) and exposed for 24h to different concentrations of the tested complexes (3.9 to 500 µg/mL). MMS (300 µM) was the reference cytotoxic drug (positive control) and DMSO 0.5 % (v/v) was used as vehicle control. After treatment, the compounds were removed, and the cells washed with phosphate-buffered saline (PBS- pH 7.4). 50 µL of resazurin solution (0.01% w/v) was added to each well and the plates were incubated for 2h. The reading was performed in a microplate Synergy H1 (BioTek[®]) reader using excitation and emission filters at wavelengths of 560 and 590 nm, respectively. The potency of cell growth inhibition for each complex was expressed as an IC₅₀ value that represents the concentration required to reduce the viability of cells at 50%. IC₅₀ was calculated from GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) by plotting cell survival against the respective concentrations of the test compound.

2.4. Comet Assay

The comet assay was performed according to the protocol reported by Tice et al. (2000). HepG2 cells (1.0×10^5 cells) were seeded in 6-well culture plates and cultivated in complete culture medium, under standard conditions, for 24 h. Three different concentrations of the

complexes were evaluated and each protocol was performed in triplicate on three different days to ensure reproducibility. The choice of non-cytotoxic concentrations was based on the results of previous experiments of cell viability. The cells were treated for 24 h with the complexes **I1**, **I2** and **I3** (3.9 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 μM hydrogen peroxide (positive control), 0.5% DMSO (solvent control), or DMEM (negative control), and cell viability was determined by the trypan blue exclusion technique. Samples with viability $> 80\%$ were subjected to the comet assay, as follows.

Cell suspensions were transferred to agarose-coated slides, which were coverslipped and cooled at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The coverslips were removed, and the slides were immersed in freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10) for 1 h, at 4 $^{\circ}\text{C}$. Next, the slides were transferred to an electrophoresis chamber filled with buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA pH > 13), and electrophoresis was conducted under standard conditions (25 V; 300 mA; 1.25 Vcm^{-1}) for 20 min. The slides were neutralized with 0.4 M Tris pH 7.5, air-dried, fixed in absolute ethanol for 5 min, and stained with GelRed[®] (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) (GelRed/PBS; 1:10.000 μL v/v). The samples were analyzed using a fluorescence microscope (Carl Zeiss, AxioStar Plus; Jena, Germany) with 515–560 nm excitation filter and 590 nm barrier filter.

For each treatment, the extent and distribution of DNA damage indicated by the comet assay were evaluated by examining 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides (i.e. 300 cells per treatment). For each slide, the cells were visually scored and allocated to one of four classes (0, 1, 2 and 3) according to tail size as follows: class 0, undamaged: no tail; class 1, a short tail whose length was smaller than the diameter of the head (nucleus); class 2, tail length between 1 and 2 times the diameter of the head; and class 3, maximally damaged – a long tail measuring more than twice the diameter of the head. The few comets containing no head and those with almost all DNA in the tail or with a very wide tail, were excluded from the analysis since they may correspond to dead cells (Hartmann and Speit, 1997). A total of 300 cells were examined per treatment and the total score was calculated by multiplying the number of damaged cells by the value of the respective comet class (0, 1, 2 or 3) and then taking the sum for each treatment. Thus, the value 0 indicated no damage and 300 was taken as maximum damage.

2.5. Cytokinesis block micronucleus-cytome assay (CBMN-cyt)

CBMN-cyt was performed according to “*Analysis of in vitro micronucleus assay using the IN Cell analyser 2000 micronuclei formation analysis module*” (GE, 2009), with modifications.

For genotoxicity assessment at chromosomal level, 1×10^4 HepG2 cells/well were seeded in 96-well microplates (TPP®), incubated for 24 h in complete DMEM medium for cell adhesion, washed with PBS, and then treated with three concentrations of the complexes. The choice of concentrations was based on the IC₅₀ values of the complexes

The mutagen AFB₁ (5 µM) was used as positive control to evaluate the metabolic capacity of HepG2 cells. Negative (untreated) and solvent (DMSO, 0.5%) controls were also included in the assays.

After 24h of treatment, the cells were washed twice with PBS, and fresh serum-supplemented medium containing cytochalasin B (30 µM) was added. HepG2 cells were incubated for an additional 28 h.

At the end of this period, the plate was washed with PBS and the cells were fixed with 100 µL/ well 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. Cells were labeled with 100 µL/ well fluorescein Isothiocyanate –FITC (Sigma) diluted in PBS at 10 µM for 30 minutes, then the wells were washed 3 times with PBS and added 100 µL / well Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) at a concentration of 5µM for 15 minutes to mark the cytoplasm and cell nucleus, respectively. The images were then captured on the IN cell Analyzer 2000 System light microscopy apparatus, located at the Proteomics Center of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Unesp-Araraquara.

The images were analyzed and the criterion established by Fenech (2007) was used for the analysis of micronuclei (MNs), nucleoplasmic bridges (NPBs, biomarkers of dicentric chromosomes resulting from telomere end-fusions or DNA misrepair) and nuclear buds (NBUDs, biomarkers for gene amplification and altered gene dosage events). A total of 6000 binucleated cells were scored per treatment, corresponding to 2000 cells/treatment/repetition.

