

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS PARA
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EM MODELO
MURINO”**

Autora: Cristina Maria de Barros

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, fevereiro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia da Escola de Farmácia e no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Este trabalho contou com a colaboração de:

Profa. Dra. Marta de Lana

Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, UFOP.

Dr. José Mário Carneiro Vilela

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG.

Dra. Margareth Spangler de Andrade

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG.

“Dedico este trabalho àqueles que sempre me amaram, apoiaram, compreenderam e me incentivaram, sendo os principais responsáveis pela superação dessa etapa tão importante na minha vida”

Agradeço à minha orientadora Vanessa, por todo o tempo de convivência e aprendizado, pela sua firmeza, determinação e estímulo que me fizeram chegar até aqui.

À Profa. Terezinha Bahia, sinceros agradecimentos pela orientação, amizade e incentivo durante todas as etapas deste trabalho.

À Margareth Spangler, pela acolhida no CETEC e pela disponibilização do microscópio de força atômica.

Ao Vilela, pela paciência e disposição para ajudar na obtenção das imagens no microscópio de força atômica.

À Profa. Marta de Lana pelos ensinamentos no laboratório e na sala de aula.

À Vanja, pela imensa colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Mônica de Oliveira pela acolhida no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia: Elaine, Diego Pollyana, Carina, e Juliana pelos bons momentos.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia: Sérgio, Paulo, Ivo, Daniela, Lisiane, Lorena, Ricardo, Geo e Stêfany, pela ajuda.

Aos funcionários do biotério que colaboraram com este trabalho.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação.

Às amigas Fabiane e Alvânia, pelas longas conversas e incentivos, muito obrigada pela acolhida e amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação, pela cooperação e os bons momentos que passamos juntos.

E finalmente, a Deus, que me proporcionou e continuará proporcionando grandes vitórias.

RESUMO

O presente trabalho trata do desenvolvimento farmacotécnico e da caracterização físico-química de formulações nanoestruturadas contendo diferentes fármacos com atividade antichagásica como os derivados imidazólicos e azólicos, além da avaliação biológica dessas preparações *in vitro*, em cultura acelular de epimastigotas de *T. cruzi*, e *in vivo* em modelo murino infectado com diferentes cepas de *T. cruzi*, tanto em modelos de fase aguda como crônica. Objetivou-se, portanto, avaliar a atividade e a eficácia, de diferentes formulações por diferentes vias e em diferentes regimes posológicos. Assim foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas contendo benznidazol, miconazol, cetoconazol, itraconazol e também um novo derivado azólico ainda em fase de estudos pré-clínicos, albaconazol (UR-9825). As nanoestruturas foram analisadas e caracterizadas utilizando-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, espectroscopia de correlação de fótons e anemometria do laser doppler associada a microeletroforese. O albaconazol associado às nanocápsulas foi o fármaco que apresentou melhor resultado na supressão da parasitemia e, portanto, essas formulações foram mais profundamente investigadas do ponto de vista físico-químico e estrutural. Uma nova metodologia de doseamento do albaconazol foi desenvolvida e utilizada para determinação da porcentagem e da eficiência de encapsulação nas nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona, além da determinação da cinética de liberação do albaconazol a partir das nanocápsulas. Os resultados mostraram que o albaconazol pode ser encapsulado em porcentagens em torno de 100% e com alta eficiência para valores próximos a 1mg/mL, indicando que a droga apresenta alta afinidade pelas nanocápsulas. O perfil de liberação do albaconazol a partir das nanocápsulas foi bifásico com uma liberação inicial inferior a 40% até duas horas e com uma liberação lenta e incompleta (<45%) até 10 horas de estudo. Foi observada também a capacidade de retenção do fármaco no interior das NC *in vivo*, especialmente pela via subcutânea. As nanocápsulas foram capazes de aumentar o tempo para reativação da parasitemia após tratamento e o número de animais com exame parasitológico negativo, mesmo após 120 dias do fim do tratamento, quando comparadas com o fármaco livre, especialmente quando altas doses foram utilizadas. Os dados sugerem que nas mesmas doses, o albaconazol na forma livre é mais rapidamente liberado para o sangue e exerce seu

efeito, ao passo que as nanocápsulas, provavelmente, retêm a droga a elas associadas por maior tempo, reduzindo a concentração que chega ao sangue e a velocidade de absorção, sendo nesse caso menos ativas. Entretanto, em doses maiores, 120mg/mL, as nanocápsulas foram mais ativas que o fármaco livre e muito menos tóxicas, indicando que são necessárias doses maiores para que a fração de dose liberada rapidamente reduza a parasitemia. Assim sendo, a fração retida nas NC é liberada mais lentamente causando o efeito supressivo sobre a parasitemia por maior tempo. A permanência do albaconazol no organismo parece ter sido alterada pelas nanocápsulas, ao mesmo tempo em que foi observada uma clara redução da toxicidade geral. Portanto, a vetorização desses compostos em sistemas nanoestruturados do tipo NC foi considerada positiva no presente trabalho uma vez que a farmacocinética da droga parece ter sido alterada pela encapsulação resultando em efeito de redução da parasitemia quando utilizados em doses mais altas.

ABSTRACT

In the present work, the pharmaceutical development and physicochemical characterization of nanostructured formulations containing different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs, such as the imidazole andazole derivatives were undertaken. The biological evaluation of these new formulations were also studied *in vitro*, in epimastigotes cultures of *T. cruzi*, and *in vivo*, in a murine model infected with different strains of *T. cruzi*, in both phases of disease development, acute and chronic. The main objective of this work was the evaluation of the activity and efficacy of the different formulations, by different routes and posologic regimens. Formulations containing benznidazole, miconazole, ketoconazole, itraconazole and also a new triazole derivative, albaconazole (UR-9825), were developed. The physicochemical characterisation was also undertaken by means of the atomic force microscopy, photon correlation spectroscopy and laser doppler anemometry. Among the drugs used in the biological tests of efficacy, albaconazole was the drug that presented the best results concerning parasitaemia reduction. Thus, physicochemical and structural features of the albaconazole formulations were analyzed in detail. In the present work, a new assay method of albaconazole based in UV spectroscopy was developed and used for the determination of the loading yield, loading efficiency and release kinetic of the drug from poli- ϵ -caprolactone nanocapsules. The results showed that albaconazole was efficiently entrapped in nanocapsules with high yielding (100%), indicating that the drug has high affinity for the nanocapsules. The release kinetic was biphasic, with an initial release lower than 40% after 2h and an incomplete and slow release after 10 hours of incubation. A burst effect was observed in the first 2 hours that was clearly related to the release of ABZ associated to NC surface, evidenced also by the zeta potential alterations with the increasing of drug concentration in NC formulation. Different routes of administration, and dose regimens were used in this work, especially with ABZ. The ability of drug retention in the inner core of nanocapsules was observed *in vivo*, especially by the subcutaneous route, since the nanocapsules were able to prolong the time for parasitaemia reactivation after treatment and increase the number of animals with negative parasitological exams, even after 120 days after treatment, when compared with the free drug. The efficacy data suggests that free albaconazole is promptly released from tissue to

the blood circulation, while nanocapsules probably retain the albaconazole in tissues for a longer time, reducing the available concentration in blood and the absorption rate, being in this case less active in the same doses. On the other hand, at higher doses (120mg/Kg) the free fraction of ABZ rapidly released by NC was enough to decrease parasitemia, while the fraction retained by NC produce the sustained effect of parasitemia reduction at longer times. This hypothesis could explain why lower doses (20mg/Kg) failed to efficiently reduce parasitemia. In this way, a profile of drug distribution in the body seems to be modified by using nanocapsules, at the same time that a significant reduction in general toxicity was observed with albaconazole associated to nanocapsules formulation. A sustained effect and lower incidence of toxic side effects were observed especially when albaconazole was administered at higher doses by subcutaneous route. From our results, the vectorization of imidazole and triazole drugs in NC was considered interesting, because the pharmacokinetics profile was altered producing the parasitemia reduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da doença de Chagas.....	5
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 3: Estrutura química do nifurtimox e do BNZ.....	9
Figura 4: Estrutura química do CTZ, MCZ e ITZ.....	11
Figura 5: Estrutura química dos novos derivados triazólicos, inibidores da enzima C14- α -esterol-demetilase do <i>T. cruzi</i>	13
Figura 6: Representação esquemática de três tipos principais de NC.....	19
Figura 7: Representação esquemática de NC e nanoesferas poliméricas.....	19
Figura 8: Desenho esquemático dos componentes comuns de todos os microscópicos de varredura por sonda mecânica.....	23
Figura 9: Representação das condições em uma superfície negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada de Stern.....	27
Figura 10: Esquemática do método de preparação das NC.....	33
Figura 11: Representação esquemática da metodologia para separação do ABZ encapsulado nas NC do ABZ não encapsulado.....	39
Figura 12: Representação esquemática da determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i> das NC contendo ABZ.....	40
Figura 13: Espectro na região do UV apresentando o pico de absorção máxima do ABZ em acetonitrila (5 μ g/mL) em 238 nm.....	50
Figura 14: Curva de calibração do ABZ em acetonitrila no comprimento de onda de 238nm.....	51
Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura de NC contendo 1 mg ABZ/mL.....	56
Figura 16: Imagem topográfica de NC brancas de PCL. Área 40 μ m x 40 μ m.....	58
Figura 17: Imagem topográfica (A e C) e de fase (B e D) de NC de PCL contendo 0,5 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área 5 μ m x 5 μ m (A e C) e 10 μ m x 10 μ m (B e D).....	59

- Figura 18:** Imagem topográfica (A) e de fase (B) de NC de PCL contendo 0,5 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área 40 μ m x 40 μ m.....59
- Figura 19:** Imagem (A) e perfil (B) topográfico de amostras de NC de ABZ a 0,5mg/mL, apresentando a altura do cristal de ABZ formado. Área: 10 μ m x 10 μ m.....60
- Figura 20:** Representação esquemática da hipótese de cristalização do ABZ nas NC. Em A: NC na ausência de ABZ, em B: NC contendo 0,5 mg ABZ/mL, com o ABZ adsorvido e encapsulado no interior das NC; em C: 1mg/mL; em D: NC de ABZ a 5mg/mL, supersaturação do sistema e em E a mesma formulação após algumas horas, com a presença de cristais macroscópicos do ABZ.....60
- Figura 21:** Imagem topográfica (A) e de fase (B) de NC contendo 5,0 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área 10 μ m x 10 μ m.....61
- Figura 22:** Perfil de liberação *in vitro* a 37°C de NC contendo diferentes concentrações de ABZ em salina tamponada em condições sink.....63
- Figura 23:** Efeitos do ABZ encapsulado na proliferação de formas epimastigotas das cepas Y (A) e Colombiana (B) do *T. cruzi*. A seta indica o dia da adição das formulações.....65
- Figura 24:** Gráfico da dose máxima tolerada pela via intravenosa de albaconazol livre ou encapsulado em camundongos fêmeas.....68
- Figura 25:** Curva de parasitemia (A) e sobrevida (B) de camundongos infectados com 1 x 10⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-62 do *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações de BNZ livre ou encapsulado.....70
- Figura 26:** Curva de parasitemia (A) e sobrevida (B) de camundongos infectados com 1 x 10⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-62 do *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações nanoestruturadas contendo CTZ, MCZ ou ITZ. NC = nanocápsulas; CTZ = cetoconazol; MCZ = miconazol; ITZ = itraconazol; IV = via intravenosa.....73
- Figura 27:** Curva de parasitemia (A) e sobrevida (B) de camundongos infectados com 1 x 10⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com MCZ livre ou encapsulado. NC = nanocápsulas; MCZ = miconazol; SC = via subcutânea.....71
- Figura 28:** Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1 x 10⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com NC branca ou solução de DMA/PEG 300/Glicose 10%. NC = nanocápsulas; SC = via subcutânea; DMA = dimetilacetamida; PEG = polietilenoglicol.....76

Figura 29: Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com diferentes doses de ABZ livre. ABZ = albaconazol; SC = via subcutânea.....77

Figura 30: Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com 20mg/Kg de ABZ encapsulado, pelas vias IM ou SC. NC = nanocápsulas; ABZ = albaconazol; IM = intramuscular; SC = via subcutânea.....78

Figura 31: Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com diferentes doses de ABZ encapsulado. NC = nanocápsulas; ABZ = albaconazol; SC = via subcutânea.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos antiparasitários associados a sistemas vetorizados testados <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	17
Tabela 2: Resultados da curva de calibração feita com ABZ + NC a 10%.....	51
Tabela 3: Valores de absorvância média do ABZ em função de sua concentração.....	52
Tabela 4: Resultados do teste de repetibilidade para validação do doseamento espectrofotométrico do ABZ a 238 nm.....	53
Tabela 5: Resultados do teste de precisão intermediária, em dois dias, para validação do doseamento espectrofotométrico do ABZ a 238 nm.....	53
Tabela 6: Exatidão do método de determinação do ABZ.....	54
Tabela 7: Análise do tamanho e potencial zeta das NC contendo diferentes concentrações de ABZ.....	55
Tabela 8: Medidas de tamanho médio das NC obtidas pelas técnicas de ECF e MFA.....	57
Tabela 9: Eficiência e teor de encapsulação das NC contendo diferentes concentrações de ABZ.....	62
Tabela 10: Efeitos adversos provocados pela administração IV de CTZ e MCZ livres ou associados às NC.....	66
Tabela 11: Efeitos adversos provocados pela administração IV de ABZ livre ou associado às NC.....	67
Tabela 12: Resultados do exame de hemocultura realizada em camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-78 do <i>T. cruzi</i> , tratados com diferentes formulações de BNZ.....	71
Tabela 13: Resultados do exame de hemocultura realizada em camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-78 do <i>T. cruzi</i> , tratados com diferentes formulações de MCZ, pelas vias IM ou SC.....	75
Tabela 14: Sumário dos dados da avaliação dos animais infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com diferentes formulações e doses de ABZ.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ζ = Potencial zeta

ABZ = albaconazol

BNZ = benznidazol

CTZ = cetoconazol

CV = Coeficiente de variação

Da = Dalton

DL₁₀₀ = Dose letal para 100% dos animais

DL₅₀ = Dose letal para 50% dos animais

DMA = N,N-dimetil-acetamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

DMT = Dose máxima tolerada

ECF = Espectroscopia de correlação de fótons

IBE = Inibidores da biosíntese do ergosterol

IC₅₀ = Concentração inibitória 50%

IM = Via intramuscular

ITZ = itraconazol

IV = Via intravenosa

LIT = *Liver infusion tryptose*

log *P* = Coeficiente de partição

MCZ = miconazol

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MFA = Microscopia de força atômica

MIC = Minimal inhibitory concentration (concentração inibitória mínima)

NC = Nanocápsulas

PEG = Polietilenoglicol

PCL = Poli- ϵ -caprolactona

PCR = polimerase chain reaction (reação da polimerase em cadeia)

pH = Potencial hidrogeniônico

PLA = Poli(ácido-lático)

PLG = Poli(ácido-glicólico)

PLGA = Poli(ácido-lático-*co*-glicólico)

SC = Via subcutânea

$t_{1/2}$ = Tempo de meia-vida plasmática

UV = Ultravioleta

VO = Via oral

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.2. Quimioterapia da doença de Chagas.....	8
2.3. Sistemas vetorizados para o tratamento da doença de Chagas.....	15
2.4. Nanocápsulas.....	17
2.4.1. Técnicas de caracterização físico-química das nanocápsulas.....	20
2.4.1.1. Análise de tamanho das nanocápsulas.....	21
2.4.1.2. Análise morfológica por microscopia.....	21
2.4.1.3. Análise do potencial de superfície.....	25
OBJETIVOS.....	29
1. OBJETIVO GERAL.....	30
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1. METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	32
1.1. Preparação das nanocápsulas.....	32
1.2. Preparação das soluções e suspensões.....	33
1.3. Extração e purificação do benznidazol e itraconazol.....	34
1.4. Purificação do miconazol base a partir do nitrato.....	35

2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL	36
2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrometria no ultravioleta para o doseamento do albaconazol.....	36
2.2. Análise de tamanho e do potencial zeta.....	36
2.3. Análise morfológica.....	37
2.4. Avaliação da eficiência e da porcentagem de encapsulação.....	37
2.5. Determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i>	39
3. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VITRO” DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL.....	40
4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN VIVO”.....	40
4.1. Cetoconazol e miconazol.....	41
4.2. Albaconazol.....	41
5. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VIVO”.....	41
5.1. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
5.2. Animais experimentais.....	41
5.3. Modelos de infecção.....	42
5.4. Avaliação dos animais.....	42
5.5. Drogas.....	42
5.6. Tratamento.....	42
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
1. METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	49
1.1. Extração e purificação do benznidazol e itraconazol.....	49
1.2. Purificação do miconazol base a partir do nitrato.....	49
2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL.....	50
2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrometria no ultravioleta para o doseamento do albaconazol.....	50

2.1.1. Espectro do albaconazol.....	50
2.1.2. Especificidade.....	50
2.1.3. Linearidade.....	49
2.1.4. Precisão.....	52
2.1.4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrída).....	52
2.1.4.2. Precisão intermediária.....	53
2.1.5. Exatidão.....	54
2.2. Análise de tamanho e do potencial zeta.....	54
2.3. Análise morfológica.....	56
2.4. Avaliação da eficiência e da porcentagem de encapslação.....	61
2.5. Determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i>	62
3. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VITRO” DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL.....	64
4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN VIVO”.....	65
4.1. Cetoconazol e Miconazol.....	65
4.2. Albaconazol.....	67
5. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VIVO”.....	68
CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta aproximadamente 16-18 milhões de indivíduos na América Latina, onde cerca de 100 milhões de indivíduos encontram-se sob o risco de contrair a doença (WHO, 2005) constituindo um sério problema de saúde pública. O controle do inseto vetor nas áreas endêmicas levou a uma redução marcante da transmissão vetorial na década de 80 (Moncayo, 2003).

Atualmente, o único fármaco disponível comercialmente no Brasil para o tratamento da doença de Chagas é o benznidazol (BNZ) (Rochagan®, Rodanil®, Roche). Várias triagens clínicas, realizadas em diferentes países, têm demonstrado resultados contraditórios em relação à eficácia do tratamento de indivíduos chagásicos com BNZ (Blanco *et al.*, 2000; Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 2004; Cançado, 2002; Viotti *et al.*, 1994; Streiger *et al.*, 2004; Sosa-Estani *et al.*, 1999; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2000). Esta variação pode estar relacionada com a área geográfica, provavelmente devido às diferenças na susceptibilidade a drogas entre as diferentes cepas do *T. cruzi*, que refletem uma grande variabilidade genética (Andrade *et al.*, 1992). Entretanto, a maioria das triagens clínicas demonstra que o BNZ é eficiente no tratamento da transmissão congênita, fase aguda, e no tratamento de crianças e adolescentes (Schijman *et al.*, 2003; Cançado, 2002; Andrade *et al.*, 2004; Streiger *et al.*, 2004).

Por outro lado, a maior limitação do tratamento com o BNZ é a sua baixa atividade durante a fase crônica da infecção, com índices de cura variando entre 0% a 20% (Guedes *et al.* 2006). Além disso, o tratamento com o BNZ se estende por períodos 60 dias ininterruptos, em 3 doses diárias (PAHO/WHO, 1998). Com este regime terapêutico, tenta-se obter concentrações altas e constantes do fármaco na circulação de modo a eliminar as formas tripomastigotas sanguíneas do parasito que chegam ao sangue em ciclos repetidos, evitando assim a invasão de novas células. Porém, a eliminação das formas amastigotas intracelulares é bastante difícil, implicando em toxicidade elevada dos fármacos também em relação às células hospedeiras. Este tratamento prolongado provoca uma série de efeitos

adversos e grande desconforto para o paciente. Esses fatores são grandemente responsáveis pelo abandono da terapia por pacientes no estado crônico assintomático (Croft, 1997; Cançado, 2002).

O crescente conhecimento da bioquímica básica do *T. cruzi*, e a busca racional por novos compostos, que possuam baixa toxicidade e maior eficácia durante o tratamento da fase crônica, com atividade contra esse parasito, levaram à descoberta da atividade tripanocida de novos compostos, como os inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE). Como muitos fungos, o *T. cruzi* requer esteróis específicos para viabilidade de suas membranas celulares em todo seu ciclo de vida, sendo portanto, extremamente susceptíveis a esses IBE. Os IBE mais promissores são os derivados azólicos, como por exemplo o D0870 (Urbina *et al.*, 1996), posaconazol (Urbina *et al.*, 1998), ravuconazol (Urbina *et al.*, 2003), TAK-187 (Urbina *et al.*, 2003) e o albaconazol (ABZ) (Urbina *et al.*, 2000).

A eficácia do ABZ *in vitro* foi avaliada por Urbina *et al.* (2000), entretanto, o curto tempo de meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) dessa droga em camundongos (<1h) (Bártoli *et al.*, 1998) impediu que sua atividade *in vivo* fosse testada nesse modelo. A eficácia *in vivo* do ABZ foi avaliada pela primeira vez em cães infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi* por Guedes *et al.* (2004). Os resultados desse estudo demonstraram que o ABZ foi efetivo na supressão da parasitemia e no aumento da sobrevivência dos animais infectados.

Visando-se melhorar o $t_{1/2}$ do ABZ e reduzir potenciais efeitos adversos frequentemente atribuídos aos derivados azólicos, a vetorização desses compostos em sistemas nanoestruturados do tipo nanocápsulas (NC) foi uma alternativa investigada no presente trabalho em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*. Foi avaliado também o efeito da encapsulação dos derivados azólicos cetoconazol (CTZ) e miconazol (MCZ) e do BNZ na atividade tripanocida destes fármacos. A encapsulação desses derivados no núcleo oleoso das NC poderia reduzir a toxicidade dos mesmos para tecidos vitais do hospedeiro, e por outro lado, aumentar a seletividade do fármaco para células hospedeiras contendo o parasito, melhorando a eficácia no tratamento da doença de Chagas, como já demonstrado em outros sistemas (Lasic, 1998; Barratt, 2000). Diferentes vias de administração foram

testadas, visando a obtenção de liberação lenta das drogas para a circulação sanguínea de forma a reduzir a frequência de administrações e o número de doses.

Neste contexto, o presente trabalho trata do desenvolvimento farmacotécnico e da caracterização físico-química de formulações nanoestruturadas contendo diferentes fármacos com atividade antichagásica como os derivados imidazólicos, benzonidazol (BNZ), miconazol (MCZ) e cetoconazol (CTZ) e os derivados triazólicos itraconazol (ITZ) e albaconazol (ABZ). Além disso foi realizada a avaliação da atividade biológica dessas preparações *in vitro*, em cultura acelular de epimastigotas de *T. cruzi*, e *in vivo* em modelo murino de infecção com diferentes cepas de *T. cruzi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, parasita da ordem Kinetoplastida que pertence à família Trypanosomatidae.

A doença de Chagas afeta aproximadamente 16-18 milhões de pessoas na América Latina (Figura 1), onde cerca de 100 milhões de indivíduos estão sob o risco de contrair a doença, constituindo um sério problema de saúde pública (WHO, 2005).



Figura 1: Distribuição global da doença de Chagas.

Fonte WHO, 2005.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, envolvendo vários estágios distintos de desenvolvimento nos diversos hospedeiros (Figura 2). As formas tripomastigotas que invadem as células diferenciam-se em amastigotas, formas aflageladas, que multiplicam-se por divisão binária, e agrupam-se formando os chamados ninhos de amastigotas (ou

pseudocistos) no interior dos tecidos. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação para a forma tripomastigota sanguínea que é liberada para a circulação pela ruptura da membrana plasmática. As formas tripomastigotas sanguíneas podem então invadir novas células ou atingir órgãos distantes. As formas tripomastigotas são flageladas, não se dividem e podem, neste estágio, serem ingeridas pelo inseto vetor. No lúmen intestinal do inseto, os tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas. Na porção final do intestino do inseto, os epimastigotas diferenciam-se novamente em formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas nas fezes e na urina do inseto. Estas formas infectivas podem alcançar a corrente sanguínea dos vertebrados através de discontinuidades na pele e nas membranas mucosas, penetrando posteriormente nas células para completar seu ciclo biológico (Brenner, 1973).

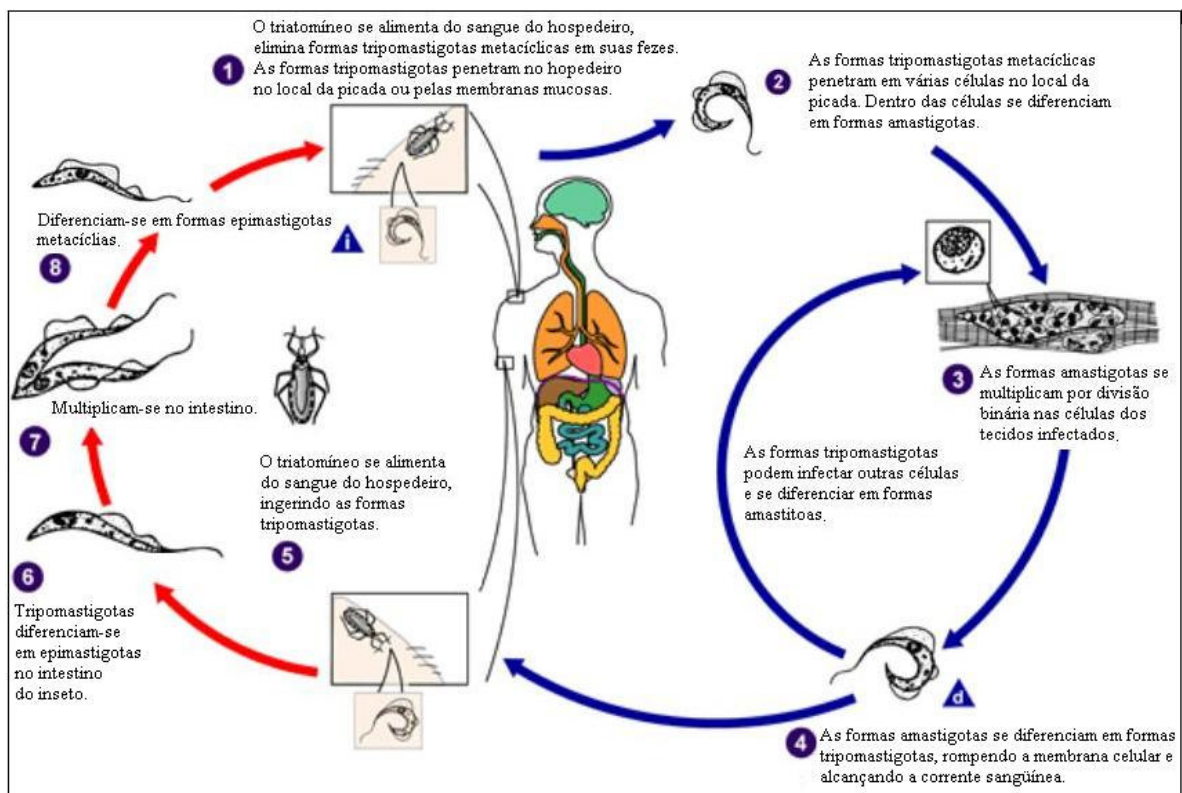


Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2005.

<<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>> Acesso em 12/12/2006.

Os principais meios de transmissão da doença de Chagas são a transmissão vetorial, a congênita e a transfusional. O controle do inseto vetor domiciliado, *Triatoma infestans*, nas áreas endêmicas levou a interrupção da transmissão vetorial em vários países da América do Sul, como o Chile, Uruguai e Brasil (em oito dos 12 estados endêmicos) (Moncayo, 2003). Os insetos triatomíneos hematófagos responsáveis pela transmissão vetorial da doença de Chagas são pertencentes à família Reduviidae, sendo os principais transmissores o *Panstrongylus megistus*, o *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus*.

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por um conjunto de manifestações de intensidade variável. Na maior parte dos indivíduos a fase aguda é assintomática, entretanto, alguns sintomas clássicos como febre, mal-estar, astenia e cefaléia podem ocorrer. A alta parasitemia observada nesta fase tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro, tornando-se baixa na fase crônica da infecção. A taxa de mortalidade pode chegar a 8%, especialmente em crianças (Coura & Castro, 2002).

Já a fase crônica pode ser subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A forma indeterminada é definida como um estado no qual o indivíduo aparenta regressão dos sintomas da fase aguda, podendo permanecer assintomático durante cerca de 10 a 20 anos, ou mesmo pelo resto de sua vida. Cerca 30 a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas sintomáticas da doença de Chagas crônica. A forma cardíaca é caracterizada por sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e por alterações eletrocardiográficas. A forma digestiva é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais do esôfago e do cólon, levando a dificuldade na deglutição e na defecação (Rassi & Luquetti, 1992). A fase crônica da doença é atualmente um dos maiores desafios no controle da doença de Chagas, sendo as possibilidades terapêuticas utilizadas no tratamento desta fase extremamente reduzidas. Por isso, os esforços para a busca de novos fármacos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas são muito urgentes e importantes do ponto de vista epidemiológico (Coura & Castro, 2002). Existem estudos que demonstram a importância do tratamento dos pacientes na fase crônica da doença com vistas à redução da sintomatologia e melhoria das perspectivas de cura dos pacientes (Tarlenton, 2001).

2.2. Quimioterapia da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença pelo médico sanitário Carlos Chagas, em 1909 (Chagas, 1909), até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem obter, entretanto, um medicamento totalmente eficaz tanto na fase aguda como crônica da doença.

Os requisitos mais importantes para as drogas destinadas ao tratamento da doença de Chagas são a capacidade de induzir a cura parasitológica em indivíduos tratados durante as diferentes fases da doença, fase aguda e crônica; baixa toxicidade e efeitos colaterais reduzidos; boa atividade por via oral em poucas doses e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência pelo parasito (Coura & Castro, 2002; Croft, 1999).

A quimioterapia da doença de chagas se mantém insatisfatória e baseia-se no uso de nitrofuranos, nifurtimox (NFX) (Lampit®, Bayer), descontinuado na década de 80 (Coura & Castro, 2002), e de nitroimidazóis, BNZ (Rochagan®, Roche), representados na Figura 3. O mecanismo de ação do NFX envolve a formação de radicais nitroânions pelas nitroredutases que, em presença de oxigênio, levam à formação de intermediários oxigenados reduzidos reativos altamente tóxicos. (Coura & Castro, 2002; Docampo, 1990). Como o *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxificação de radicais livres, é susceptível a tais intermediários oxigenados. Por outro lado, sugere-se que o mecanismo de ação do BNZ envolva ligações covalentes ou outras interações entre intermediários nitroreduzidos com componentes do *T. cruzi* como o DNA, lipídios e proteínas (Diaz de Toranzo *et al.*, 1988; Docampo, 1990).

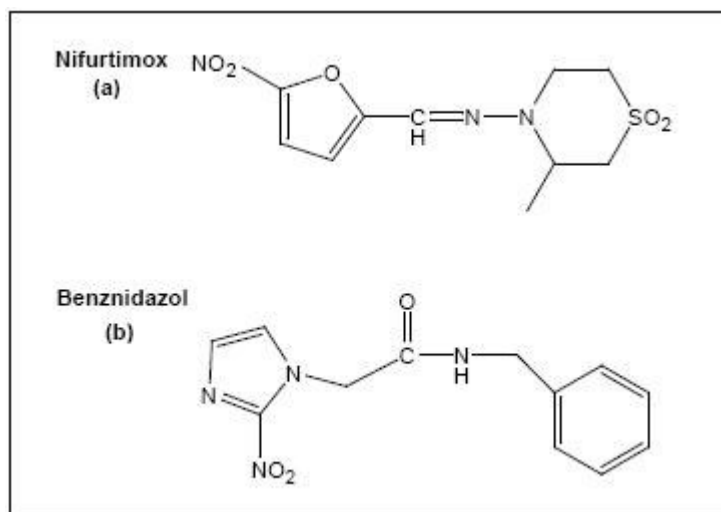


Figura 3: Estrutura química do nifurtimox (a) e do benznidazol (b).

Embora grandes avanços tenham sido realizados no estudo da doença de Chagas no sentido de otimizar uma linha terapêutica definitiva e eficaz para garantir a cura da doença, não existe ainda um tratamento eficaz para as diferentes fases da doença. O uso do BNZ no tratamento da doença se estende por 30 a 60 dias nos casos agudos e 60 dias nos casos crônicos (PAHO/WHO, 1998). Com este regime terapêutico, tenta-se obter concentrações altas e constantes do fármaco na circulação de modo a eliminar as formas sanguíneas (tripomastigotas) do parasito que chegam ao sangue em ciclos repetidos, evitando assim a invasão de novas células. Esta forma de tratamento pode levar, principalmente na fase aguda da doença, à exaustão das formas teciduais. Devido a isso, o BNZ apresenta alta eficácia no tratamento da fase aguda, com índices de cura parasitológica em adultos variando entre 40% a 76% (Guedes *et al.*, 2006).

Porém, a eliminação das formas amastigotas intracelulares nos tecidos e células durante a fase crônica da doença é a etapa mais difícil do tratamento, implicando em toxicidade elevada dos fármacos também em relação às células hospedeiras (Cançado, 2002). O tratamento continuado de indivíduos durante essa fase da doença provoca efeitos colaterais graves, como anorexia, vômitos, dermatites alérgicas e polineuropatias periféricas. Esses fatores são grandemente responsáveis pelo abandono da terapia por indivíduos no estado crônico assintomático (Croft, 1997). Além disso, o esquema

terapêutico com o BNZ apresenta baixos índices de cura, já que somente cerca de 0% a 19% dos pacientes tratados são curados (Guedes *et al.*, 2006), utilizando-se critérios de cura baseados na análise pela técnica de PCR da presença dos parasitos nos tecidos em animais infectados.

As razões para as diferenças na atividade anti-*T. cruzi* do BNZ entre as fases aguda e crônica da doença são desconhecidas (Cançado, 1999), mas podem estar relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do BNZ, que não atingem concentrações altas nos tecidos afetados na fase crônica suficientes para eliminar as formas amastigotas intracelulares (Urbina, 2001; 2002).

Controvérsias permanecem sobre a eficiência da quimioterapia específica da doença de Chagas, especialmente em indivíduos crônicos assintomáticos. De acordo com a hipótese da importância da presença do parasito na persistência das lesões durante a fase crônica da doença de Chagas, a administração terapêutica pode diminuir a carga parasitária em tecidos infectados, e dessa forma reduzir a severidade dos processos inflamatórios associados com as formas crônicas da tripanossomíase americana (Tarleton, 2001).

A resistência ou susceptibilidade natural de determinadas populações do *T. cruzi*, que apresentam diferentes características genéticas, ao BNZ tem sido correntemente sugerida como um importante fator para explicar as baixas taxas de cura detectadas em pacientes chagásicos tratados (Filardi & Brener, 1987; Toledo *et al.*, 1995, 2004). Além disso, a eficácia do BNZ varia de acordo com a área geográfica, também provavelmente devido a diferentes susceptibilidades à droga entre diferentes populações de *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1992; Cançado, 1999). A existência de populações do *T. cruzi* naturalmente resistentes ao BNZ, associada aos baixos índices de cura observados na fase crônica, torna imprescindível a descoberta de novos fármacos, além da viabilização do uso da biologia molecular para caracterizar a susceptibilidade das cepas infectantes às substâncias em questão (Murta *et al.*, 1998).

A busca racional por novos compostos com atividade anti-*T. cruzi*, com baixa toxicidade e maior eficácia durante o tratamento da fase crônica e o crescente

conhecimento da biologia básica do *T. cruzi* levou à descoberta da atividade anti-*T. cruzi* de várias novas classes de compostos, como os inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE).

O *T. cruzi*, assim como os fungos e leveduras, necessita do ergosterol para sua proliferação e viabilidade celular, não sendo capaz de utilizar esteróis do hospedeiro vertebrado, como o colesterol, sendo portanto, extremamente susceptível aos IBEs. O miconazol (MCZ) (Figura 4) foi o primeiro IBE testado contra o *T. cruzi*. Esse composto foi capaz de inibir completamente o crescimento da cepa Tulahuen do *T. cruzi in vitro* (Docampo *et al.*, 1981).

Segundo McCabe *et al.* (1983; 1984) o derivado imidazólico cetoconazol (CTZ) (Figura 4) possui atividade anti-*T. cruzi in vivo e in vitro*, sendo capaz de reduzir a parasitemia e prolongar a sobrevivência de camundongos infectados com diferentes cepas do parasito. Entretanto, o CTZ não levou à cura parasitológica da doença de Chagas humana e experimental (Brenner *et al.*, 1993).

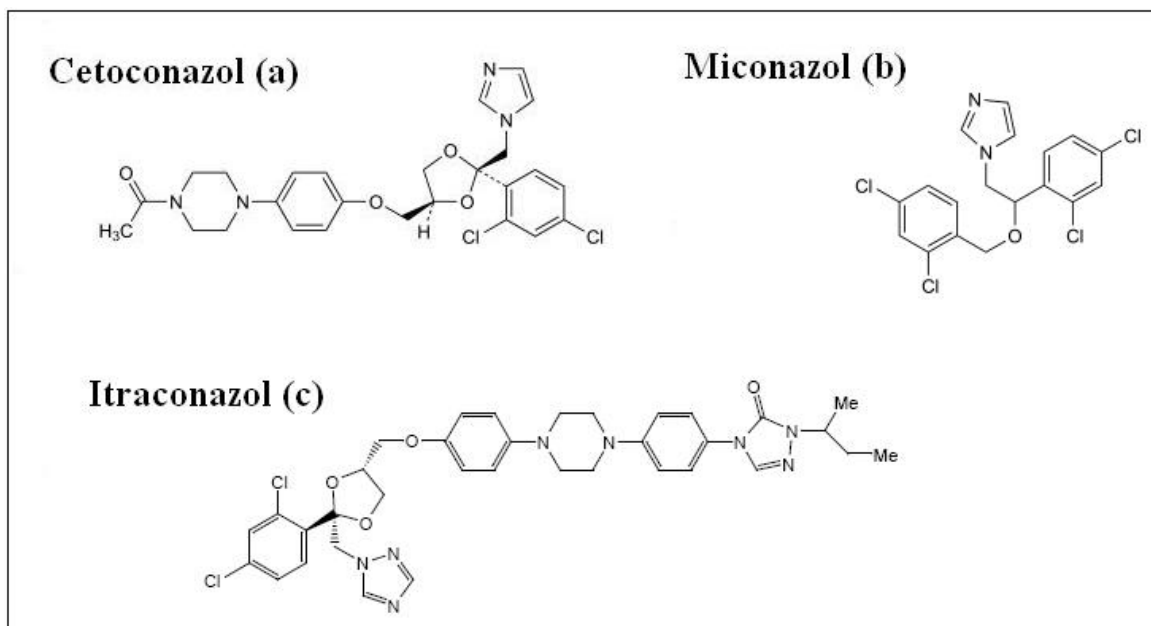


Figura 4: Estrutura química do cetoconazol (a), miconazol (b) e itraconazol (c).