The nuclear division index (NDI) was determined for 1500 cells analyzed per treatment, for a total of 500 cells/repetition. Cells with well-preserved cytoplasm containing 1–4 nuclei were scored. The NDI was calculated according to Eastmond and Tucker (1989) using the following formula:

$$\text{NDI} = \frac{[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]}{N}$$

where M1–M4 is the number of cells with 1, 2, 3 and 4 nuclei, respectively, and N is the total number of viable cells.

2.6. Ames test

The *Salmonella* mutagenicity assay (Ames test) was performed with *S. Typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation, by the preincubation method (Maron & Ames, 1983). These strains were kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA).

For the experiments, the strains were grown overnight from frozen cultures for 16 h in Oxoid Nutrient Broth No.2. Five different concentrations of each complex diluted in DMSO were tested. The concentrations were selected by a preliminary toxicity test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of His⁺ revertants or as an alteration in the auxotrophic background (*i.e.*, background lawn) (Maron & Ames, 1983). The various concentrations of complexes to be tested were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) or with 0.5 mL of 4% S9 mixture and 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min.

The metabolic activation mixture (S9 fraction), prepared from livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/ kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl₂, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% 0.1 M NADP, 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water (Maron & Ames, 1983).

Thereafter, 2 mL of top agar were added, and the mixture was poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated for 48h at 37 °C and the His⁺ revertant colonies were counted.

The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9-mix were NPD (10 µg/plate) for TA98 and TA97a, SA (1.25 µg/plate) for TA100 and MMC (0.5 µg/plate) for TA102. In tests with metabolic activation, 2-AA (1.25 µg/plate) was used with TA98, TA100 and TA97a and 2-AF (10 µg/plate) with TA102. DMSO was used as the negative (solvent) control (100 µL/plate). The assay was performed in triplicate.

Besides the statistical analysis, the mutagenic index (MI) was calculated for each concentration tested, this being the average number of revertants per plate with the test compound divided by the average number of revertants per plate with the negative (solvent) control. A test solution was considered mutagenic when a dose-response relationship was detected and a two-fold increase in the number of mutants ($MI \geq 2$) was observed for at least one concentration (Mortelmans & Zeiger, 2000).

2.7. Statistical Analysis

The results of the cytotoxicity, comet and micronucleus-cytome assays were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test at $P < 0.05$. The experimental criterion was the significance of the response in relation to the negative control.

In the Ames test, the results were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from Research Triangle Institute, RTP, NC, USA), adopting the Bernstein et al. (1982) model. The data (revertants/ plate) were assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression.

3. Results

The safety of the Cu(II) complexes were evaluated on different eukaryotic cells. The results were expressed as the concentration required to reduce the viability of cells at 50% (IC_{50}), and the values are shown in Table 1. The **I2** complex was slightly more toxic than **I1** and **I3** to all cell lines, except against HepG2, where **I1** was most potent.

The differences between the tumorigenic and non-tumorigenic cells seems to alter the toxicity effect of the complexes. The tumor cell lines - Caco-2, HepG2 and A549 - ($38.4 \pm 1.5 \leq IC_{50} \leq 173.8 \pm 43.8 \mu\text{g/mL}$) were more sensitive than non-tumor cell lines (GM 07492 and HU-VE-C) ($98.0 \pm 1.1 \leq IC_{50} \leq 344.6 \pm 17.6 \mu\text{g/mL}$).

Among all cells, Caco-2 was the most sensitive cell line, with IC_{50} values ranging from 38.4 ± 1.5 to $66.8 \pm 10.0 \mu\text{g/mL}$. The CuCl_2 salt used to prepare the complexes was also evaluated, showing greater cytotoxic potentiality against the tested strains compared to the complexes, except against Caco 2, where CuCl_2 was less potent.

→Insert table 1

Concerning genotoxicity/mutagenicity, the frequencies of DNA migration in the comet assay are shown in Table 2 and MNs, NPBs and NBUDs, besides the NDI values obtained by micronucleus-cytome assay are shown in Table 3. The NDI was calculated from the evaluation of the proportion of mono, bi, tri and multinucleate cells and the results obtained did not show any significant decrease of HepG2 cells capacity to divide at the concentrations tested.

In the Ames test, the tables 4-6 shows the mean number of revertants/plate (M), standard deviation (SD) and mutagenicity index (MI) obtained after treatments with the different concentrations of **I1**, **I2** and **I3** in strains TA98, TA100, TA97a and TA102 of *S. Typhimurium*, in the absence (-S9) and presence (+ S9) of metabolic activation.

The **I1** complex did not induced a statistically significant difference of DNA damage (comet assay) and had no mutagenic effects on *Salmonella* Typhimurium bacterial strains during the Ames test, but the groups treated with the different concentrations of **I1** increased the amount of NBUDs when compared to the negative control ($P > 0.05$).