Estudos anteriores demonstraram que IBEs já disponíveis comercialmente, como o ITZ (Figura 4), apesar de muito efetivo no tratamento das infecções fúngicas, não é

suficientemente eficaz na erradicação do *T. cruzi* em modelo murino e humano (McCabe *et al.*, 1986; Moreira *et al.*, 1992). Entretanto, segundo Apt *et al.* (1998, 2003), o itraconazol (ITZ) administrado a 6mg/Kg/dia durante 120 dias a pacientes chagásicos crônicos foi capaz de reduzir significativamente o número de testes xenodiagnósticos positivos, além de regredir em 50% dos casos ou prevenir em 97,8% dos casos anormalidades eletrocardiográficas. Apesar de todos os pacientes tratados apresentarem testes sorológicos positivos, após 9 anos de acompanhamento, os resultados sugerem uma expressiva redução na carga parasitária desses pacientes, o que corrobora a hipótese de necessidade de tratamento de pacientes na fase crônica da doença (Tarleton, 2001).

Durante a década de 90, novos derivados triazólicos se mostraram bastante eficazes na indução da cura parasitológica em modelo murino da doença de chagas aguda e crônica (Urbina & Docampo, 2003). Entre eles estão o D0870 (Zeneca Pharmaceuticals), posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute), ravuconazol (BMS 207 147, Bristol-Myers Squibb), TAK-187 (Takeda Chemical Company) e o ABZ (UR-9825, Grupo Uriach), representados na Figura 5.

A atividade *in vitro* do derivado bis-triazólico D0870 contra formas epimastigotas da cepa EP [Concentração inibitória 50% (IC₅₀) = 0,1µM e Concentração mínima inibitória (MIC) = 1-3µM] foi comparável à eficácia dos derivados azólicos padrões, como o CTZ. Sua potente atividade *in vivo* poderia, portanto estar relacionada às suas propriedades farmacocinéticas (Urbina *et al.*, 1996; Liendo *et al.*, 1998). Sua atividade *in vivo* foi avaliada em modelo murino utilizando-se as cepas CL, J, Buriti, Gilmar (susceptível ao BNZ), Y (parcialmente resistente ao BNZ), SC-28, YuYu, Colombiana e VL-10 (resistentes ao BNZ). Em ambos os modelos agudo e crônico da doença as taxas de sobrevivência foram de 60% a 100% dos animais infectados, para todas as cepas testadas, utilizando-se esquema posológico ≥ 10mg/Kg em dias alternados, totalizando-se 20 doses. No modelo de fase aguda, a taxa de cura parasitológica foi de 70% a 100% em 7 das 9 cepas utilizadas, incluindo a cepa Y, SC-28 e YuYu. Analisando-se o modelo de fase crônica, observou-se que houve cura parasitológica em 30% a 45% dos animais infectados

com as diferentes cepas, incluindo a cepa Colombiana, resistente ao BNZ (Molina *et al.*, 2000).

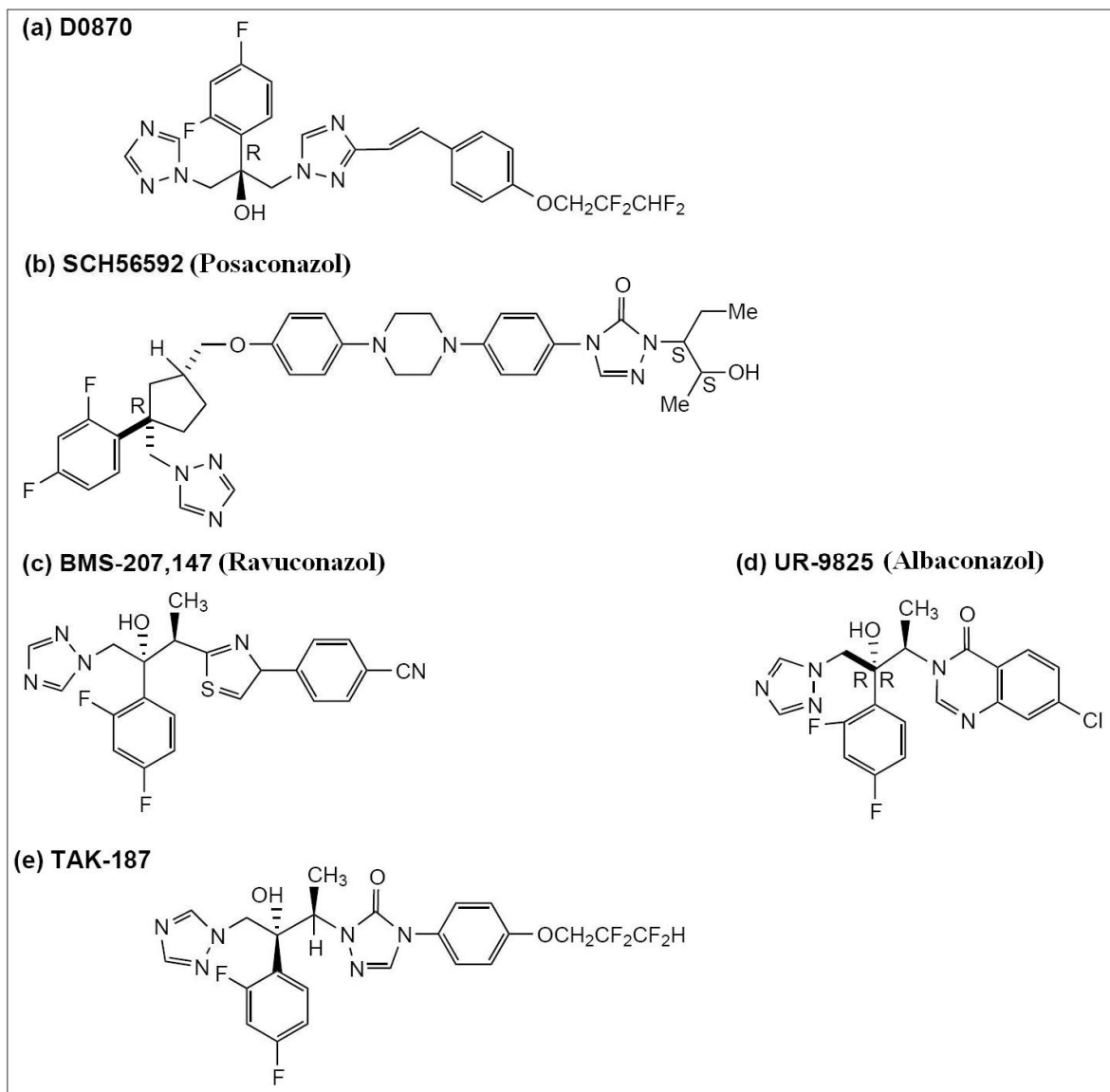


Figura 5: Estruturas químicas dos novos derivados triazólicos, inibidores da enzima C14- α -esterol-demetilase do *T. cruzi*.

A avaliação da atividade *in vitro* do posaconazol sobre as formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foi avaliada por Urbina *et al.* (1998). De acordo com esse estudo, o posaconazol foi capaz de inibir a multiplicação dos parasitos com MIC de 30nM,

concentração de 30 a 100 vezes menor que a dos compostos de referência CTZ e ITZ. Em outro estudo realizado por Molina *et al.* (2000) as cepas CL, Y e Colombiana foram utilizadas para avaliação da atividade do posaconazol *in vivo*, em modelo murino de fase aguda e crônica utilizando-se 20 doses diárias de posaconazol a 20mg/Kg. No modelo de fase aguda, a sobrevida foi de 80% a 90% para todas as cepas testadas e a cura parasitológica foi de 90% a 100% para as cepas Y e CL e de 50% para a cepa Colombiana. No modelo de fase crônica a sobrevida e a cura parasitológica dos animais tratados com posaconazol foi de 50-65% e 50-60%, respectivamente, para todas as cepas analisadas.

O D0870 e o posaconazol foram os primeiros compostos descritos a apresentar atividade curativa em modelo murino de fase aguda e crônica da doença de Chagas. Além disso, esses compostos foram capazes de erradicar cepas do *T. cruzi* resistentes ao BNZ e nifurtimox em camundongos infectados (Urbina, 2001).

O ravuconazol é um novo derivado triazólico atualmente em desenvolvimento como antifúngico sistêmico. Esse composto demonstrou, em testes pré-clínicos, possuir atividade comparável ou superior a outros triazólicos potentes como o posaconazol e está atualmente em testes clínicos de fase II (Urbina, 2001). Sanoja *et al.*, 2000 e Urbina *et al.*, 2003a demonstraram que esse composto possui potente atividade anti-*T. cruzi in vitro*, com MIC de 0,3 μ M contra formas epimastigotas. Embora o $t_{1/2}$ desse composto em camundongos seja curta (4h), quando administrado em camundongos infectados com *T. cruzi* 2 vezes ao dia em doses de 20mg/Kg, altos índices de cura parasitológica foram obtidos. Entretanto, a atividade curativa desse composto foi restrita às cepas susceptíveis (CL) e parcialmente resistentes (Y) ao BNZ, não sendo observada atividade curativa em animais infectados com a cepa Colombiana (resistente ao BNZ). Também não foi observada atividade curativa em modelo de fase crônica da doença.

Urbina *et al.* (2003b) avaliaram a atividade anti-*T. cruzi* do derivado triazólico TAK-187 *in vitro* e *in vivo*. Esse composto apresenta longo $t_{1/2}$ em vários modelos experimentais, inclusive em camundongos. Os estudos *in vitro* demonstraram que a MIC contra as formas epimastigotas do *T. cruzi* é de 0,3-1 μ M, sendo esse valor comparável à MIC do CTZ, do D0870 e do ravuconazol, e maior que o valor da MIC do posaconazol. A atividade *in vivo*

do TAK-187 foi avaliada em modelo murino de fase aguda e crônica da doença de Chagas, utilizando-se as cepas CL, Y, Colombiana e Bertoldo do *T. cruzi*. Os resultados obtidos demonstraram que o TAK-187, quando administrado de 10-20mg/Kg pela via oral (VO) durante 56 dias não consecutivos, totalizando 28 doses, levou a cura parasitológica e sobrevida de 80%-100% dos animais tratados, para ambos os modelos (fase aguda e crônica), não sendo observados efeitos tóxicos no protocolo experimental utilizado.

A eficácia do ABZ *in vitro* foi avaliada por Urbina *et al.*(2000). Os efeitos do ABZ na proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi* foi comparável à eficácia dos IBE mais potentes, sendo a MIC do ABZ 33 vezes menor que a do CTZ, D0870 e do ITZ. Entretanto, a atividade anti-*T.cruzi in vivo* dos IBE requer uma boa atividade tripanocida intrínseca (*in vitro*) e propriedades farmacocinéticas apropriadas, como longo $t_{1/2}$ e grande volume de distribuição. O curto $t_{1/2}$ (< 1 h) do ABZ em camundongos (Bartoli *et al.*, 1998) impediu que esse composto fosse testado nesse modelo. Por outro lado, o longo $t_{1/2}$ do ABZ em cães sugeriu que esse composto poderia apresentar atividade contra o *T. cruzi* nesse modelo experimental (Bartoli *et al.*, 1998). A eficácia anti-*T.cruzi in vivo* deste fármaco foi avaliada pela primeira vez em cães infectados com as cepas Y e Be-78 do *T. cruzi* por Guedes *et al.* (2004). Os resultados demonstraram que o ABZ é muito eficaz na supressão da proliferação da parasitemia e no aumento da sobrevida dos animais infectados. Foram obtidos índices de cura parasitológica de 25% e 100% entre os animais infectados com a cepa Y e tratados com 1,5mg/Kg/dia durante 60 e 90 dias, respectivamente. Por outro lado, embora o ABZ administrado a 1,5mg/Kg/dia seja muito eficaz na supressão da proliferação do parasito nos animais infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi*, não foi observada a cura parasitológica entre esses animais, mesmo quando períodos de tratamentos mais longos (150 dias) foram utilizados, indicando uma possível resistência natural desta população do *T. cruzi* a esse composto.

Visando-se aumentar o $t_{1/2}$ do ABZ e reduzir potenciais efeitos tóxicos em camundongos, freqüentemente atribuídos aos derivados azólicos, a vetorização desses compostos em sistemas nanoestruturados do tipo nanocápsulas (NC) foi uma alternativa

investigada no presente trabalho para melhorar a ação em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*.

2.3. Sistemas vetorizados para o tratamento da doença de Chagas

Uma alternativa potencialmente interessante para o tratamento desta doença é o uso de carreadores coloidais de forma a reduzir os efeitos tóxicos destes fármacos e aumentar a penetração celular nas células hospedeiras do parasito. Estes carreadores podem aumentar a eficácia dos fármacos já utilizados através da elevação da concentração intracelular dos mesmos, garantindo uma ação mais efetiva. Isto ocorre porque estes carreadores coloidais, também chamados de vetores, são sistemas de transporte de fármacos com a capacidade de aumentar a concentração dos fármacos no sítio de ação, reduzindo a atuação destes em tecidos e células sensíveis de maneira a diminuir significativamente os efeitos adversos.

Nos últimos anos tem havido considerável interesse no desenvolvimento de partículas poliméricas em escala nanométrica – as nanopartículas poliméricas, como sistema efetivo de liberação de drogas. Os polímeros utilizados na encapsulação consistem geralmente de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, os quais são degradados *in vivo* em fragmentos menores facilmente excretados, ou mesmo metabólitos naturais do organismo. Vários polímeros têm sido usados nessas pesquisas com aumento do benefício terapêutico e diminuição de efeitos colaterais (Kreuter *et al.*, 1994). Podem ser de origem natural, semi-sintética ou, mais comumente, sintética, destacando-se os poliésteres como poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido glicólico) e seus co-polímeros (Laurencin & Elgendy, 1994). Além das nanopartículas poliméricas, sistemas lipídicos nanoestruturados como os lipossomas também têm sido usados com os mesmos objetivos.

Trabalhos anteriores demonstraram que vetores do tipo NC da ordem de 200nm, obtidas a partir de derivados do ácido poli-lático (PLA), permitiram um aumento da concentração plasmática x tempo, da ordem de 16 vezes, para o halofantrino, um antimalárico, quando comparado a forma farmacêutica solução obtida à partir do fármaco livre (Mosqueira *et al.*, 2004).

Tabela 1: Fármacos antiparasitários associados a sistemas vetorizados testados *in vitro* ou *in vivo*.

Vetor	Droga	Resultados	Referência
Nanopartículas	Alopurinol	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas superior à droga livre	González-Martín <i>et al.</i> , 2000
Nanoesferas	Cetoconazol D0870	Cura de 60%-90% dos animais infectados com as cepas CL e Y com o D0870, utilizando dose de 3mg/Kg durante 30 dias consecutivos.	Molina <i>et al.</i> , 2001
Nanopartículas	Nifurtimox	Atividade anti- <i>T. cruzi in vitro</i> superior ao fármaco livre (IC ₅₀ contra formas tripomastigotas e amastigotas 20 e 13 vezes menor que a do fármaco livre, respectivamente)	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
Nanocápsulas	Atovaquona	Eficácia anti- <i>Leishmania infantum</i> foi significativamente maior que a do fármaco livre na redução da infecção no fígado.	Cauchetier <i>et al.</i> , 2003
Lipossomas	Benznidazol	Aumento da captação dos lipossomas pelo fígado. Eficácia anti- <i>T. cruzi in vivo</i> inferior ao fármaco livre.	Morilla <i>et al.</i> , 2004
Nanocápsulas	Halofantrine	Eficácia antimalárica semelhante ou superior ao fármaco livre. Redução de toxicidade. Estudo realizado após a administração de dose única em animais severamente infectados pelo <i>P. berghei</i> .	Mosqueira <i>et al.</i> , 2004

2.4. Nanocápsulas

As NC são carreadores nanoparticulados submicrônicos compostos de um núcleo oleoso e uma camada externa polimérica, com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos em sua interface. Vários tipos de óleos podem ser utilizados na preparação das NC, como óleos

vegetais e minerais. O principal fator para a escolha do óleo é a solubilidade do fármaco a ser encapsulado no núcleo oleoso. Os derivados azólicos respondem a esse pré-requisito, pois são moléculas insolúveis em água, muitas são solúveis em óleo e podem ser dissolvidas no núcleo das NC. Em geral fármacos que possuem um valor de coeficiente de partição ($\log P_{oc/a}$) elevado podem ser associados às NC e serem administrados por diferentes vias com obtenção de liberação controlada (Takino *et al.*, 1994). Os valores de \log de P do MCZ ($P_{(oc/a)}=5,96$), CTZ ($P_{(oc/a)}=4,74$), ITZ ($P_{(oc/a)}=4,35$) e ABZ ($P_{(oc/a)}=2,99$) são relativamente elevados, sendo candidatos adequados a encapsulação no núcleo das NC. Diferentes drogas lipofílicas, tais como o halofantrino ($P_{(oc/a)}=8,5$), a indometacina, a clofibrida e o diclofenaco foram eficientemente encapsuladas em NC. (Mosqueira *et al.*, 2006, Barratt, 2000, Legrand *et al.*, 1999, Ammoury *et al.*, 1989, Guterres *et al.*, 1995).

As NC são carreadores de escolha para a administração intravenosa (IV) de fármacos altamente lipofílicos, pois são constituídas por polímeros estáveis, com baixa toxicidade e capacidade de degradação no organismo, como representado na Figura 6 (Mosqueira *et al.*, 2001). Consideradas vetores de segunda geração, as NCs possibilitam a aplicação sistêmica de injeções IV *in bolus*, sem diluição prévia, direcionando o fármaco de forma passiva para células definidas do organismo. Os polímeros mais utilizados para a preparação de NC por esse método são os poliésteres biodegradáveis, Poli(ácido-lático) (PLA), Poli(ácido-glicólico) (PLG) e Poli- ϵ -caprolactona (PCL). As NC convencionais concentram os fármacos encapsulados em células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), enquanto as NC furtivas representam um tipo especial de nanopartículas com cadeias de PEG ligadas covalentemente à superfície. Essa modificação permite que as NC quando injetadas por via IV tenham uma captura retardada pelas células do SFM, prolongando assim o tempo de circulação sanguínea da droga encapsulada no interior dessas NC furtivas. (Mosqueira *et al.*, 2001, Owens & Peppas, 2006)

Para a preparação das NC são utilizados polímeros biodegradáveis geralmente na faixa de 0,2 a 2% (p/p) (Fessi *et al.*, 1989). Surfactantes hidrofílicos e lipofílicos também são utilizados, usualmente de 0,2 a 2% (p/p). Os óleos utilizados podem ser vegetais ou minerais, devendo apresentar ausência de toxicidade, alta capacidade de dissolver a droga

em questão e não serem capazes de degradar ou solubilizar o polímero (Legrand *et al.*,1999).

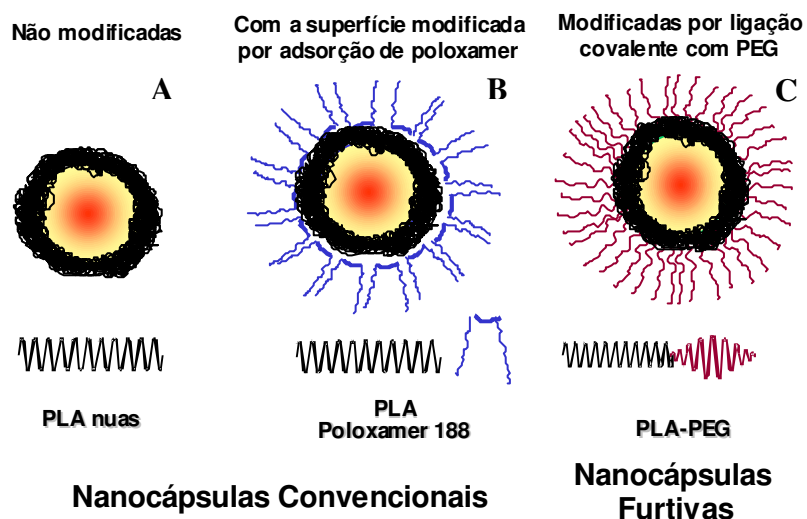


Figura 6: Representação esquemática dos três tipos principais de NC utilizados segundo Mosqueira et al., 2006. A: NC de PLA sem tensioativo; B: NC de PLA com poloxamer 188 adsorvido à superfície (NC PLA-POLOX); C: NC de copolímero PLA-PEG.

As drogas podem ser dissolvidas, encapsuladas ou ligadas à matriz da nanopartícula e, dependendo do método de preparação das nanopartículas poliméricas, nanoesferas ou NC podem ser obtidas (Figura 7).

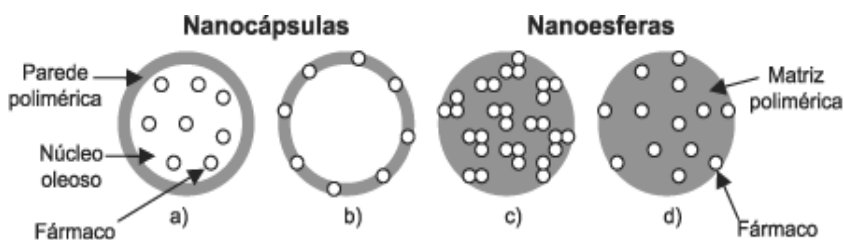


Figura 7: Representação esquemática de NC e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das NC; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das NC; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (Schaffazick *et al.*, 2003).

Existem vários métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas, que podem ser divididos em duas classes principais (Schaffazick *et al.*, 2003); os que são baseados em reações de polimerização e aqueles que se baseiam na difusão de dois solventes com polaridades diferentes, imiscíveis ou miscíveis, sendo que o último é correntemente denominado nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989). Esse método baseia-se na precipitação e formação cineticamente controlada de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. Após a mistura das duas fases miscíveis, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. Nota-se, então o surgimento imediato de uma suspensão leitosa, devido à formação das NC. Os solventes são em geral totalmente removidos sob pressão reduzida ou por filtração tangencial e a suspensão é concentrada também pela evaporação de parte da água (Fessi *et al.*, 1989). Este método é vantajoso visto que é uma técnica de simples execução e facilmente transponível para a escala industrial.

2.4.1. Técnicas de caracterização físico-química das nanocápsulas

A caracterização físico-química das NC é complexa de ser realizada em função de sua natureza coloidal e da complexidade de constituintes que compõem as formulações. No entanto, a determinação destes parâmetros é de extrema importância, pois avalia a estabilidade das preparações a curto, médio e longo prazo, além de permitir a previsão do perfil de distribuição das nanoestruturas *in vivo* após administração parenteral (Barratt, 2000; Legrand *et al.*, 1999). A análise morfológica, a distribuição do tamanho das partículas, a determinação do potencial elétrico superficial (potencial zeta), o teor de encapsulação e a cinética de liberação do fármaco a partir das nanopartículas são os parâmetros geralmente usados nessa avaliação físico-química do sistema (Legrand *et al.*, 1999).

2.4.1.1. Análise de tamanho das nanocápsulas

O diâmetro médio das NC é uma importante determinação, uma vez que o tamanho das partículas representa um aspecto essencial na sua biodistribuição e clearance sanguíneo (Owens & Peppas, 2006). Partículas maiores (acima de 300 nm) são mais rapidamente reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear e facilmente retiradas da circulação. O tamanho das NC varia geralmente entre 100 e 500 nm e depende de vários fatores, tais como: o método de preparação, a concentração do polímero e da droga encapsulada, a proporção entre solvente orgânico e água e da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (Legrand *et al.*, 1999). Além disso, a medida do diâmetro médio das partículas em função do tempo permite avaliar a tendência à agregação e sedimentação indicativas de instabilidade na suspensão (Schaffazick *et al.*, 2003). A espectroscopia por correlação de fótons (ECF) é a técnica mais amplamente utilizada para determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão. Essa técnica baseia-se na análise do movimento browniano das partículas, ou seja, na capacidade de deslocamento constante das partículas presentes num determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. Através da dispersão da luz torna-se possível determinar o diâmetro médio das partículas. Recentemente, a microscopia de força atômica (MFA) também vem sendo utilizada para determinação de tamanho e estudo da morfologia das nanopartículas.

No presente trabalho, as técnicas utilizadas para avaliação da distribuição de tamanho foram a ECF e a MFA.

2.4.1.2. Análise morfológica por microscopia

A MFA é uma das modalidades de microscopia de varredura por sonda mecânica, que tem sido cada vez mais utilizada para a caracterização de nanossistemas, principalmente lipossomas (Ruozi *et al.*, 2005, Li & Palmer, 2004), nanoesferas (Gref *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2005), e, mais recentemente, NC (Montasser *et al.*, 2002, Leite *et al.*, 2005; Mosqueira *et al.*, 2005). A MFA fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície ao

nível atômico (Neves *et al.*, 1998). A microscopia eletrônica de transmissão é a técnica mais utilizada para avaliação morfológica e estrutural das NC (Schaffazick *et al.*, 2003). A associação dessa técnica à criofratura tem fornecido informações úteis sobre a estrutura das NCs (Mosqueira *et al.*, 2001 b; Rube *et al.*, 2005). Estudo recente realizado por Rube *et al.* (2005) demonstrou que a técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo fornece informações importantes sobre a espessura da parede polimérica, cujo valor estimado foi de 17 nm, permitindo elucidar e comprovar o modelo reservatório proposto para as NC.

A MFA promove forças de interação sonda-amostra, atrativas ou repulsivas, tão pequenas como nano-Newtons ($nN = 10^{-9}N$) que podem ser medidas (Birdi *et al.*, 1997). Essa técnica permite a determinação do tamanho das NC, além de suas propriedades estruturais e de deformação, bem como dos seus diferentes constituintes. Na MFA, uma sonda extremamente fina ($\sim 100 \text{ \AA}$ de diâmetro na extremidade da sonda) varre a superfície da amostra em inspeção. Todas as técnicas de varredura por sonda mecânica baseiam-se em um mesmo princípio de operação, que está esquematizado na Figura 8. Todo microscópio que opera técnicas de varredura por sonda mecânica possui:

- A – sonda mecânica;
- B – posicionador piezoelétrico – “scanner” – constituído de material cerâmico;
- C – mecanismo de monitoração sonda-amostra;
- D – sistema de posicionamento preliminar da sonda sobre a amostra;
- E – computador que controla todo o sistema.

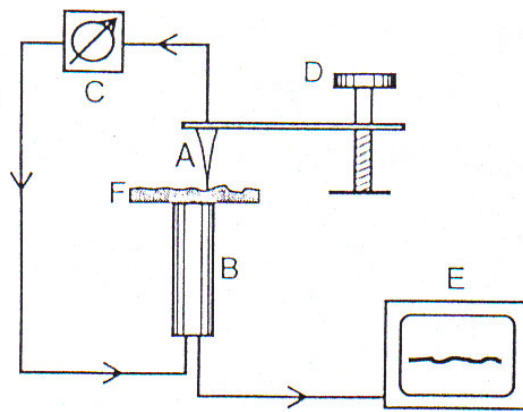


Figura 8: Desenho esquemático dos componentes comuns de todos os microscópicos de varredura por sonda mecânica (Neves *et al.*, 1998).

A sonda mecânica (A) é montada sobre a extremidade livre de uma alavanca. Quando a sonda se aproxima da superfície da amostra (F), forças de interação sonda-amostra surgem e fazem a alavanca defletir. Esta deflexão é monitorada por um detetor (C) à medida que a sonda varre a superfície. Todo este processo é controlado por um computador (E), que movimenta o “scanner” (B), recebe os dados e os converte, formando a imagem da amostra (Neves *et al.*, 1998). As forças de interação sonda-amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância sonda-amostra. A longas distâncias ($d > 1\mu\text{m}$), praticamente não existe qualquer interação. À medida que a sonda se aproxima da amostra ($d \leq 50\text{ nm}$), forças atrativas (tipicamente forças de Van der Waals) passam a atuar entre a sonda e amostra, aumentando com a proximidade da sonda até que a separação seja da ordem inter-atômica ($d \sim 0,5\text{ nm}$). A partir deste ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas, e diz-se que a sonda está em contato físico com a amostra (Neves *et al.*, 1998). Os modos de operação na técnica da MFA são definidos conforme o caráter de interação:

- Não contato: onde a interação sonda-amostra é atrativa. Apesar de ser vantajoso por não danificar a amostra, a resolução normalmente fica limitada, pois a princípio, não há contato físico com a amostra.

- Contato: interação sonda-amostra repulsiva. Permite observar imagens à nível atômico, mas o atrito sonda amostra pode produzir uma imagem distorcida.
- Contato Intermitente: interação sonda-amostra ora atrativo, ora repulsivo. A sonda oscila sobre a superfície da amostra com contato físico, porém a movimentação é feita no ar. Assim, são obtidas altas resoluções, eliminando problemas de deformação.

As imagens obtidas por MFA são tridimensionais, possibilitando a reconstrução exata dos aspectos morfológicos da superfície da amostra. O preparo da amostra é simples, já que não é necessário vácuo durante a operação e a amostra não necessita ser condutiva (Neves *et al.*, 1998). Assim, amostras biológicas podem ser preparadas pela deposição de uma gota em um substrato, como por exemplo, a mica, que possui superfície atômica plana.

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 x) e resolução. No MEV um feixe de elétrons extremamente fino é usado para varrer a amostra. O feixe tem vários efeitos sobre a amostra, dos quais o principal é que ele faz com que a própria amostra emita elétrons. É preciso, portanto, que a amostra se torne condutora de elétrons e para isso ela deve ser recoberta com uma fina camada de ouro ou outro material condutor. A imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que o espécimen é varrido. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados.

O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os

feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada.

2.4.1.3. Análise do potencial de superfície

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e utilizadas para estudar a modificação de superfície de nanopartículas poliméricas. Este estudo é particularmente interessante para se verificar a influência do fármaco associado na superfície das nanopartículas. Um método eficiente para avaliar este parâmetro é a determinação do potencial zeta (ζ) de suspensões aquosas contendo nanopartículas (Legrand *et al.*, 1999). O potencial elétrico tem um valor máximo na superfície e diminui gradualmente com a distância, aproximando-se de zero fora da camada difusa. A intensidade da carga pode ser determinada pela medida da mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico aplicado (Florence & Attwood, 2003). O potencial zeta reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, que é influenciado por mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão (Florence & Attwood, 2003). A determinação do potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, já que indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas. A forma como o fármaco está associado às nanopartículas pode ser também determinada por medidas de potencial zeta comparando-se várias formulações, além de avaliar a estabilidade das dispersões coloidais. Elevados valores de potencial zeta, acima de 30mV, em módulo, sugerem suspensões de NC mais estáveis, devido a repulsão entre as partículas que previne sua agregação (Legrand *et al.*, 1999; Soppimath *et al.*, 2001). O potencial de superfície também pode influenciar a resposta biológica do nanovetor, portanto, após administração IV, carreadores coloidais convencionais que apresentam superfície hidrofóbica são rapidamente captados por células do SFM (Barratt, 2000).

A técnica de determinação do potencial zeta se baseia na medida da velocidade de partículas coloidais movendo-se através de um fluido em um experimento de eletroforese, que passam por um determinado ponto de uma célula eletroforética no qual incide um raio

laser. A luz nesse ponto é então difratada com uma frequência relativa a sua velocidade. É, portanto, obtido um espectro de frequência que é então convertido em mobilidade eletroforética (U_E) pela Equação de Henry (1) e posteriormente em potencial zeta pelas aproximações de Smoluchowski (2) e Hückel (3), respectivamente.

$$(1) \quad U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \cdot f(Ka)$$

$$(2) \quad U_E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \cdot f(Ka)$$

$$(3) \quad U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta}$$

onde: $f(Ka)$ é a concentração de eletrólitos, ε é o campo elétrico, ζ é o potencial zeta e η é a viscosidade do meio.

A Equação de Smoluchowski (2) é utilizada para partículas maiores que $0,2 \mu\text{m}$ e dispersas em meio de concentração molar maior que 10^{-3} (constante dielétrica alta) e a equação de Hückel (3) é utilizada quando as partículas são menores em fluidos com baixa constante dielétrica.

O potencial zeta, que mede a carga superficial das NC foi determinado pela técnica de Laser Doppler Velocimetria associada à Microeletroforese no mesmo aparelho Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, UK).

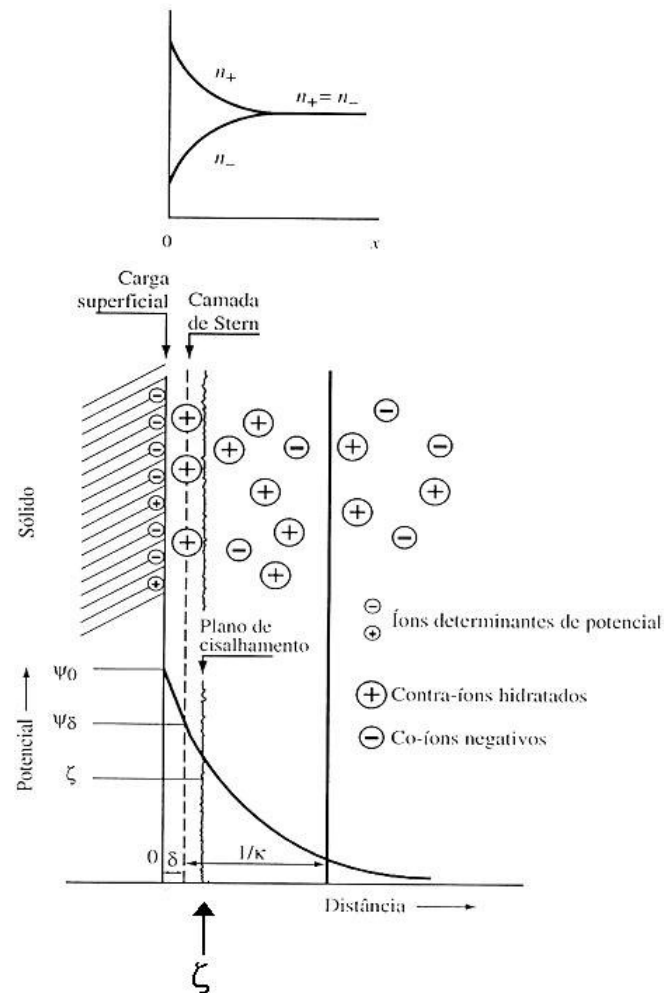


Figura 9: Representação das condições em uma superfície negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada de Stern. São apresentados o potencial de superfície ψ_0 e o potencial na camada de Stern ψ_δ . No plano de cisalhamento é localizado o potencial zeta.

Fonte: Florence & Attwood, 2003, p.352.

Os valores de potencial zeta das NC podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero e do material usado para modificação de sua superfície. Os fosfolípides (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e propileno) e os polímeros constituintes das NC são os principais componentes que podem afetar o potencial zeta, por estarem envolvidos na formação do envoltório e adsorvidos a ele. Enquanto polímeros e lecitinas favorecem uma carga negativa na interface, o poloxamer,

um surfactante não-iônico tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial ζ (Legrand *et al.*, 1999 e Mosqueira *et al.*, 2000).

Além disso, alterações do potencial zeta permitem elucidar mecanismos de associação fármaco-vetor e avaliar a influência da composição nas características físico-químicas da nanoestrutura. Calvo *et al.* (1996) observaram os efeitos da composição de diferentes carreadores nanoestruturados sobre os valores do potencial zeta e verificaram que a fase oleosa das NC e nanoemulsões conferiu um potencial mais negativo (aproximadamente $\zeta = -42$ mV) quando comparado às nanoesferas (aproximadamente $\zeta = -16$ mV). Em função da semelhança do potencial de NC e nanoemulsões, os autores sugeriram que a camada polimérica ao redor da gotícula de óleo seria um filme delgado. Por outro lado, Mosqueira *et al.* (2000) sugeriram que o óleo constituinte das NC está completamente encapsulado pelo polímero, pois nenhuma alteração significativa no potencial ζ de NC foi observada em formulações preparadas com óleos de diferente natureza.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento tecnológico de novas formulações farmacêuticas de nanocápsulas contendo os fármacos; benznidazol, miconazol, cetoconazol, miconazol, itraconazol e albaconazol para o tratamento da doença de Chagas experimental, tanto em modelos de fase aguda como crônica. Objetivou-se avaliar *in vitro* a atividade e *in vivo* a eficácia de diferentes formulações contendo derivados imidazólicos e azólicos, por diferentes vias e em diferentes regimes posológicos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar do ponto de vista físico-químico (análise de distribuição de tamanho, potencial zeta, microscopias de alta resolução) as formulações de nanocápsulas contendo derivados imidazólicos e triazólicos: benznidazol, cetoconazol, miconazol, itraconazol e albaconazol.
- Analisar do ponto de vista físico-químico e estrutural a associação dos fármacos às nanocápsulas e desenvolver metodologia de doseamento do albaconazol para estudo do seu teor de encapsulação nas nanocápsulas.
- Avaliar *in vitro* a atividade de nanocápsulas contendo albaconazol sob formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao benznidazol.
- Avaliar *in vivo* a toxicidade geral dos fármacos na forma livre e encapsulada para adequação de doses durante os estudos de eficácia *in vivo*.
- Avaliar *in vivo* a eficácia das formulações de nanocápsulas com os diferentes fármacos associados em modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi* em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Para preparação das NC, suspensões e soluções utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram utilizadas as seguintes substâncias: Epikuron 170®, [fosfatidilcolina de soja [~70% fosfatidilcolina], Lucas Meyer (França)]; Synperonic PE/F68 [PM 8400, poloxamer 188, ICI Surfactants (Cleveland, UK)]; Poli-ε-caprolactona [PCL 42.500 PM Sigma-Aldrich, (Brasil)]; triglicerídeos de cadeia média, [Miglyol 810N (Hulls, Alemanha)]. As drogas utilizadas foram ABZ (UR-9825) ((1R,2R)-7-cloro-3[2,4-difluoropeni]2-hidroxil-1-metil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-il)propil]quinazolin-4(3H)-ona), gentilmente cedido por Xavier Bartrolí (Ulriach & Cia, Espanha); BNZ, (2-nitroimidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), extraído e purificado a partir de comprimidos de Rochagan®, (Roche, Brasil); CTZ, [1-acetil-4-[4-[(2R,4S)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmethyl)-1,3-dioxolan-4-il]methoxi]phenil]-piperazina (Galena, Brasil)]; ITZ, [(±)-2-sec-butil-4-[4-(4-{4-[(2R*,4S*)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il-metil)-1,3-dioxolan-4-ilmetoxi]fenil}-piperazin-1-il)fenil-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-ona] que foi extraído e purificado a partir de pellets adquiridos comercialmente da Galena, (Brasil) e MCZ 1-[2,4-Dicloro-β-(2,4-diclorobenziloxi)fenil]imidazol (Sigma Aldrich, EUA).