The **I2** complex significantly increased the extent of DNA damage in the highest concentration (50 µg/ mL) and the frequency of MNs at the two highest tested concentrations (50 µg/ mL and 100 µg/ mL), showing a genotoxic effect by comet and micronucleus-cytome assays, respectively, besides an increase in the number of revertant colonies in the TA97a strain, after metabolic activation (+S9), with maximum MI of 1.75, indicating signs of mutagenicity by Ames test.

The treatment with **I3** also induced sizable levels of DNA damage in HepG2 cells, led to MNs and NBUDs formation at 75 and 150 µg/mL and induced revertants in the TA100 and TA97a strains with maximum MI of 1.67 and 1.59, respectively, demonstrating also genotoxicity by comet and micronucleus-cytome assays and signs of mutagenicity in the presence of S9 mix by Ames test.

→ Insert Tables 2-6

4. Discussion

The genetic toxicology battery for prediction of potential human risks is necessary and part of protocols that have to be applied to use new molecules as medicine, since it provides reliable data that support future clinical research. These assays are recommended and

encouraged by regulatory agencies all over the world, such as the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) and Food and Drug Administration (FDA). Besides the obligatoriness of the genotoxicity evaluation, due to the tendency of the metal complexes to interact with genetic material, it is essential to carry out preliminary tests to clarify this possible mechanism.

To provide more information about the mechanism and to fulfill the necessary studies required by international safety guides for developing drugs, in the present study we evaluate the cytotoxic and mutagenic/genotoxic potential of new Cu(II) complexes **I1**, **I2** and **I3**, that shown promising activity against *Mycobacterium tuberculosis* (Silva et al., 2016).

The Cu(II) ion has a high affinity for the amino groups that are present in the INH molecule, discovered in 1952 by Bernstein et al. (1952) and used as an important antibiotic in the treatment of *M. tuberculosis* infections. INH acts by inhibiting the synthesis of cell wall lipids and nucleic acids, in addition to respiration decrease (Manning et al., 2015). According to Manning et al. (2015), Cu cation can increase the stability of INH.

Here, cell viability assays using resazurin were carried out to determine IC₅₀ values for each Cu(II) complex following 24h treatment. Resazurin has been considered to act as an intermediate acceptor in the electron transport chain between the final reduction of oxygen and cytochrome oxidase. However, evidence suggests that not only mitochondrial enzymes but also other cytosolic and microsomal enzymes can reduce the dye. Therefore, the rate of resazurin reduction probably indicates cellular metabolism rather than specifically mitochondrial function. Thus, there is a direct correlation between the reduction of resazurin and cell proliferation (Ahamed et al., 1994; Riss et al., 2016).

In this study, the IC₅₀ values obtained for all complexes indicated low cytotoxicity. Lung cells (GM 07492 and A-549) were chosen based on their importance as host site for infections of *M. tuberculosis*. HepG2 cells are widely used to evaluate the toxicity of bioactive compounds due to biotransformation abilities (Choi et al., 2015) and an essential effect is the toxicity towards sites of absorption, so the evaluation of cytotoxicity in intestinal Caco-2 cells. In addition, we use HUVEC cells that express many important endothelial markers, as well as signaling molecules associated with vascular physiology (Cao et al., 2017).

Caco-2 cells were more sensitive to the effects of **I1** (IC₅₀: 51.4 ± 5.1 µg/ mL), **I2** (IC₅₀: 38.4 ± 1.5 µg/ mL) and **I3** (IC₅₀: 66.8 ± 10.0 µg/ mL) complexes, but IC₅₀ values found were higher than the MIC of the complexes against *M. tuberculosis* presented by Silva et al. (2016): 35-fold for **I1** (MIC: 1.459 µg/ mL), 2-fold for **I2** (MIC: 20.46 µg / mL) and 11-fold for **I3**

(MIC: 5.913 $\mu\text{g}/\text{mL}$), showing that these complexes are selective for *M. tuberculosis*, which represents great advances for anti-TB therapy.

Silva et al. (2016) also evaluated the cytotoxicity effects of these complexes in green monkey kidney (VERO), murine macrophages (J774A) and pulmonary fibroblasts (MRC-5) cell lines by the resazurin method and were considered non-cytotoxic against the cell lines tested.

For detection of the most relevant events for the multistep process of malignancy, i.e., DNA damage, clastogenicity and aneugenicity and gene mutations, we combined standard assays to evaluate genetic toxicology (comet, micronucleus and Ames test).

Through the comet assay, the first and extremely important observation was the absence of DNA strand breaks for **I1** and a significant genotoxic effect for **I2** and **I3**, following exposure to the highest concentration tested (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), as compared to negative control. Under alkaline conditions, this assay can detect single- and double-strand breaks, incomplete repair sites and alkali-labile sites, as well as DNA-protein and DNA-DNA cross-links (Burlinson et al., 2007).

I2 and **I3** were also able to increase the frequency of chromosome numerical or structural anomalies in HepG2, due the increase in the frequency of MNs at the two highest concentrations tested; the frequency of NBUDs was also significantly increased by **I1** and **I3**, what could be related to gene amplification (Fenech, 2007). No significant induction of NPBs was observed under the experimental conditions used.