Todas as outras substâncias utilizadas (acetona, N,N-dimetil-acetamida, dimetil-sulfóxido, glicose, metanol, polietilenoglicol 300) foram de grau analítico e foram utilizadas sem posterior purificação. A água foi purificada por osmose reversa no aparelho Symplicity® System 185 (Millipore, EUA).

1.1. Preparação das nanocápsulas

As NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido da remoção do solvente como descrito por Fessi (1989), técnica também denominada nanoprecipitação. A fase orgânica foi constituída de 0,6% (p/v) de PCL; 0,75% (p/v) de Epikuron 170®; 2,5 % (v/v) de Mygliol 810N e diferentes concentrações das drogas utilizadas. As concentrações dos componentes da fase orgânica foram descritas em relação à fase final da formulação. Os componentes da fase orgânica foram dissolvidos em 10mL de acetona em um agitador magnético (modelo PC-200, Corning, EUA) a 30°C a

250 rpm. A solução orgânica foi transferida para o interior da fase aquosa, contendo 0,75% p/v de Pluronic F68 com auxílio de uma seringa. A mistura foi então mantida 10 minutos sob agitação magnética (500 rpm). Finalmente a suspensão coloidal obtida foi concentrada em um rotavapor (Laborota 4000/4001 Heidolph Instruments, Alemanha) sendo seu volume final reduzido para 10 mL.

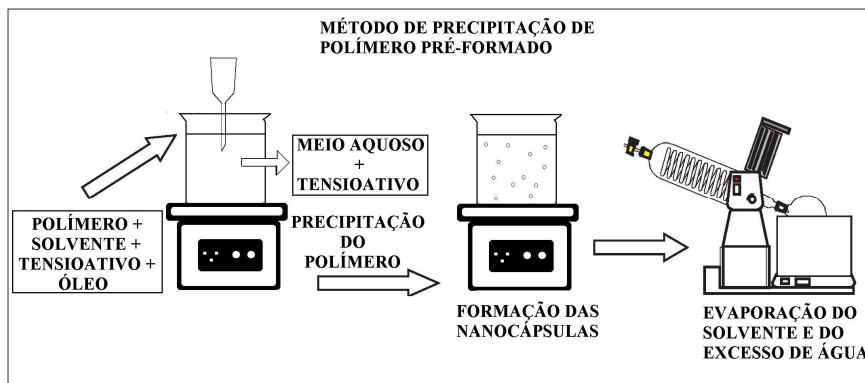


Figura 10: Esquemática do método de preparação das NC. Adaptado de Schaffazick *et. al.* (2003).

Para a realização deste trabalho foram preparadas NC convencionais de ABZ (0,5; 1,0 e 5,0mg/mL), BNZ (1,0mg/mL), CTZ (1,0; 4,0 e 5,0mg/mL), ITZ (2,0mg/mL) e MCZ (5,0 e 8,0mg/mL).

1.2. Preparação das soluções e suspensões

Foram preparadas soluções de BNZ, ABZ e MCZ nas concentrações de 1,0, 2,5 e 3,0mg/mL, respectivamente, compostas de N,N-dimetil-acetamida (DMA), PEG 300 e glicose 10% (p/v), em diferentes proporções:

Solução de BNZ

- BNZ _____ 10 mg
- DMA _____ 1,0 mL
- PEG 300 _____ 2,0 mL
- Glicose 10% (p/v) _____ 7,0 mL

Solução de ABZ

- ABZ _____ 25 mg
- DMA _____ 1,2 mL
- PEG 300 _____ 0,8 mL
- Glicose 10% (p/v) _____ 8,0 mL

Solução de MCZ

- MCZ _____ 30 mg
- DMA _____ 1,2 mL
- PEG 300 _____ 0,8 mL
- Glicose 10% (p/v) _____ 8,0 mL

Durante o preparo das soluções as drogas foram primeiramente solubilizadas em DMA e o PEG 300 foi adicionado à solução resultante. A solução de glicose 10% (p/v) foi incorporada lentamente à solução de DMA/PEG 300 sob leve agitação (aparelho vórtex MS1, IKA Works, EUA).

Para a determinação da atividade *in vitro* do ABZ encapsulado, foi necessária a preparação de uma solução estoque de ABZ em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mg/mL. Essa solução estoque foi diluída cem vezes em NaCl 0,9% (p/v) antes de ser adicionada ao meio *Liver infusion tryptose* (LIT) contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

1.3. Extração e purificação do benznidazol e itraconazol

Não foi possível adquirir o BNZ na sua forma pura, somente na forma de comprimidos de ROCHAGAN[®] comercializados pela Indústria Farmacêutica ROCHE. Portanto, foi realizada a purificação dos comprimidos de BNZ, através de adaptação do método descrito na Farmacopéia Brasileira 4^a edição. O produto obtido e purificado foi caracterizado quanto a sua pureza pelos métodos descritos na mesma monografia, tais como ponto de fusão (188.5-190°C) e absorção por espectrometria no ultravioleta (UV) a 316±2nm. Para extração do BNZ, 5 comprimidos foram pulverizados e solubilizados em

metanol, sob agitação e ao abrigo da luz, durante 20 minutos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo e concentrada em rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha). O material foi recristalizado a partir da mistura metanol/água. Os cristais foram filtrados sob vácuo e secos em dessecador contendo sílica desidratante até peso constante. O BNZ puro foi armazenado ao abrigo da luz. O rendimento da extração foi calculado pela divisão do valor da massa de BNZ obtido pelo peso total teórico de BNZ contido na quantidade de comprimidos utilizados X 100.

O ITZ foi obtido a partir de cápsulas comercializadas no mercado (SPORANOX[®], Jansen-Cilag) ou a partir de pellets, contendo 22% de ITZ adquiridos da Galena (Brasil). O produto obtido foi caracterizado quanto a sua pureza pelo ponto de fusão (166.2°C). A extração e purificação a partir dessa forma farmacêutica foi realizada triturando-se o conteúdo de 10 cápsulas em gral de porcelana, com adição posterior de 50 mL de diclorometano. A mistura foi então agitada, filtrada em papel de filtro quantitativo e o filtrado evaporado a pressão reduzida ao abrigo da luz. O material restante foi recristalizado a partir da mistura de diclorometano/etanol. O precipitado foi filtrado e seco a vácuo em dessecador até peso constante. Durante todo o procedimento o material foi protegido da luz.

1.4. Purificação do miconazol base a partir do nitrato de miconazol

O MCZ base foi obtido a partir da dissolução de 2,0 g de nitrato de MCZ em 50 mL de uma mistura de solventes metanol/água (1:3), seguida pela alcalinização do meio com hidróxido de sódio até ocorrer turvação (pH = 10). A base livre foi extraída em um funil de separação com 20 mL de diclorometano. Posteriormente a solução orgânica foi lavada duas vezes com 20 mL de água destilada para eliminar o excesso de hidróxido de água e em seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida (rotavapor Heidolph Instruments) até secura. O produto foi seco em dessecador sob vácuo ao abrigo da luz até peso constante e posteriormente utilizado na preparação de NC. A pureza foi verificada através do ponto de fusão (83-87 °C).

2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL

2.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrometria no ultravioleta para o doseamento do albaconazol

Não foi encontrado descrito na literatura um método baseado em espectrometria no UV para determinação do teor de ABZ em uma amostra de concentração de ABZ desconhecida. Portanto, dentro do presente trabalho foi desenvolvido e padronizado em nosso laboratório, um método de doseamento baseado na espectroscopia no UV a 238nm (Helios α , ThermoSpectronic, EUA). Foi inicialmente realizado o espectro de absorção do ABZ nas regiões do visível e do UV. A curva de calibração do ABZ (curva padrão) foi realizada contendo oito pontos de concentrações conhecidas da droga: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 25 μ g/mL. A partir da curva de calibração foi possível determinar a concentração de ABZ em uma amostra com concentração desconhecida.

Para a validação do método foram determinadas a especificidade, na presença das NC (1 e 10%) com seus constituintes, a linearidade, a repetibilidade, a precisão e a exatidão, segundo os critérios de aceitação estabelecidos no Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (ANVISA/MS, BRASIL, 2003).

2.2. Análise de tamanho e do potencial zeta

A distribuição de tamanho da população de NC, tamanho médio e índice de polidispersão, foram medidas através da técnica de ECF, na temperatura de 25°C, com ângulo de 90°, em um aparelho Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, UK) pertencente a Rede de Nanobiotecnologia da FAPEMIG e localizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Antes de iniciado os procedimentos, as amostras tiveram que ser diluídas em 10mL de uma solução 1mM de NaCl ($f(Ka)=1,5$), previamente filtrada em um filtro de acetato de celulose Millipore[®] 0,45 μ m para eliminação de partículas. Foram diluídos 10 μ L e 40 μ L de

cada amostra de NC para a análise do potencial zeta e distribuição de tamanho, respectivamente.

As análises foram realizadas a 25°C, em triplicata, sendo feitas 10 leituras por amostra. Os valores apresentados nas tabelas e gráficos correspondem à média das três amostras.

2.3. Análise morfológica

O exame morfológico das formulações de nanopartículas foi realizado por duas técnicas diferentes: MEV e MFA. As imagens da MEV foram obtidas em um aparelho JEOL – JSM 5510 a 20kv, após o recobrimento das amostras com carbono ou ouro. As imagens da MFA foram coletadas em um aparelho Dimension 3000, monitorado pelo controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EUA), utilizando-se sondas de silício de comprimento 228 μ m, com uma frequência de ressonância de 75-98 KHz, força constante de 29-61N/m e raio de curvatura de 5nm a 10nm. Para captura de imagens na MFA, 5 μ L de cada amostra foram depositados sobre a superfície atômica plana da mica recém-clivada e o excesso de umidade foi retirado com um fluxo de argônio. As imagens foram obtidas em modo contato intermitente (tapping mode). A varredura foi efetuada com velocidade de 1Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis). Um mínimo de 10 imagens de cada amostra foi analisado para assegurar reprodutibilidade dos resultados, sendo que eles foram apresentados como média e desvio padrão de 50 partículas analisadas.

2.4. Avaliação da eficiência e da porcentagem de encapsulação

Para avaliação da eficiência e porcentagem de encapsulação, devem ser observados quatro parâmetros:

- 1) a quantidade total da droga presente na suspensão coloidal;
- 2) a quantidade da droga não encapsulada (presente na fase externa aquosa);
- 3) a quantidade da droga encapsulada (associada às NC);

4) a quantidade total da droga utilizada na preparação da formulação.

A eficiência de encapsulação de uma determinada droga é calculada pela relação entre a quantidade da droga encapsulada e a quantidade total da droga utilizada na preparação da formulação. O teor de encapsulação compreende a relação entre a quantidade da droga encapsulada e a quantidade total da droga realmente presente na formulação. O volume do filtrado foi corrigido para 100 μL a cada medida.

$$\text{Teor de encapsulação} = \left(\frac{[\] \text{ fármaco total (100 } \mu\text{L}) - [\] \text{ fármaco 100 } \mu\text{L de filtrado}}{[\] \text{ fármaco total (100 } \mu\text{L)}} \right) \times 100$$

A quantidade total de ABZ presente nas diferentes amostras de NC de poli- ϵ -caprolactona (PCL) foi determinada da seguinte maneira:

- Diluição de 100 μL da amostra em acetonitrila;
- Agitação da solução resultante em um aparelho vórtex (MS1, IKA, EUA);
- Leitura no espectrofotômetro (Helios α , ThermoSpectronic, EUA) a 238nm, 20 minutos após o procedimento anterior.

A concentração de ABZ não encapsulada foi determinada por ultrafiltração-ultracentrifugação utilizando-se uma microcentrífuga (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Para tanto, 400 μL da amostra foram depositados na parte superior de filtros Microcon (Amicon®, 100.000Da, Millipore, EUA) e centrifugados a 300x g durante 10 minutos. Uma alíquota de 100 μL da amostra ultrafiltrada foi coletada, diluída em 1 mL de acetonitrila, agitada em vórtex e centrifugada novamente. Posteriormente as amostras foram lidas a 238 nm no espectrofotômetro, conforme a figura 11.

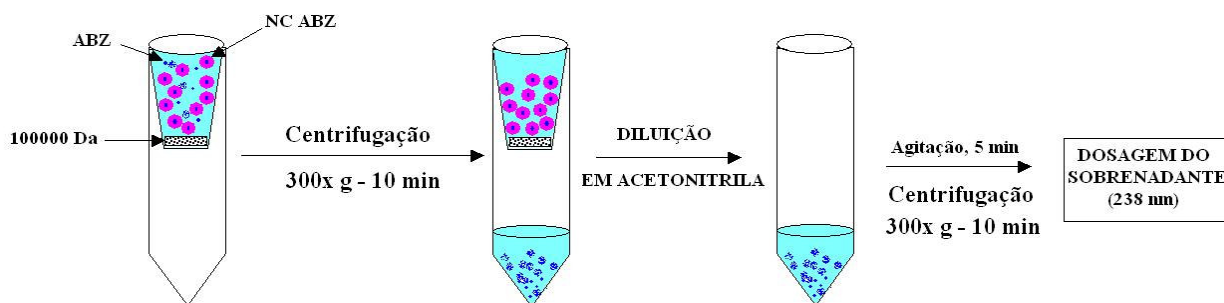


Figura 11: Representação esquemática da metodologia para separação do ABZ encapsulado das NC do ABZ não encapsulado

A quantidade de ABZ encapsulado foi determinada pela diferença entre a quantidade total presente na amostra e a quantidade não encapsulada.

Todas as amostras foram preparadas em triplicatas, sendo coletadas três leituras para cada amostra. Foram analisadas NC contendo 0,5; 1,0 e 5,0mg/mL de ABZ.

2.5. Determinação da cinética de liberação *in vitro*

A avaliação do perfil de liberação *in vitro* do ABZ a partir de NC foi realizado de acordo com a técnica de diálise reversa em equilíbrio de acordo com o método descrito por Levy e Benita (1990) e Magalhães *et al.* (1995). Para tanto, um total de 5 mL da suspensão de NC foi diretamente diluído em 195 mL de uma solução NaCl a 0,9%, onde 6 sacos de diálise com poros de 12000-14000 Da contendo 1 mL da mesma solução NaCl 0,9% estavam previamente imersos. Os sacos de diálise foram mantidos em equilíbrio a 37°C com a solução salina externa durante 2h, antes da adição das NC no meio externo (Figura 12). Em intervalos de tempo pré-definidos (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 h), um dos sacos de diálise foi removido do recipiente e a quantidade de ABZ presente no saco de diálise foi analisada por espectrometria no UV a 238 nm. Os experimentos de cinética de liberação foram realizados em um banho maria a 37°C com agitação (Banho Dubnoff mod.144, Fanem, Brasil).

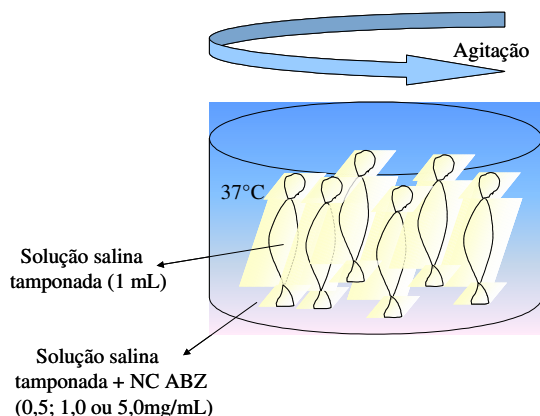


Figura 12: Perfil de liberação *in vitro* a 37°C de ABZ das NC, contendo diferentes concentrações de ABZ em salina tamponada em condições sink (20% da solubilidade máxima do ABZ em salina).

3. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VITRO” DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL

As cepas Y e Colombiana do *T. cruzi* foram utilizadas para determinação da eficácia das NC de ABZ *in vitro*. As formas epimastigotas do parasito foram cultivadas em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas a 28°C. As culturas foram iniciadas com uma densidade celular de 2×10^6 epimastigotas/mL, sendo a droga adicionada 72h depois. A densidade celular foi avaliada através da contagem das células em câmara de Neubauer. A droga não encapsulada (livre) foi adicionada como uma solução de DMSO. A concentração final de DMSO não excedeu o valor de 1% (v/v) e não teve efeitos na proliferação dos parasitos.

4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN VIVO”

A dose máxima tolerada (DMT) do CTZ, do MCZ e do ABZ encapsulados foi avaliada neste estudo utilizando-se camundongos albinos fêmeas, não infectados, pesando aproximadamente 20 g. Os animais sobreviventes foram monitorados durante 24 horas. As formulações produzidas foram administradas pela via IV. O volume administrado aos

animais por via IV foi de no máximo 0,2 mL, exceto quando volumes maiores foram necessários, onde o volume total foi dividido em aplicações de 0,2 mL em intervalos de 10 minutos.

4.1. Cetoconazol e miconazol

A avaliação da DMT das NC de CTZ (4mg/mL) e de MCZ (8mg/mL) foi realizada utilizando-se doses de 40, 150 e 200mg/Kg de CTZ encapsulado (DL₅₀ de 44mg/Kg IV livre, segundo Milne, 2000) e 70 e 150mg/Kg de MCZ encapsulado (DL₅₀ de 1200mg/Kg livre VO, segundo Ito *et al.*,1976).

4.2. Albaconazol

Para a realização dos experimentos de DMT do ABZ, grupos de 10 camundongos, foram tratados com diferentes doses de ABZ livre (25, 30, 35 e 40mg/Kg) ou encapsulado 80, 120, 200 e 500 mg/Kg). Um grupo de cinco animais foi utilizado para o tratamento com 500mg/Kg de ABZ encapsulado. A concentração da solução de ABZ foi de 2,5mg/mL e das NC de ABZ foi de 5,0 mg/mL.

5. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VIVO”

5.1. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas as cepas Berenice-62 (Be-62) (Lana & Chiari, 1986) e Y, ambas pertencentes ao grupo genético de *T. cruzi* II, para estudos realizados durante a fase aguda da infecção. Para os experimentos realizados na fase crônica os animais foram infectados com a cepa Berenice-78 (Be-78) (Lana & Chiari, 1986).

5.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos albinos, fêmeas, com aproximadamente 30 dias de vida, pesando em torno de 20 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal

de Ouro Preto. Durante os experimentos os animais foram mantidos no Biotério Central e tiveram livre acesso à comida e à água.

5.3. Modelos de infecção

Os camundongos utilizados na realização dos experimentos *in vivo* foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos por animal. Os tripomastigotas sanguíneos foram provenientes de passagens sucessivas em camundongos. O mesmo inóculo de *T. cruzi* foi utilizado para as diferentes cepas testadas.

5.4. Avaliação dos animais

Os animais infectados utilizados nos experimentos *in vivo* foram avaliados diariamente para a determinação da parasitemia e da sobrevivência. A parasitemia foi avaliada por exame de sangue a fresco, sendo o número de parasitos contados de acordo com a técnica descrita por Brener (1962). Os resultados foram coletados e utilizados para se traçar a curva de parasitemia. Os animais sobreviventes foram sacrificados 180 dias após a inoculação dos parasitas. Para critério de cura pós-tratamento foram realizados: exame de sangue a fresco e hemocultura, realizada de acordo com a técnica de Chiari *et al.* (1989) modificada por Luz *et al.* (1994).

5.5. Drogas

As drogas BNZ, MCZ, CTZ ITZ, e ABZ, livres ou associadas às formulações nanoestruturadas produzidas, foram utilizadas para o estudo de eficácia anti-*T. cruzi* em modelo murino. As formulações foram isotonzadas com glicose 5% p/v antes das injeções intravenosas.

5.6. Tratamento

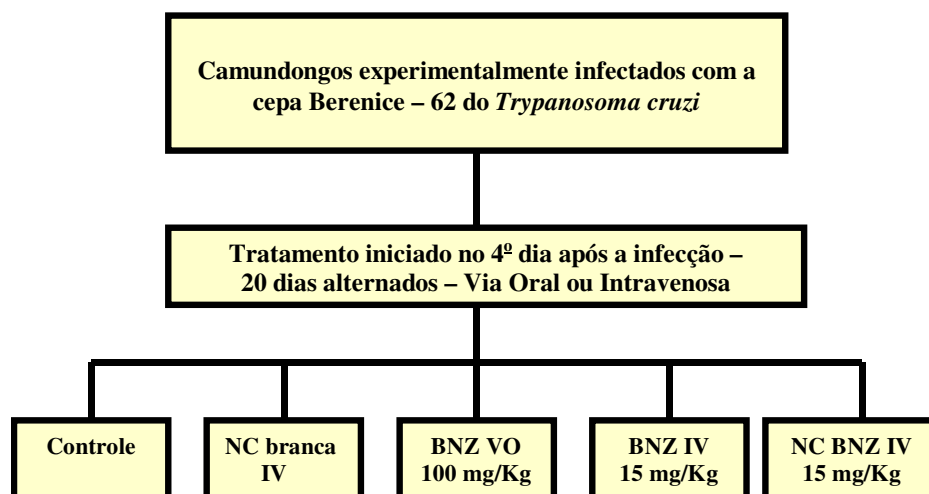
Cada grupo experimental foi composto de 10 animais. Todos os experimentos de eficácia foram acompanhados de um grupo controle tratado com solução de glicose 5%

(p/v), outro tratado com as NC não carregadas de fármaco (brancas) e outro grupo tratado com o fármaco livre (em solução ou em suspensão). O volume administrado aos animais por via IV foi de no máximo 0,2 mL, exceto quando volumes maiores foram necessários, onde o volume total foi dividido em aplicações de 0,2 mL em intervalos de 10 minutos. O modelo experimental de tratamento foi dividido em diferentes protocolos descritos a seguir:

Protocolo 1: Animais tratados com benznidazol (fase aguda)

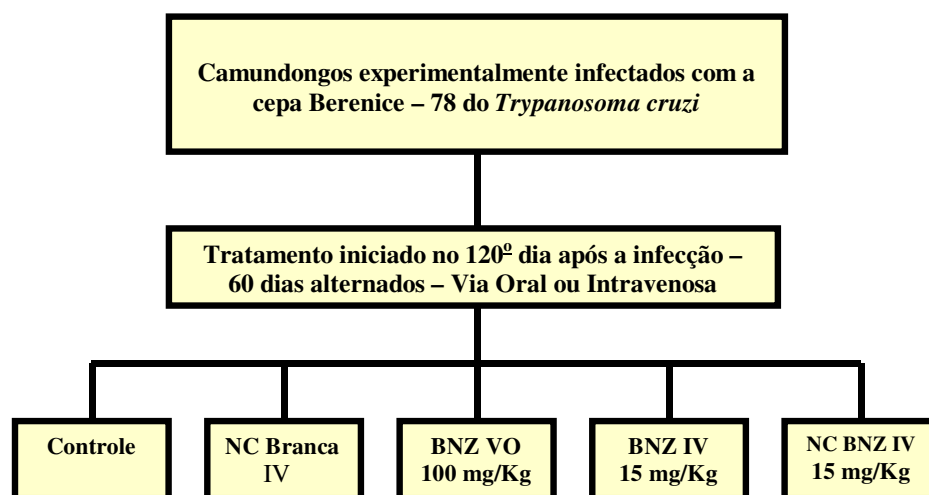
A eficácia do BNZ associado às NC produzidas foi avaliada em camundongos infectados com a cepa Be-62 do *T. cruzi*. Os resultados foram comparados com a eficácia do BNZ livre (não encapsulado).

Os animais infectados com a cepa Be-62 foram tratados com 15mg/Kg de BNZ encapsulado em NC convencionais, a partir do quarto dia após a infecção, durante 20 dias alternados, pela via IV, conforme mostra o esquema abaixo. A concentração de BNZ nas NC era de 1,0 mg/mL.

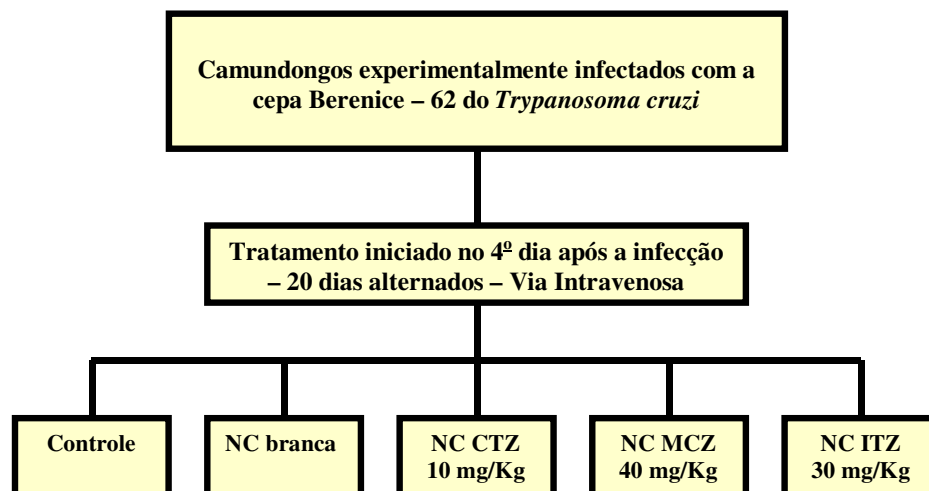


Protocolo 2: Animais tratados com BENZNIDAZOL (fase crônica)

Os camundongos inoculados com a cepa Berenice (**Be-78**) foram tratados com 15mg/Kg de BNZ encapsulado em NC convencionais administradas pela via IV. O tratamento foi iniciado após a evolução da infecção para a fase crônica (120 dias após a inoculação), durante 60 dias alternados.

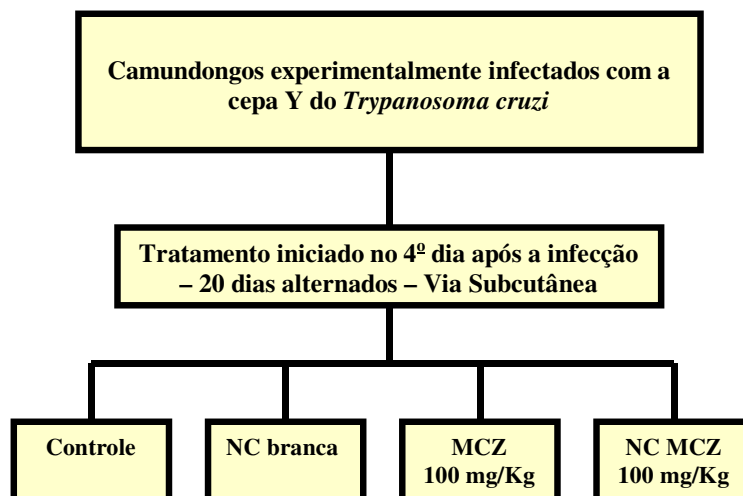
**Protocolo 3: Animais tratados com CETOCONAZOL, ITRACONAZOL OU MICONAZOL (fase aguda)**

Os animais infectados com a cepa Be-62 do *T. cruzi* foram tratados com formulações nanoestruturadas empregando-se as seguintes doses: CTZ 10mg/Kg, MCZ 40mg/Kg e ITZ 30mg/Kg. O tratamento foi iniciado quatro dias após a infecção, durante 20 dias consecutivos, pela via IV.

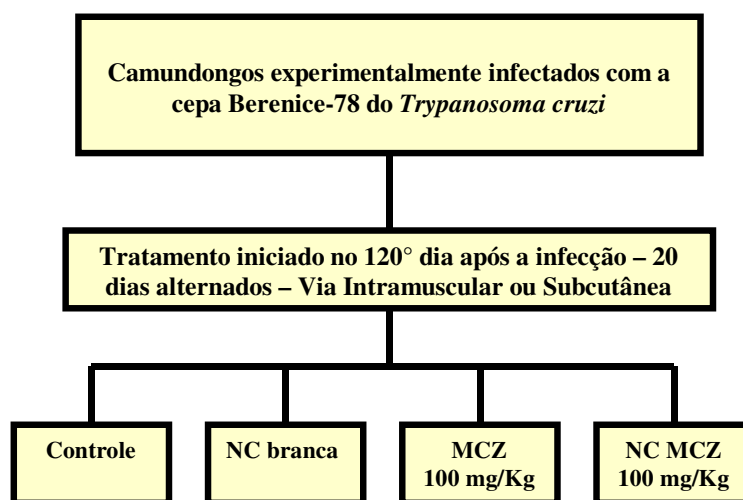


Protocolo 4: Animais tratados com MICONAZOL (fase aguda)

A ação anti-*T. cruzi* do MCZ associado às NC foi avaliada pela via subcutânea (SC) em modelos de fase aguda de infecção utilizando-se a cepa Y do *T. cruzi*. Os camundongos infectados com a cepa Y foram tratados com 100mg/Kg de MCZ encapsulado em NC convencionais, a partir do quarto dia após a infecção, durante 20 dias consecutivos.

**Protocolo 5: Animais tratados com MICONAZOL (fase crônica)**

Para o teste *in vivo* do MCZ em modelo experimental de fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, os animais inoculados com a cepa Be-78 foram tratados 120 dias após a infecção com 100mg/Kg de MCZ encapsulado, durante 20 dias alternados, pelas vias IM e SC.



Protocolo 6: Animais tratados com ALBACONAZOL

A eficácia do ABZ livre ou encapsulado foi testada em modelo murino de fase aguda da doença de Chagas experimental. Os animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* foram tratados com diferentes esquemas posológicos, que diferiram nas doses, vias de administração e na duração do tratamento. Para todos os grupos experimentais, o tratamento iniciou-se sempre no quarto dia após a inoculação.

O primeiro grupo experimental avaliado foi tratado com 20mg/Kg de ABZ em suspensão pela VO, durante vinte dias consecutivos.

Posteriormente, na tentativa de se determinar a melhor via de administração das NC de ABZ, animais infectados foram tratados com 20mg/Kg de ABZ encapsulado em NC convencionais, durante 20 dias consecutivos, pelas vias IM ou SC.

A eficácia do ABZ em suspensão, administrado pela via SC, foi avaliada em animais infectados utilizando-se doses crescentes da droga (20, 80 e 120mg/Kg) para cada grupo, durante 20 dias consecutivos.

Finalmente, o efeito do aumento da dose utilizada também foi avaliado para o tratamento realizado com NC convencionais de ABZ, pela via SC. As doses utilizadas foram 20, 40, 80 e 120mg/Kg, administradas durante 20 dias consecutivos.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição de tamanho da população de nanocápsulas, o potencial zeta, a liberação do ABZ, a eficiência e o teor de encapsulação do ABZ nas NC foram comparados utilizando-se o teste t de *Student* através do programa de análise EpiInfo versão 6.04.

As comparações entre os períodos pré-patentes, de patência, o pico de parasitemia (durante e após o tratamento) e o tempo médio de sobrevivência foram realizadas utilizando-se o teste t de *Student* através do programa de análise EpiInfo versão 6.04. Para a comparação entre as curvas de parasitemia foi utilizado o teste não paramétrico Kolmogorov e Smirnov (Programa SSPS[®]), que compara a área sobre a curva de parasitemia entre duas amostras. Foram realizadas comparações entre as curvas obtidas de camundongos não tratados e tratados, bem como entre as curvas realizadas obtidas de camundongos tratados com as

diferentes formulações. As curvas de sobrevida foram comparadas utilizando-se o teste Kruskal-Wallis, Prisma[®] 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES

1.1. Extração e purificação do benznidazol e itraconazol

O princípio ativo BNZ foi obtido na sua forma pura. O fármaco foi extraído dos comprimidos por adaptação do processo descrito para doseamento do fármaco na Farmacopéia Brasileira (4ª Edição). O rendimento da extração foi de $76 \pm 3 \%$ e foi realizada quatro vezes durante o período experimental. A pureza foi confirmada pelo espectro de absorção a 316 nm e pelo ponto de fusão determinado do cristal purificado a 188.5-190 °C, estando de acordo com as propriedades físico-químicas descritas na Farmacopéia Brasileira. A pureza do ITZ foi verificada pelo ponto de fusão (165°C) que estava de acordo com a literatura.

1.2. Purificação do miconazol base a partir do nitrato de miconazol

A pureza do miconazol base foi confirmada pelo faixa de fusão entre 79-82° que estava de acordo com a literatura 80°C (Farmacopéia Brasileira 4ªEd.)

2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL

2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrometria no ultravioleta para o doseamento do albaconazol

2.1.1. Espectro do ABZ

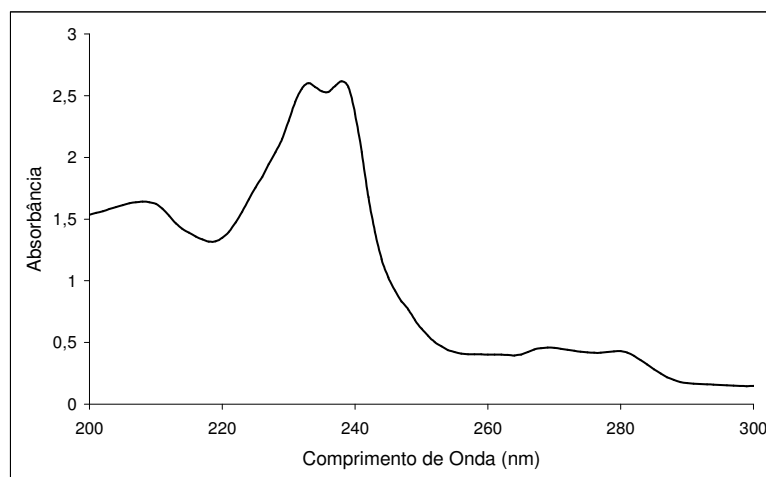


Figura 13: Espectro na região do UV apresentando o pico de absorção máxima do ABZ em acetonitrila (5 µg/mL) a 238 nm.

2.1.2. Especificidade

A interferência dos outros componentes do sistema nanoestruturado na leitura das absorvâncias do ABZ foi avaliada quando amostras de NC brancas a 1 ou 10 % foram utilizadas como branco.

O coeficiente de variação (CV) foi menor que 5%, conforme mostra a Tabela 2, o que garante que no comprimento de onda de 238 nm a absorvância do fármaco não sofre interferência dos outros constituintes das NC nas concentrações de 1% (dados não mostrados) e 10%. Portanto o método foi utilizado para doseamento do ABZ na presença e na ausência dos outros constituintes das NC, sem que o resultado sofresse interferências. A acetonitrila é capaz de dissolver o polímero, o que elimina a turbidez das amostras.

Tabela 2: Resultados da curva de calibração feita com ABZ + NC a 10%.

ABZ ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância Média (a 238 nm) ^a \pm DP ¹	CV ² (%)
0,25	0,017 \pm 0,0008	4,67
0,5	0,042 \pm 0,0008	1,89
1,0	0,109 \pm 0,0047	4,28
2,5	0,262 \pm 0,0044	1,67
5,0	0,538 \pm 0,0104	1,93
7,5	0,79 \pm 0,0028	0,35
10,0	1,029 \pm 0,0031	0,3
25,0	2,427 \pm 0,0073	0,3

^a n = 3; ¹DP = desvio padrão; ²CV = coeficiente de variação, dado por $:(\text{DP}/\text{absorvância média}) \times 100$.

2.1.3. Linearidade

A curva padrão do ABZ em acetonitrila, construída a partir das médias das absorvâncias das concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) estão representados na Figura 14.

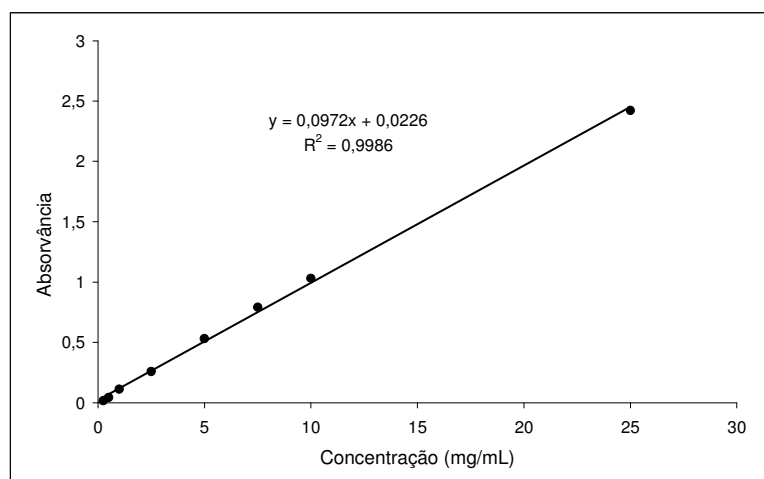


Figura 14: Curva de calibração do ABZ em acetonitrila no comprimento de onda de 238 nm; R^2 = coeficiente de determinação.

O valor de r^2 encontrado significa que 99,86% dos dados são explicados pela curva. A curva de calibração apresentou valor do coeficiente de correlação $r = 0,9986$,

demonstrando a existência de correlação linear entre as concentrações e as absorvâncias, na faixa de 0,25 a 25 µg/mL. A equação da reta foi $y = 0,0972x + 0,0226$, onde o valor associado à variável x corresponde à inclinação da reta e 0,0226 ao intercepto da reta com o eixo das ordenadas. Os valores da absorvância média a 238 nm das diferentes concentrações de ABZ em acetonitrila estão representados na Tabela 3. De acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (ANVISA, 2003), os resultados mostram que houve linearidade, pois o valor do CV está abaixo de 5%.

Tabela 3: Valores de absorvância média do ABZ em função de sua concentração

ABZ (µg/mL)	Absorvância Média (a 238 nm) ^a ± DP ¹	CV ² (%)
0,25	0,018 ± 0,0001	0,55
0,5	0,043 ± 0,0002	0,46
1,0	0,113 ± 0,0001	0,09
2,5	0,259 ± 0,0005	0,19
5,0	0,531 ± 0,0004	0,07
7,5	0,792 ± 0,0009	0,11
10,0	1,032 ± 0,0007	0,07
25,0	2,422 ± 0,0007	0,03

^a n = 3; ¹DP = desvio padrão; ²CV = coeficiente de variação, dado por $:(DP/absorvância\ média) \times 100$.

2.1.4. Precisão

2.1.4.1. Repetibilidade

A Tabela 4 mostra os valores de absorvância correspondentes às amostras de concentração 1,0; 5,0 e 10,0 µg ABZ/mL, obtidas em triplicata e em um mesmo dia, e o CV de cada uma delas.