Even though we observed micronuclei induction by complexes **I2** and **I3**, whether they were mediated by clastogenic or aneugenic mechanisms, because both leading to irreversible chromosome damage linked to early events in carcinogenesis (Bonassi et al., 2011), the clastogenic events can often be associated the formation of DNA adducts and the oxidative stress that result in DNA breakage, as detected in this study by the Comet assay. The results of both assays complement each other and suggest that the complexes are capable of inducing DNA damage by clastogenicity, representing a potential risk for human health.

According Serment-Guerrero et al (2017), the Cu(II) complexes can act by a redox mechanism, producing significant amounts of reactive oxygen species (ROS), which can react with DNA causing damage. Furthermore, they can interact chemically with the phosphate groups present in the DNA structure through hydrolysis reactions (Westerink & Schoonen, 2007; Serment-Guerrero et al, 2011).

Compound **I1** presents in its coordination sphere as an anionic ligand two halide ions (Cl^-), while compounds **I2** and **I3** present as anionic ligands two pseudohalide ions (NCS^- (**I2**))

and NCO^- (**I3**) (Silva et al., 2015). Despite the similarities, there are two significant differences between the halides and pseudohalides; the former constitutes stronger acids than the latter and in pseudohalides there are unsaturations which give it properties as complexing agents and marked reactivity (Anagnostopoulos, 1976). Based on these results, it can be suggested that the compounds **I2** and **I3** may be interacting with genetic material via nitrogen (**I2**) and oxygen (**I3**) atoms, respectively, so that the thiocyanate ions and cyanate are interacting mode bridging with the genetic material and the respective coordination compounds, and this interaction is better stabilizing the pseudohalides ions so that there isn't spontaneous reversal of the mutation.

HepG2 cells were used in this study, because, with exception of UGTs (UDP-glucuronosyltransferases), the HepG2 cell line has a complete set of phase II enzymes (SULT1A1, 1A2, 1E1, mGST-1, GST 11, NAT1 and EPHX1) that differed only modestly from those in human cryopreserved primary hepatocytes (Westerink & Schoonen, 2007). In addition, the complexes evaluated in this study (**I2** and **I3**) induced signs of mutagenicity only in experiments with metabolic activation by the Ames test, suggesting that the mechanism of mutagenicity for the complexes involves the metabolic activation, leading to the formation of metabolites that interact with the genetic material. Complex **I2** in the TA97a strain and with **I3** in the TA100 and TA97a strains; these strains detect base-pair substitution of C-G (TA100) and *frameshift* mutations in C-G sites (TA97a).

Salmonella Typhimurium/microsome assay (Ames test) is a widely accepted short-term bacterial assay for identifying substances that can produce genetic damage that leads to gene mutations. The use of a large number of *Salmonella* strains with preexisting mutations could give a hint about the mechanisms of action of the compounds because these newly mutated cells can grow in the absence of histidine and form colonies (Ames, 1973; Ames et al., 1973).

There are no data in the literature regarding mutagenicity at the gene level of Cu (II) complexes with INH as a biological ligand, but Becco et al. (2012) and Serment-Guerrero et al. (2017) evaluated the gene mutagenicity of the Cu complexes (casiopeins), which did not show positive results, as well as Duff et al. (2012) that also demonstrated the absence of mutagenicity of Cu complexes containing Schiff bases from conjugated quinolines as ligands by this same assay. However, hydrazine, an important metabolite of INH, shown to be the mutagenic in the Ames test (Braun et al., 1984), which could explain the evidence of mutagenicity observed in the present study.

To the best of our knowledge, the present data represent the first evaluation of genotoxicity/mutagenicity for these complexes. Given the observed anti-TB activity and its

potential as a lead compound for drug development, the combination of the assays used and the results obtained in this study are highly relevant.

5. Conclusion

The study on the cyto-genotoxicity of Cu(II) complexes with INH, **I1**, **I2** and **I3**, under the conditions used, allowed us to conclude that the compounds show no cytotoxicity in therapeutic doses.

I1, the complex with the best activity against *M. tuberculosis*, was not genotoxic/mutagenic as indicated by the evaluated parameters. The absence of such effects in the assays used is the first step toward deciding whether utilization of this complex in medicine is safe. Already, **I2** and **I3** complexes were considered mutagenic in the highest concentrations used. However, this effect, nonetheless, cannot be considered discouraging because these complexes have a much lower MIC for TB as evidenced by previous reports.

These results contribute to a better understanding of the genotoxic events that these complexes can induce and show how structural modification of molecules can interfere with the development of safer drugs. Moreover, the results provide enough data for other preclinical studies, discarding those mutagenic concentrations and continuing the research, in order to clarify the other mechanisms and conditions that mediate the biological effects of **I1**, **I2** and, **I3** in the short and long term.

Acknowledgements

This work was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/16278-9)” and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, Brazilian state and federal agencies.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Ahmed, S. A.; Gogal, R. M. Jr.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine

incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 170, n. 2, pp.211-24, 1994. doi: 10.1016/0022-1759(94)90396-4

Ames, B.N.. Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environmental Health Perspectives*, v. 6, pp, 115-118, 1973. doi: 10.1289/ehp.7306115

Ames, B.N.; Lee, F. D.; Durston, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 70, n.3, pp. 782-786, 1973. doi: 10.1073/pnas.70.3.782

Anagnostopoulos, A. Dimethylpyrazole complexes of the halides and pseudohalides of some transition metals. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 435-437, 1976. doi: 10.1016/0022-1902(76)80278-3

Asadi, Z.; Nasrollahi, N.; Karbalaee-Heidari, H.; Eigner, V; Dusek, M.; Mobaraki, N.; Pournejati, R. Investigation of the complex structure, comparative DNA-binding and DNA cleavage of two water-soluble mono-nuclear lanthanum(III) complexes and cytotoxic activity of chitosan-coated magnetic nanoparticles as drug delivery for the complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 178, pp. 125-135, 2017. doi: 10.1016/j.saa.2017.01.037.

Becco, L., Rodríguez, A.; Bravo, M. E.; Prieto, M. J.; Ruiz-Azuara, L.; Garat, B.; Moreno, V. Gambino, D. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: interaction with DNA and proteins and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 109, pp. 49–56, 2012. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010

Bernstein, L., et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mut Res*, 97, 4, 267–281, 1982. Doi: 10.1016/0165-1161(82)90026-7

Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *American Review of Tuberculosis*, v. 65, n. 4, pp. 357-64, 1952. (PMID: 14903503)

Bollu, V. S.; Bathini, T.; Barui, A. K.; Roy, A.; Ragi, N. C.; Maloth, S.; Sripadi, P.; Sreedhar B.; Nagababu, P.; Patra, C. R. Design of DNA-intercalators based copper(II) complexes, investigation of their potential anti-cancer activity and sub-chronic toxicity. *Materials Science and Engineering C. Materials for Biologicals Applications*, v. 105, n.110079, 2019. doi: 10.1016/j.msec.2019.110079.

Bonassi, S.; El-Zein, R.; Bolognesi, C.; Fenech, M.. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, v. 1, pp.93-100, 2011. doi: 10.1093/mutage/geq075.

Braun, R.; Jakel, H. P.; Schoneich, J. Genetic effects of isoniazid and its relationship to in vivo and in vitro biotransformation. *Mutation Research*, v. 137, p. 61-69, 1984. doi: 10.1016/0165-1218(84)90093-4

Burlinson, B.; Tice, R. R.; Speit, G.; Agurell, E.; Brendler-Schwaab, S. Y.; Collins, A. R.; Escobar, P.; Honma, M.; Kumaravel, T. S.; Nakajima, M.; Sasaki, Y. F.; Thybaud, V.; Uno, Y.; Vasquez, M.; Hartmann, A. In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*, v. 627, v. 1, pp. 31-5, 2007. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.08.011

Cao, Y.; Gong, Y.; Liu, L.; Zhou, Y.; Fang, X.; Zhang, C.; Li, Y.; Li, J. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 12, pp. 1359-1369, 2017. doi: 10.1002/jat.3470

Chen, D.; Milacic, V.; Frezza, M.; Dou, Q. P. Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 7, pp. 777-791, 2009. doi: 10.2174/138161209787582183

[Choi, J. M.](#); [Oh, S. J.](#); [Lee, S. Y.](#); [Im, J. H.](#); [Oh, J. M.](#); [Ryu, C. S.](#); [Kwak, H. C.](#); [Lee, J. Y.](#); [Kang, K. W.](#); [Kim, S. K.](#) HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, v. 38, n. 5, pp. 691-704, 2015. doi: 10.1007/s12272-014-0502-6.

De Grandis, R. A., Resende, F. A.; da Silva, M. M.; Pavan, F. R.; Batista, A. A.; Varanda, E. A. In vitro evaluation of the cyto-genotoxic potential of Ruthenium(II) SCAR complexes: a promising class of antituberculosis agents. *Mutation Research*, 798–799, 11-18, 2016. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.01.007.

Dias, J. S. M., et al., 2018. Pro-apoptotic activity of ruthenium 1-methylimidazole complex on non-small cell lung cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 187, p. 1-13. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.06.008.

Duff, B., et al. A. Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 686, 1-3, 45-55, 2012. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.06.004

[Eastmond, D. A.](#), [Tucker, J. D.](#), 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13, 1, 34-43. (PMID: 2783409)

Fenech, M. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, v. 2, n. 5, pp. 1084-1104, 2007. doi: 10.1038/nprot.2007.77

Firmino, G. S., et al. Synthesis and evaluation of copper(II) complexes with isoniazid-derived hydrazones as anticancer and antitubercular agents. *Biometals*, v. 29, n. 6, pp. 953-963, 2016. doi: 10.1007/s10534-016-9968-7

Gasser, G.; Metzler-Nolte, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.16, p. 84–91, 2012. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.01.013

GENERAL ELECTRIC HEALTHCARE. Micronuclei formation analysis module for IN cell analyser 2000. GE Healthcare, v.28, p. 14-60, 2009.