Tabela 4: Resultados do teste de repetibilidade para validação do doseamento espectrofotométrico do ABZ a 238 nm.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância média ^a \pm DP ¹	CV ² (%)
1,0	0,113 \pm 0,0001	0,0885
5,0	0,531 \pm 0,0005	0,0942
10,0	1,032 \pm 0,0007	0,0678

^a n = 3; ¹DP = desvio padrão; ²CV = coeficiente de variação, dado por $:(\text{DP}/\text{absorvância média}) \times 100$.

O método apresentou CV na faixa de 0,0678 a 0,0942% para todas as concentrações analisadas, sendo que valores abaixo de 5%, estão de acordo com o critério de aceitação estabelecido para a precisão no Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (ANVISA, 2003). Esses valores demonstram a boa precisão do método quanto à repetibilidade.

2.1.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pelo cálculo do CV dos valores das absorvância, obtidos em triplicata, em dois dias diferentes para as concentrações de 1,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g ABZ/mL}$. Os resultados se encontram na Tabela 5.

Os resultados mostraram que os coeficientes de variação obtidos nas análises entre dias foram inferiores a 5%, podendo-se concluir que o método é reprodutível, não apresentando variações significativas entre dias.

Tabela 5: Resultados do teste de precisão intermediária, em dois dias, para validação do doseamento espectrofotométrico do ABZ a 238 nm.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância média ^a \pm DP ¹	CV ² (%)
1,0	0,1092 \pm 0,0054	4,94
5,0	0,5416 \pm 0,0149	2,75
10,0	1,0408 \pm 0,0126	1,21

^a n = 3; ¹DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação, dado por: $(\text{DP}/\text{absorvância média}) \times 100$.

2.1.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada comparando-se os valores de concentração obtidos em triplicata a partir das leituras das absorvâncias das concentrações de 1,0; 5,0 e 10,0 µg ABZ/mL com seus valores teóricos, conforme mostra a Tabela 6.

Os resultados mostraram que os valores obtidos para exatidão variaram de um valor mínimo de 93% para a concentração 1 µg/mL, até um valor máximo de 104,6%, para a concentração 5 µg/mL, sendo o valor médio de 100,48%. Esses dados mostram que os valores encontrados nos experimentos diferiram no máximo em cerca de 4,8% dos valores teóricos, indicando uma boa exatidão para o doseamento espectrofotométrico do ABZ.

Tabela 6: Exatidão do método de determinação do ABZ.

Concentração teórica (µg/mL)	Absorvância ^a ± DP ¹	Concentração experimental (µg/mL)	Exatidão (%)
1,0	0,113 ± 0,0001	0,93	93
5,0	0,531 ± 0,0005	5,23	104,6
10,0	1,032 ± 0,0007	10,38	103,84

^a n = 3; ¹DP = desvio padrão.

O método de doseamento espectrofotométrico no ultravioleta desenvolvido apresentou linearidade na faixa de 0,25 a 25 µg/mL, precisão e exatidão dos dados obtidos. Os CV intra e inter-dias da calibração do método foram baixos e dentro dos limites máximos estabelecidos. O método foi, portanto considerado validado para a quantificação do fármaco nas amostras a serem analisadas e foi utilizado nos estudos subsequentes.

2.2. Análise de tamanho e do potencial zeta

O tamanho e o potencial das nanopartículas contendo diferentes concentrações de ABZ foram avaliados e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Análise do tamanho e potencial zeta das NC contendo diferentes concentrações de ABZ.

Concentração de ABZ (mg/mL)	Potencial zeta ¹ ± DP ² (mV)	Tamanho médio ± DP ² (nm)	I.P. ³
0	- 50,1 ± 1,9*	171,4 ± 0,8	0,127 ± 0,022
0,5	-49,2 ± 3,4*	201,5 ± 0,4	0,096 ± 0,019
1	-59,5 ± 5,1	225,9 ± 2,1	0,193 ± 0,022
5 ⁴	-50,5 ± 3*	155,9 ± 0,3	0,130 ± 0,004

¹Largura do pico igual a 1,6 em todas as amostras; ² DP = Desvio padrão (n = 3); ³ I.P = Índice de polidispersão (n=3); ⁴Cristalização macroscópica do ABZ após a preparação. A análise estatística foi realizada através do teste *t* student entre as diferentes formulações, em relação às NC brancas. $P < 0,05$ para os parâmetros mostrados na tabela, exceto os identificados com *.

O tamanho das diferentes formulações de NC produzidas foi significativamente ($P < 0,05$) afetado pela concentração de ABZ presente nas amostras em relação às NC brancas. As formulações apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) de tamanho médio em relação aos valores obtidos pelas NC brancas entre 0,5 e 1,0 mg/mL. O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no diâmetro das partículas da amostra. Todas as formulações contendo de 0 a 5 mg/mL de ABZ mostraram-se monodispersas, considerando-se o índice de polidispersão menor que 0,3 (Mosqueira *et al.*, 2001, Malvern Inst., 2000).

Os valores de potencial zeta das formulações mostram que tanto as NC brancas quanto as NC de ABZ possuem carga negativa, variando de -49,2 a -59,5 mV. Observa-se também uma mudança significativa ($P < 0,05$) no valor do potencial zeta quando a concentração de ABZ presente na formulação aumenta de 0,5 mg/mL para 1mg/mL, indicando que o ABZ pode estar adsorvido à superfície das NCs aumentando o número de cargas negativas em sua superfície. Entretanto, em concentrações acima de 1,0 mg/mL de ABZ as formulações apresentaram valores de potencial zeta próximos aos de NC brancas (-50,1 mV) e das NC contendo 0,5 mg ABZ/mL (-49,2 mV), nas quais provavelmente o ABZ encontra-se associado ao núcleo oleoso das NC, interferindo pouco no potencial zeta. Esses resultados provavelmente indicam que acima de 1,0 mg/mL a quantidade de ABZ

adsorvida na superfície das NC atinge um nível de saturação a partir da qual a droga precipita no meio externo na forma de cristais macroscópicos.

O mesmo efeito é observado com os resultados das medidas de tamanho médio das nanopartículas, o tamanho das NC aumenta quando a concentração de ABZ associado às NCs aumenta, sendo observado uma redução de tamanho médio das partículas quando a concentração aumenta de 1 para 5 mg/mL, devido à separação das NC e do ABZ na forma de cristais macroscópicos. Desta forma as NC obtidas contendo 5,0 mg/mL de ABZ apresentaram um reduzido tamanho e índice de polidispersão mais próximo das NC brancas, uma vez que os cristais macroscópicos do ABZ não são detectados pelo equipamento que possui limite máximo de detecção de partículas de 30 μ m.

2.3. Análise morfológica

A MEV foi utilizada para observação da morfologia das NC contendo 1 mg/mL de ABZ (Figura 15). Entretanto este método não se mostrou adequado uma vez que o recobrimento das nanoestruturas com carbono ou ouro não foi uniformemente distribuído, causando a deformação das estruturas e mesmo a fusão das mesmas sob o feixe eletrônico. As NC podem ser observadas ligeiramente deformadas evidenciando-se, no entanto seu aspecto esférico tridimensional.

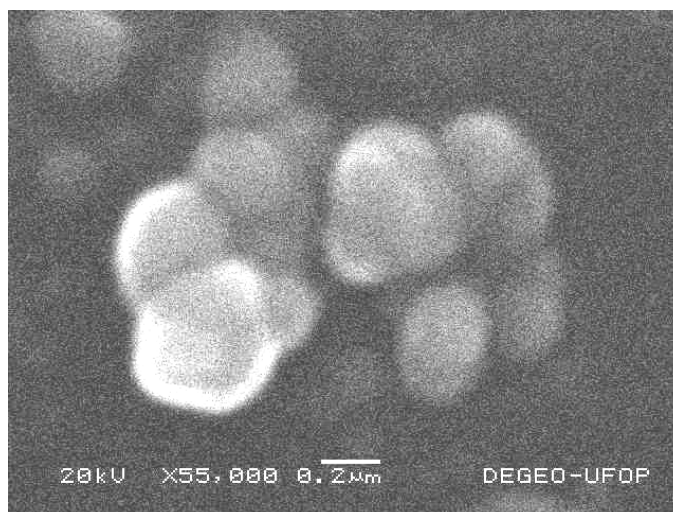


Figura 15 : Micrografia eletrônica de varredura de NC contendo 1 mg/mL de ABZ.

As suspensões coloidais de NC produzidas, contendo ou não ABZ, foram também examinadas morfológicamente através da MFA. As imagens obtidas pela MFA mostram estruturas nanométricas arredondadas depositadas sobre as camadas de mica (Figuras 16, 17 e 21). De acordo com a Tabela 8, o tamanho médio observado apresentou-se significativamente maior que os valores obtidos pela ECF. O diâmetro médio das NC brancas foi de 336 ± 144 nm, e das NC contendo 0,5 e 5 mg/mL de ABZ foi de 195 ± 54 e 250 ± 57 nm, respectivamente. Para se verificar a hipótese de achatamento das NC sobre a mica, foi determinada a relação diâmetro/altura das nanopartículas pela MFA. O valor da relação obtida foi 9 para as diferentes formulações analisadas, e está de acordo com a hipótese de que as NCs possam se achatar na superfície da mica (Montasser *et al.*, 2002, Leite *et al.*, 2005). Em relação à técnica da ECF, a técnica de MFA produz imagens que reproduzem interações entre sonda e amostra e deformações típicas das NC. O diâmetro aumentado em relação ao diâmetro médio obtido por ECF é provavelmente indicativo do achatamento durante a passagem da sonda, efeito este já discutido por outros autores (Montasser, 2002; Leite *et al.*, 2005).

Tabela 8: Medidas de tamanho médio das NC obtidas pelas técnicas de ECF e MFA.

Concentração de ABZ (mg/mL)	Tamanho médio \pm DP ¹ (nm)	
	ECF ²	MFA ³
0	$171,4 \pm 0,8$	336 ± 144
0,5	$201,5 \pm 0,4$	195 ± 54
5	$155,9 \pm 0,3$	250 ± 57

¹DP = Desvio padrão; ²ECF = Espectroscopia de correlação de fótons; ³MFA = Microscopia de força atômica. A análise estatística foi realizada através do teste *t* student entre as diferentes formulações, em relação às NC brancas. $P < 0,05$ (em relação às NC brancas) para todos os parâmetros mostrados na tabela.

A técnica de ECF somente estima o tamanho médio calculado a partir de volume hidrodinâmico das NC, espera-se que por MFA os tamanhos fossem reduzidos, uma vez que as amostras são analisadas no estado mais desidratado. Os tamanhos aumentados por MFA só podem portanto, ser explicados pela deformação e achatamento das NC, o que

demonstra claramente a natureza maleável e pouco rígida das NC. Isto pode conferir às NC facilidade de passagem por poros e endotélios descontínuos *in vivo*.

Nas Figuras 18 e 19, que são imagens topográficas e de fase coletadas das amostras de NC contendo 0,5 mg/mL de ABZ, podem ser observados cristais de tamanho superior ao micrômetro ao redor de grandes partículas. Essas estruturas parecem representar núcleos de cristalização do ABZ. Para se verificar a natureza dessas estruturas, amostras de ABZ não encapsulado, solubilizadas em acetona, foram depositadas sobre a mica. Não foram observadas estruturas cristalinas quando as primeiras imagens foram coletadas, somente estruturas amorfas. Entretanto, decorridas algumas horas, estruturas nano e microcristalizadas foram então observadas. A evaporação do solvente gerou cristais bastante similares (dados não mostrados). Esse fato pode ser atribuído ao crescimento de cristais dependente de umidade e do tempo decorrido após a deposição da amostra sobre a mica. Os cristais e as estruturas amorfas observados nas amostras de NC contendo ABZ não foram observadas nas amostras de NC brancas (Figura 16).

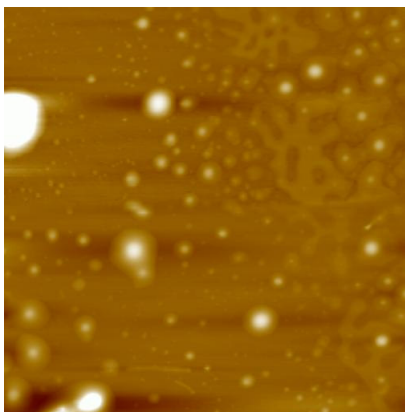


Figura 16: Imagen topográfica de NC brancas de PCL. Área 40 μ m x 40 μ m.

Mesmo em teores de incorporação de 0,5mg de ABZ/mL após desidratação da amostra são observados núcleos de cristalização do ABZ e partículas menores entre essas estruturas, que provavelmente correspondem às NC (Figura 18).

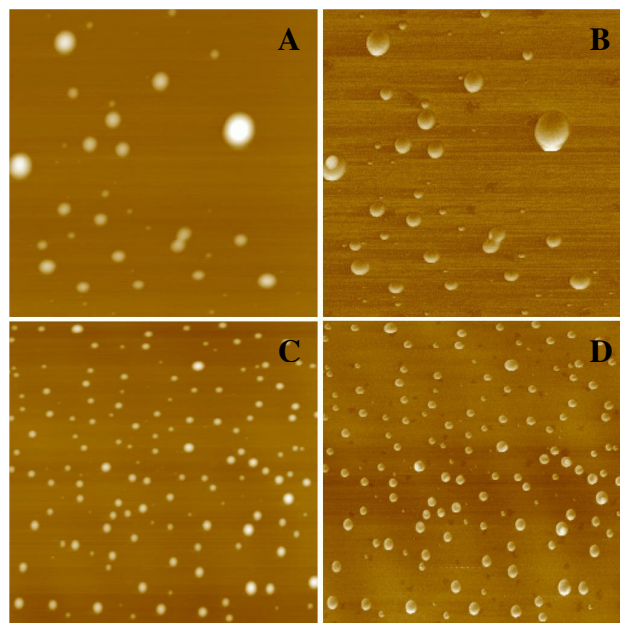


Figura 17: Imagen topográfica (A e C) e de fase (B e D) de NC de PCL contendo 0,5 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. As figuras A/B e C/D representam a mesma amostra analisada em campos diferentes.

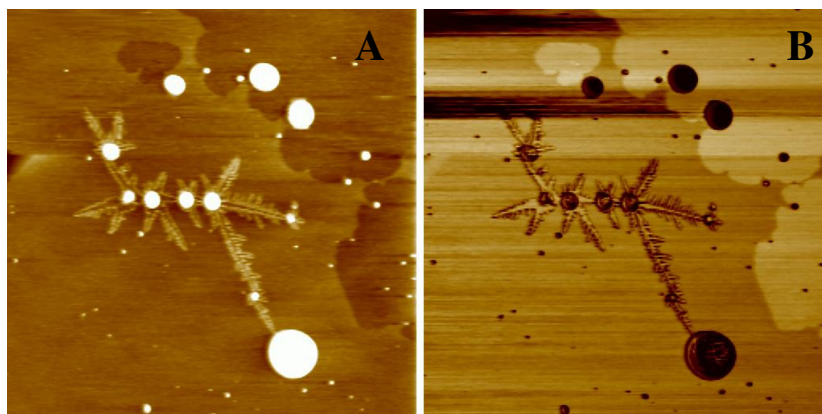


Figura 18: Imagen topográfica (A) e de fase (B) de NC de PCL contendo 0,5 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$.

Na Figura 18 e 19 são mostradas as imagens de altura e de fase dos núcleos de cristalização do ABZ em detalhe na suspensão coloidal de NC. Provavelmete a supersaturação de ABZ no meio desidratado de análise por MFA induz à rápida cristalização do ABZ, como observado nas amostras com concentrações de 0,5mg/mL. A

representação esquemática da Figura 20, foi baseada nos resultados de MFA e também nos resultados de potencial zeta apresentados na Tabela 8.

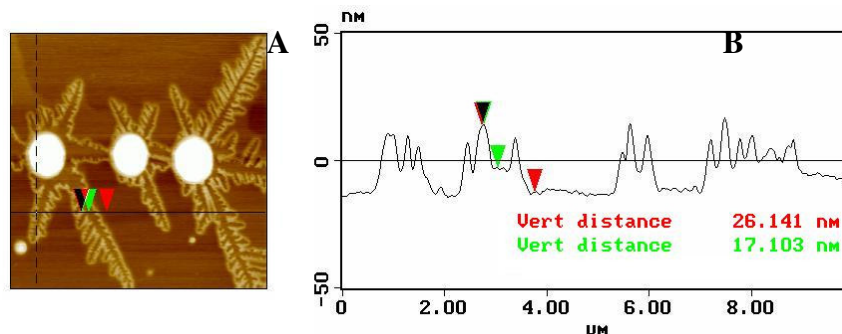


Figura 19: Imagem (A) e perfil (B) topográfico de amostras de NC de ABZ a 0,5mg/mL, apresentando a altura do cristal de ABZ formado. Área: 10 μ m x 10 μ m.

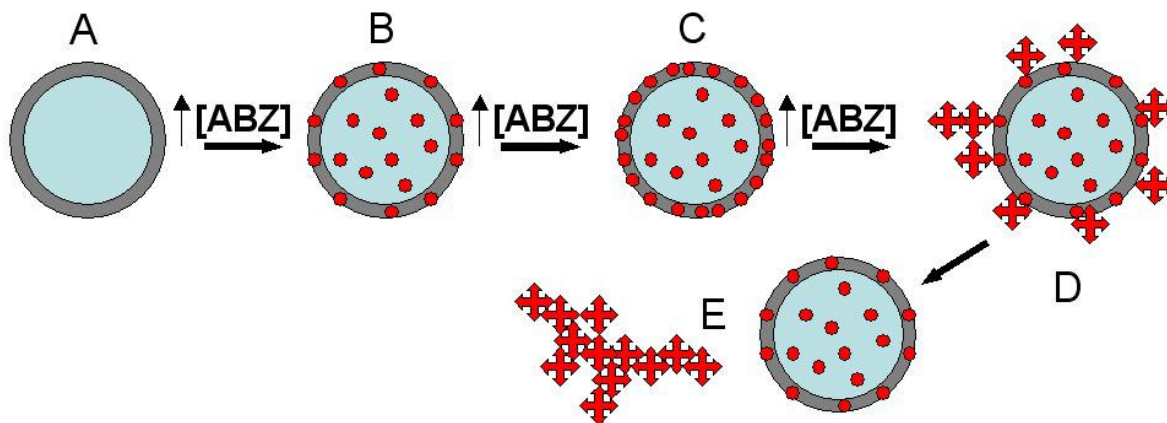


Figura 20: Representação esquemática da hipótese de cristalização do ABZ nas NC. Em A: NC na ausência de ABZ, em B: NC contendo 0,5 mg ABZ/mL, com o ABZ adsorvido e encapsulado no interior das NC; em C: 1mg/mL; em D: NC de ABZ a 5mg/mL, supersaturação do sistema e em E a mesma formulação após algumas horas, com a presença de cristais macroscópicos do ABZ.