Hartmann, A.; Speit, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*, v. 90, n.2-3, pp.183-8, 1997. doi: 10.1016/s0378-4274(96)03847-7

Iakovidis, I., et al. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Molecular Biology International*, v. 2011. doi: 10.4061/2011/594529.

Kanat, O., Ertas, H., & Caner, B. Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World Journal of Clinical Oncology*, v.8, n 4, p. 329-335, 2017. doi: 10.5306/wjco.v8.i4.329

Lai, S. H., et al.. Cytotoxic activity, DNA damage, cellular uptake, apoptosis and western blot analysis of ruthenium(II) polypyridyl complex against human lung decarcinoma A549 cell. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152, 1–9, 2015. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.012

Manning, T.; Plummer, S.; Baker, T.; Wylie, G.; Clingenpeel, A. C.; Phillips, D. Development of a three component complex to increase isoniazid efficacy against isoniazid resistant and nonresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 20, pp. 4621-7, 2015. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.08.046.

Maron, D. M., Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 3-4, 173 – 215, 1983. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9

Miranda V. M.. In vitro leishmanicidal activity and theoretical insights into biological action of ruthenium(II) organometallic complexes containing anti-inflammatories, 2018. *Biometals*. doi: 10.1007/s10534-018-0145-z

Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1-2), 29 – 60, 2000. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6

Oliveira, J. S., et al.. Slow-Onset inhibition of 2-*Trans*-Enoyl-Acp (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, p. 2409-2424, 2006. doi: 10.2174/138161206777698927

[Para, A.](#), et al. Synthesis and in vitro tuberculostatic activity of Co (II), Cu (II) and Ni (II) complexes of dialdehyde starch dithiosemicarbazone. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 58, p. 405-408, 2001 (PMID: 11876449)

Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual [Internet]. Published May 1, 2013; Last Update: July 1, 2016. (PMID: 23805433)

Serment-Guerrero, J., et al. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 166, p. 68-75, 2017. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.11.007.

Serment-Guerrero, J., et al. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas, *Toxicology in vitro*, v. 25, n. 7, p. 1376-1384, 2011. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.008

Silva, P. B., et al. Nanostructured Lipid System as a Strategy to Improve the in Vitro Antibacterial Activity of Copper(II) Complexes. *Molecules*. v. 20, p. 22534-22545, 2015. doi: 10.3390/molecules201219822

Silva, P. B., et al. In Vitro Activity of Copper(II) Complexes, Loaded or Unloaded into a Nanostructured Lipid System, against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 17, n. 5, p. 745, 2016. doi: 10.3390/ijms17050745.

Shen, D-W. et al, 2012. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*, v. 64, p. 706–721. doi: 10.1124/pr.111.005637

Sheth, S.; Mukherjea, D.; Rybak L. P.; Ramkumar, V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, n. 338, 2017. doi: 10.3389/fncel.2017.00338

Tisato, F., et al. MARZANO, C.; PORCHIA, M.; PELLEI, M.; SANTINI, C. Copper in Diseases and Treatment s, and Copper-Based Anticancer Strategies. *Medicinal Research Reviews*, v. 30, n. 4, p. 708-749 2010. doi: 10.1002/med.20174.

Westerink, W. M. A., Schoonen, W. G. E. J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 21, p. 1592–1602, 2007. doi: 10.1016/j.tiv.2007.06.017

World Health Organization (WHO), 2018. Global tuberculosis report.

Tables

Table 1. IC₅₀ of Cu (II) complexes and salt on tested cell lines

	IC ₅₀ (µg/mL)				
	GM 07492	HU-VE-C	HepG2	A-549	Caco-2
CuCl₂	58.9 ± 1.7	52.4 ± 0.7	58.6 ± 4.8	36.2 ± 2.2	91.2 ± 3.9
I1	275.2 ± 9.8	152.0 ± 11.3	92.2 ± 8.5	100.8 ± 4.0	51.4 ± 5.1
I2	232.2 ± 25.8	98.0 ± 1.1	105.2 ± 4.5	46.0 ± 1.8	38.4 ± 1.5
I3	344.6 ± 17.6	214.9 ± 4.4	173.8 ± 43.8	112.2 ± 0.6	66.8 ± 10.0

Table 2. DNA migration in the comet assay observed for HepG2 cultures treated with different concentrations of I1, I2 and I3 complexes

Treatments	Classes*				Score*
	0	1	2	3	
DMSO 0.5%	71.3 ± 3.0	23.7 ± 4.0	5.0 ± 2.6	0	33.7 ± 4.0
C-	75.0 ± 4.2	17.0 ± 7.0	8.0 ± 2.8	0	33.0 ± 1.4
C+	9.3 ± 6.1	15.3 ± 5.03	51.3 ± 4.5 ^a	24.0 ± 6.0 ^a	190 ± 23.06 ^a
I1					
12.5 µg/mL	69.0 ± 9.8	26.0 ± 14.1	5.0 ± 4.2	0	36.0 ± 5.6
25 µg/mL	74.0 ± 5.3	21.3 ± 2.3	4.0 ± 2.0	0.6 ± 1.1	31.3 ± 9.4
50 µg/mL	64.0 ± 5.6	25.0 ± 4.2	11.0 ± 1.4	0	47.0 ± 7.0
I2					
12.5 µg/mL	80.0 ± 5.6	16.0 ± 2.8	3.0 ± 4.2	1.0 ± 1.4	25.0 ± 7.0
25 µg/mL	68.0 ± 9.7	25.0 ± 8.3	7.0 ± 1.4	0	39.0 ± 11.2
50 µg/mL	52.0 ± 3.6	39.0 ± 9.8 ^a	5.0 ± 7.0	4.0 ± 5.6	61.0 ± 9.2 ^a

I3					
12.5 µg/mL	69.0 ± 1.4	27.0 ± 1.4	2.0 ± 0	2.0 ± 0	37.0 ± 1.4
25 µg/mL	73.0 ± 15.5	19.0 ± 9.8	5.0 ± 4.2	3.0 ± 1.4	38.0 ± 2.6
50 µg/mL	48.0 ± 8.5	19.0 ± 1.4	18.0 ± 5.6 ^a	15.0 ± 4.2 ^a	100.0 ± 22.6 ^a

A total of 300 cells were examined per treatment and the total score was calculated by multiplying the number of damaged cells by the value of the respective comet class (0, 1, 2 or 3) and then taking the sum for each treatment.

*Values are the mean ± standard deviation.

^aSignificantly different from control (P < 0.05).

Table 3 Evaluation of the mutagenic effects of I1, I2 and I3 complexes on HepG2 cells by the micronucleus-cytome assay

Treatments	MN^a	NPBs^a	NBUDs^a	NDI^b
DMSO 0.5%	4 ± 3	1 ± 0	2 ± 1	1.87 ± 0.01
C-	3 ± 2	1 ± 0	1 ± 2	1.90 ± 0.12
C+	35 ± 6 ^c	12 ± 1 ^c	27 ± 6 ^c	1.76 ± 0.02
I1				
20 µg/mL	3 ± 1	2 ± 0	7 ± 2 ^c	2.02 ± 0.10
40 µg/mL	5 ± 1	2 ± 1	7 ± 2 ^c	1.97 ± 0.11
80 µg/mL	5 ± 1	1 ± 0	8 ± 1 ^c	1.91 ± 0.09
I2				
25 µg/mL	6 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	2.00 ± 0.04
50 µg/mL	11 ± 4 ^c	1 ± 1	3 ± 1	1.87 ± 0.16
100 µg/mL	15 ± 5 ^c	2 ± 0	1 ± 0	1.84 ± 0.13
I3				
37.5 µg/mL	3 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1.89 ± 0.10
75 µg/mL	13 ± 3 ^c	0 ± 0	7 ± 2 ^c	1.97 ± 0.08
150 µg/mL	12 ± 2 ^c	1 ± 2	9 ± 2 ^c	1.75 ± 0.23

Values shown as mean ± standard deviation.

MNs: micronucleus; NPBs: nucleoplasmic bridges; NBUDs: nuclear sprouts, NDI: nuclear division index.

Negative control (C-): untreated (DMEM); Solvent control: DMSO-dimethylsulfoxide (0.5%); Positive Control (C+): AFB₁ - aflatoxin B₁ (5 µM)

^aA total of 6000 binucleate cells were analyzed per treatment group.

^bA total of 3000 cells were analyzed by treatment group.

^cStatistically different from the DMSO group 0.5% (P < 0.05).

Table 4. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate and the mutagenic index (MI), in strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. Typhimurium* treated with I1, at various doses, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

I1	Number of revertents (M ± SD)/plate and MI								
	TA98		TA100		TA97a		TA102		
µg/plate	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	µg/plate	- S9	+ S9
0.0^a	19±1	18±4	91±18	82±4	139±11	143±19	0.0^a	255±24	228±28
15.6	23±6 (1.21)	25±4 (1.36)	113±25 (1.24)	122±17 (1.49)	158±10 (1.14)	137±24 (0.96)	7,8	250±11 (0.98)	207±25 (0.91)
31.2	22±3 (1.14)	23±3 (1.28)	105±13 (1.16)	120±13 (1.48)	143±29 (1.03)	120±15 (0.83)	15,6	204±24 (0.80)	186±27 (0.82)
62.5	21±2 (1.09)	23±4 (1.28)	83±4 (0.92)	116±17 (1.42)	128±20 (0.92)	106±10 (0.74)	31,2	182±12 (0.71)	159±35 (0.70)
93.7	20±6 (1.04)	22±1 (1.22)	82±7 (0.90)	121±15 (1.49)	122±22 (0.88)	90±11 (0.63)	46,8	170±14 (0.67)	141±23 (0.62)
125.0	16±1 (0.82)	16±4 (0.91)	81±6 (0.89)	113±19 (1.38)	123±16 (0.88)	87±35 (0.61)	62,5	102±18 (0.40)	108±12 (0.47)
C+	772±122 ^b	687±35 ^e	1996± 53 ^c	1884±91 ^e	1654±66 ^b	1867±22 ^e	C+	2267±185 ^d	2421±133 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± SD = mean and standard deviation; MI= mutagenicity index; ^a Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO—100 µL/plate); Positive Control (C+); ^b 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate—TA98 and TA97a); ^csodiumazide (1.25µg/plate —TA100); ^d mitomycin (0.5µg/plate—TA102), in the absence of S9; and ^e2-anthramine (1.25µg/plate—TA98, TA100 and TA97a); ^f 2-aminofluorene (10.0µg/plate—TA102), in the presence of S9.

Table 5. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate and the mutagenic index (MI), in strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. Typhimurium* treated with I2, at various doses, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

I2	Number of revertents (M ± SD)/plate and MI								
	TA98		TA100		TA97a		TA102		
µg/plate	-S9	µg/plate	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.0^a	19±1	0.0^a	18±4	91±18	82±4	139±11	126±10	255±24	228±28
6.2	20±4 (1.04)	3.1	26±1 (1.44)	116±19 (1.27)	111±13 (1.36)	163±19 (1.18)	221±29 (1.75)*	249±11 (0.98)	190±18 (0.83)
12.5	19±5 (0.97)	6.2	23±6 (1.30)	113±14 (1.25)	96±5 (1.18)	138±17 (0.99)	218±19 (1.73)*	235±25 (0.92)	168±23 (0.74)
25.0	17±4 (0.91)	12.5	24±9 (1.31)	105±23 (1.15)	92±1 (1.12)	132±19 (0.95)	206±13 (1.63)*	222±23 (0.87)	149±26 (0.65)
37.5	17±3 (0.88)	18.7	24±2 (1.31)	102±15 (1.12)	87±3 (1.07)	128±18 (0.92)	190±23 (1.50)*	205±35 (0.80)	120±17 (0.53)
50.0	13±5 (0.67)	25.0	22±3 (1.24)	97±9(1.07)	88±11 (1.08)	131±10 (0.94)	182±12 (1.44)	199±28 (0.78)	132±13 (0.58)
C+	772±122 ^b	C+	687±35 ^e	1996± 53 ^c	1884±91 ^e	1654±66 ^b	1073±68 ^e	2267±185 ^d	2421±133 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± SD = mean and standard deviation; MI= mutagenicity index; ^a Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO—100µL/plate); Positive Control (C+); ^b 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0µg/plate—TA98 and TA97a); ^csodium azide (1.25µg/plate—TA100); ^d mitomycin (0.5µg/plate—TA102), in the absence of S9; and ^e 2-anthramine (1.25µg/plate—TA98, TA100 and TA97a); ^f 2-aminofluorene (10.0µg/plate—TA102), in the presence of S9.

Table 6. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate and the mutagenic index (MI), in strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. Typhimurium* treated with I3, at various doses, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

I3		Number of revertants (M ± SD)/plate and MI							
		TA98		TA100		TA97a		TA102	
µg/plate	-S9	µg/plate	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.0^a	19±1	0.0^a	18±4	91±18	82±14	139±11	126±10	255±24	228±28
31.2	22±8 (1.14)	15.6	22±4 (1.19)	115±25 (1.26)	136±25 (1.67)*	153±12 (1.10)	200±17 (1.59)*	284±32 (1.12)	192±12 (0.84)
62.5	21±5 (1.11)	31.2	21±2 (1.14)	106±11 (1.16)	131±22 (1.60)*	110±14 (0.79)	198±28 (1.56)*	299±27 (1.18)	175±31 (0.77)
125.0	18±3 (0.95)	62.5	19±3 (1.07)	101±14 (1.11)	123±27 (1.51)*	109±14 (0.79)	196±13 (1.55)*	275±39 (1.08)	142±22 (0.63)
187.5	16±4 (0.84)	93.7	19±5 (1.04)	93±12 (1.02)	128±16 (1.57)*	106±23 (0.76)	192±14 (1.52)*	259±25 (1.02)	142±19 (0.62)
250.0	15±6 (0.79)	125.0	17±3 (0.94)	90±10 (0.99)	118±15 (1.45)	73±12 (0.52)	150±11 (1.18)	179±33 (0.70)	134±26 (0.59)
C+	772±122 ^b	C+	687±35 ^e	1996± 53 ^c	1884±91 ^e	1654±66 ^b	1073±68 ^e	2267±185 ^d	2421±133 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± SD = mean and standard deviation; MI= mutagenicity index; ^a Negative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO—100 µL/plate); Positive Control (C+); ^b 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10.0 µg/plate—TA98 and TA97a); ^c sodium azide (1.25 µg/plate—TA100); ^d mitomycin (0.5 µg/plate—TA102), in the absence of S9; and ^e 2-anthramine (1.25 µg/plate—TA98, TA100 and TA97a); ^f 2-aminofluorene (10.0 µg/plate—TA102), in the presence of S9.

Figure legends:

Figure 1. Proposed structures by Silva et al. (2015) for the Cu(II) complexes with INH