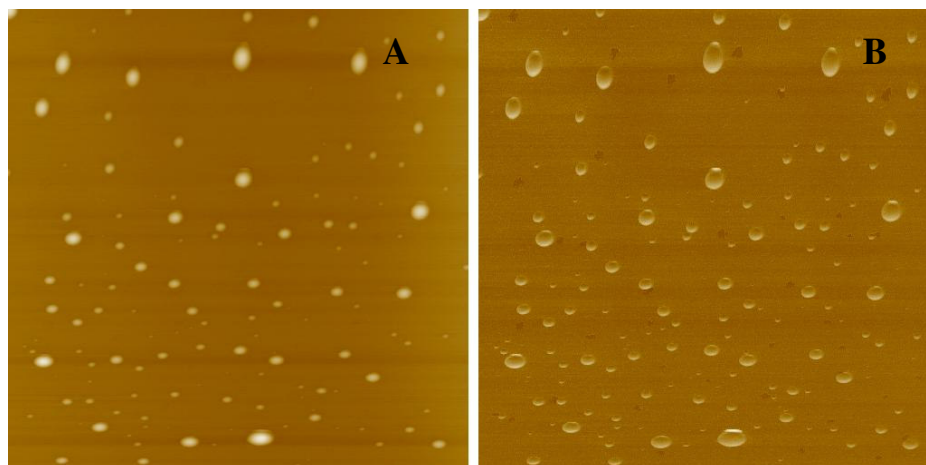


Figura 21: Imagen topográfica (A) e de fase (B) de NC de PCL contendo 5,0 mg/mL de ABZ obtidas por MFA. Área 10 μ m x 10 μ m.

Nas imagens de MFA das figuras 17 e 21 observa-se que as preparações de NC apresentam-se homogeneamente distribuídas. Existem poucas diferenças morfológicas entre as NC brancas e aquelas contendo ABZ, independentemente da concentração da droga. Provavelmente o fármaco precipitado se separa das partículas, as quais mantêm suas características originais sob a mica. Observam-se regiões ricas em cristais (Figura 18) e regiões ricas em NC na ausência de cristais (Figuras 17 e 21).

2.4. Avaliação da eficiência e da porcentagem de encapsulação

A eficiência e o teor de encapsulação das diferentes formulações de NC preparadas foram determinados e os resultados se encontram na Tabela 9.

Tabela 9: Eficiência e teor de encapsulação das NC contendo diferentes concentrações de ABZ.

Concentração teórica de ABZ (mg/mL)	Concentração final \pm DP ¹ (mg/mL)	Eficiência de encapsulação \pm DP (%)	Porcentagem de encapsulação \pm DP (%)
0,5	0,36 \pm 0,18	71,41 \pm 4,13	99,79 \pm 0,38
1,0	1,17 \pm 0,03*	117 \pm 3,6*	94,27 \pm 0,15*
5,0	1,39 \pm 0,32*	27,89 \pm 1,88*	94,18 \pm 0,32*

¹DP –Desvio padrão (n = 3). Os valores de *P* entre as formulações foram determinados pelo teste *t* de Student. * *P* \leq 0,05 com relação as NC de 0,5mg/mL.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram altos teores de encapsulação, variando de 94,18 \pm 0,32 %, para as NC contendo 5 mg/mL de ABZ, a 99,79 \pm 0,38 % para a formulação de NC contendo 0,5 mg de ABZ/mL. Estes resultados indicam que o ABZ possui mais afinidade pelo núcleo oleoso das NC do que pelo meio aquoso externo e que portanto, se associam às NC devido a sua alta lipofilia. Entretanto, a eficiência de encapsulação do ABZ presente na amostra contendo 5mg/mL de ABZ é significativamente reduzida (*P* < 0,05) em relação às outras formulações. Os resultados que avaliam o processo de obtenção das NC indicam que em valores superiores a 1mg/mL a quantidade de droga que pode ser encapsulada atinge seus valores máximos e as NC se saturam de fármaco, resultando em precipitação do ABZ no meio externo e em baixos valores de eficiência de encapsulação. Portanto, a concentração ótima de ABZ que pode ser encapsulada está próxima de 1mg/mL. O baixo valor de eficiência de encapsulação da formulação contendo 5,0 mg/mL de ABZ está relacionado ao processo de cristalização macroscópica da droga e às perdas ocorridas durante o processo.

2.5. Determinação da cinética de liberação *in vitro*

O método utilizado para avaliar o perfil de liberação *in vitro* do ABZ encapsulado foi eficientemente empregado nesse experimento. Os resultados estão representados na Figura 23. A liberação de ABZ das NC para o meio externo é relativamente rápida e incompleta,

apresentando-se bifásica. De 0 a 1 hora, o perfil de liberação das formulações de 0,5 e 5 mg/mL de ABZ seguiram o mesmo padrão, com um efeito “burst” menor (liberação rápida) para as NC de 5mg/mL. Após 2 horas, as formulações contendo 0,5 e 1 mg/mL de ABZ obtiveram perfis de liberação similares com uma velocidade de liberação bem mais lenta. As NC contendo 5 mg/mL de ABZ apresentaram uma redução na liberação após 2 horas. Em geral, cerca de 40 % do ABZ é liberado no meio externo em menos de 4 horas.

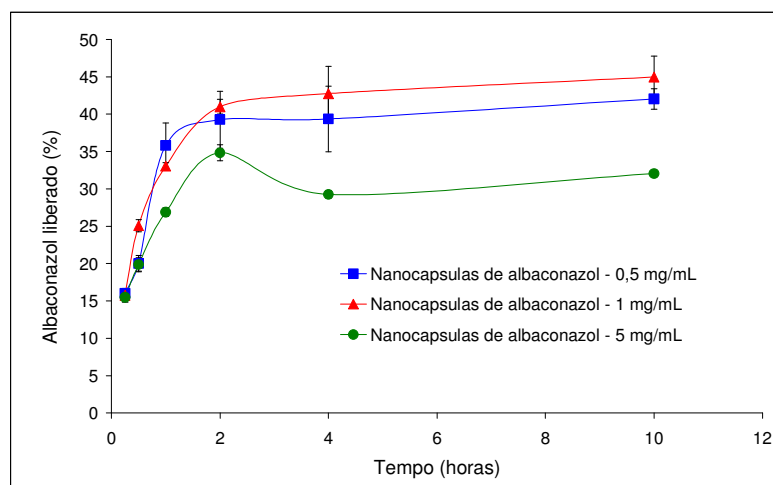


Figura 22: Perfil de liberação *in vitro* de NC a 37°C contendo diferentes concentrações de ABZ em salina tamponada em condições sink (20% da solubilidade máxima no meio).

Observa-se que após 2h a liberação do ABZ entra em outra fase com uma velocidade de liberação lenta. Até 10h a liberação do ABZ das NC é incompleta. Parece ocorrer precipitação do ABZ no meio de liberação com a formulação de 5mg/mL após 2h, o que reduz a concentração de ABZ no meio de liberação. Estes resultados indicam que a liberação das NC *in vitro* é bastante rápida, o que pode ser devido a uma forte adsorção do ABZ na superfície das NC, como já evidenciado pelas medidas do potencial zeta. Entretanto, as NC parecem reter parte do ABZ encapsulado, o que está de acordo com resultados de outros autores indicando que a liberação do fármaco das NC se faz por partição entre o meio aquoso externo e o núcleo oleoso (Mosqueira *et al.*, 2006).

3. ESTUDOS DE EFICÁCIA *IN VITRO* DAS NANOCÁPSULAS DE ALBACONAZOL

Os efeitos do ABZ encapsulado sobre as formas epimastigotas da cepa Y e Colombiana do *T. cruzi*, são mostrados na Figura 24, A e B , respectivamente. Foi observada uma ação inibitória do ABZ sobre as formas epimastigotas da cepa Y, comparada com as culturas controle e as culturas tratadas com NC branca. Essa ação inibitória se iniciou 24 horas após a adição do ABZ e não foi dose-dependente, por não terem sido observadas diferenças marcantes quando 1 ou 3 μ M de ABZ foram adicionados às culturas. Também não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na eficácia do ABZ livre ou encapsulado no crescimento das culturas. O ABZ encapsulado em NC foi ineficaz no controle do crescimento celular quando adicionado em culturas da cepa Colombiana, resistente ao BNZ, mesmo quando doses maiores foram testadas (3 μ M), indicando a resistência desta cepa às duas drogas (Filardi & Berner, 1987; Veloso *et al.*, 2001).

Portanto, nos estudos *in vivo* realizados nesse trabalho foram utilizadas somente cepas parcialmente e totalmente sensíveis ao BNZ para avaliação da eficácia dos diferentes inibidores da biosíntese do ergosterol na forma livre ou encapsulada. Em geral a susceptibilidade das diferentes cepas de parasitas não pode ser modificada pela vetorização, sendo que os ganhos com o uso dessa alternativa tecnológica estão mais concentrados na perspectiva de alteração da biodistribuição do fármaco no organismo, que podem resultar no aumento das concentrações da droga a nível tecidual e intracelular e na redução da toxicidade ao nível de órgãos vitais, tais como coração, rins e cérebro (Lasic, 1998, Barratt, 2000).

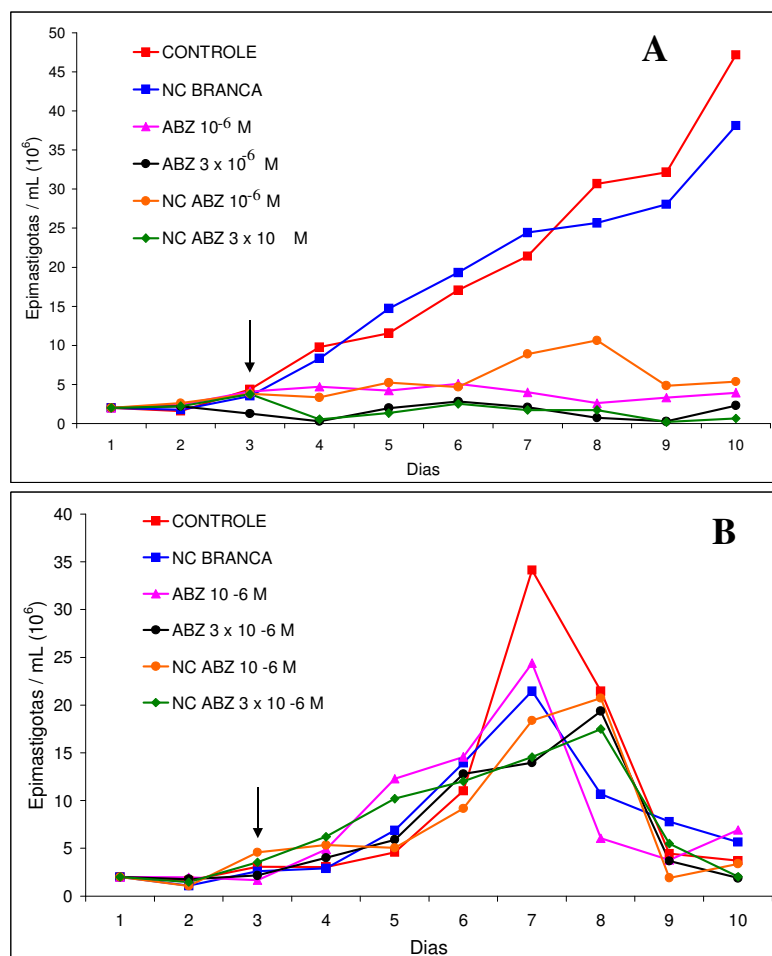


Figura 23: Efeitos do ABZ encapsulado na proliferação de formas epimastigotas das cepas Y (A) e Colombiana (B) do *T. cruzi*. A seta indica o dia da adição das formulações. NC = nanocápsulas; ABZ = albaconazol.

4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN VIVO”

4.1. Cetoconazol e Miconazol

Inicialmente foram realizados experimentos para a definição das doses máximas toleradas e efetivas dessas drogas encapsuladas. Foram avaliadas as doses de 40, 150 e 200 mg/Kg de CTZ encapsulado e 70 e 150 mg/Kg de MCZ encapsulado, administradas pela via IV. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Efeitos adversos provocados pela administração intravenosa de CTZ e MCZ livres ou associados às NC.

Parâmetros avaliados					
	Dose	Ataxia	Alterações Respiratórias	Convulsão	Sobrevida ¹
Nanocápsulas de cetoconazol	40 mg/Kg	-	-	-	5/5
	150 mg/Kg	+	++	+	3/5
	200 mg/Kg	+++	+++	++	0/5
Cetoconazol livre	44mg/Kg				DL ₅₀ (Milne, 2000)
Nanocápsulas de miconazol	70 mg/Kg	++	+	+	5/5
	150 mg/Kg	+++	+++	+++	0/5
Miconazol livre	1200mg/Kg (VO)				DL ₅₀ (Ito <i>et al.</i> , 1976)
Miconazol livre	50mg/Kg (IP)	-	-	-	100% (Pospisil <i>et al.</i> , 1990)
Miconazol DACTARIN®	80mg/Kg (IV)	+++	+++	+++	100% , (Levy <i>et al.</i> , 1995)
Miconazol DACTARIN®	100mg/Kg (IV)				0% , (Levy <i>et al.</i> , 1995)

¹Avaliada durante 24 horas.

Apesar de a formulação contendo 1,0mg/mL de ABZ ter se mostrado a mais estável, a formulação contendo 5,0 mg/mL de ABZ foi utilizada para que não fosse administrado grandes volumes durante a avaliação doses mais elevadas. Os sintomas observados após a administração de doses de 150 e 200 mg/Kg de NC de CTZ e 70 e 150 mg/Kg de NC de MCZ foram similares: os animais apresentaram ataxia, alterações respiratórias e convulsão. Para ambas drogas testadas os sintomas foram mais intensos com o aumento da dose utilizada. Observa-se uma redução da toxicidade geral com o uso de CTZ encapsulado uma vez que houve um aumento de DL₅₀ pela via intravenosa na forma encapsulada de 44 mg/Kg para valores em torno de 150mg/Kg. A DL₅₀ para o MCZ encapsulado ficou entre 70 a 150mg/Kg, sendo que para o MCZ livre este ficou entre 80 e 100mg/Kg da formulação de Dactarin® segundo Levy *et al.*, 1995. Aparentemente a formulação de NC não

aumentou a tolerância intravenosa do MCZ, quando comparada às emulsões de MCZ preparadas por Levy *et al.*, 1995 onde a droga emulsionada foi tolerada até dose única superior a 250mg/Kg, com 100% de sobrevida.

4.2. Albaconazol

De acordo com o gráfico da porcentagem de sobrevida versus a concentração de ABZ administrada pela via IV representado na Figura 25 e os dados da Tabela 11, a DL₅₀ do ABZ livre foi de 30,4mg/Kg. Não foi possível se obter experimentalmente o valor da DL₅₀ para o ABZ encapsulado nas NC, pois mesmo em altas concentrações da droga, nenhuma morte foi observada no prazo de 72 horas. Portanto, a encapsulação mostrou-se uma alternativa bastante útil para a redução da toxicidade geral do ABZ, uma vez que a DL₅₀ foi aumentada em mais de 10 vezes como pode ser observado pela Figura 25. A Tabela 11 mostra os efeitos adversos observados nos animais após a administração das diferentes doses de ABZ. Observou-se que com o uso das NC a intensidade e o número de efeitos colaterais foi muito reduzida. Esses resultados indicam que no caso do ABZ as NC foram eficazes na redução da toxicidade geral da droga, como já descrito por outros autores com outros fármacos (Leite *et al.*, 2006 e Mosqueira *et al.*, 2004).

Tabela 11: Efeitos adversos provocados pela administração intravenosa de ABZ livre ou associado às NC.

	Parâmetros Avaliados				
	Dose	Ataxia	Alterações Respiratórias	Convulsão	Sobrevida*
Albaconazol ¹ livre	25 mg/Kg	-	-	-	10/10
	30 mg/Kg	+++	+++	++	5/8
	35 mg/Kg	-	-	++	2/10
	40 mg/Kg	-	-	+++	0/9
Nanocápsulas de Albaconazol ²	80 mg/Kg	-	-	-	10/10
	120 mg/Kg	++	+	-	10/10
	200 mg/Kg	++	+	-	8/8
	500 mg/Kg	+++	+++	-	5/5

¹ Suspensão de albaconazol (2,5 mg/mL); ² Nanocápsulas de albaconazol (5 mg/mL); *Avaliada durante 72h.

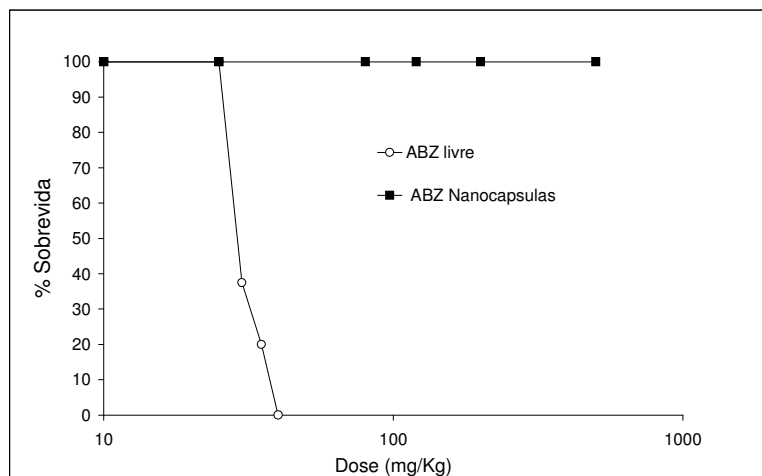


Figura 24: Gráfico da dose máxima tolerada pela via intravenosa de albacozol livre ou encapsulado em camundongos fêmeas.

5. ESTUDOS DE EFICÁCIA “IN VIVO”

Protocolo 1: Animais tratados com benznidazol (fase aguda)

Os estudos *in vivo* foram realizados em modelo murino da doença de Chagas aguda e crônica. Em estudos preliminares *in vivo*, as NC furtivas, com a superfície modificada para aumentar o tempo de circulação sanguíneo, não foram eficazes em suprimir a parasitemia e a mortalidade dos animais e, portanto, nos estudos posteriores essas formulações foram abandonadas (dados não mostrados). Desta forma, os estudos posteriores foram realizados com BNZ encapsulados em NC convencionais, administradas por via endovenosa, em comparação com a formulação convencional oral de BNZ. Os protocolos de tratamento desenvolvidos empregaram doses e regimes de administração reduzidos para que a via IV seja avaliada como uma alternativa terapêutica viável.

As curvas de parasitemia e sobrevivência dos camundongos infectados e tratados com as formulações IVs contendo 15 mg/Kg de BNZ estão representadas na Figura 26.

Os resultados obtidos utilizando-se BNZ em solução e NC de BNZ, via IV, na dose de 15 mg/Kg demonstram que estas formulações não foram capazes de induzir a cura parasitológica da infecção e foram pouco eficazes na supressão da parasitemia e no aumento da sobrevivência dos animais infectados, comparados ao grupo controle ($P= 0,031$

para o grupo tratado com 15mg/Kg de BNZ livre e $P=0,033$ para o grupo tratado com NC ABZ 15 mg/Kg/dia). Por outro lado, o tratamento convencional (100 mg/Kg/dia, VO, durante 30 dias consecutivos) induziu a supressão da parasitemia e da mortalidade em todos os animais submetidos ao tratamento. A mortalidade dos animais não tratados e tratados com as formulações intravenosas (NC branca, BNZ solução 15 mg/Kg e NC de BNZ 15 mg/Kg) foi de 100%, enquanto não foi observada mortalidade entre os animais tratados com 100 mg/Kg de BNZ VO. As diferentes formulações administradas por IV não foram tão efetivas na redução da parasitemia dos animais quando comparadas com o tratamento VO. No entanto, é importante ressaltar que as NC de ABZ foram mais eficazes na supressão da parasitemia quando comparadas com a formulação intravenosa de ABZ livre nas mesmas doses.

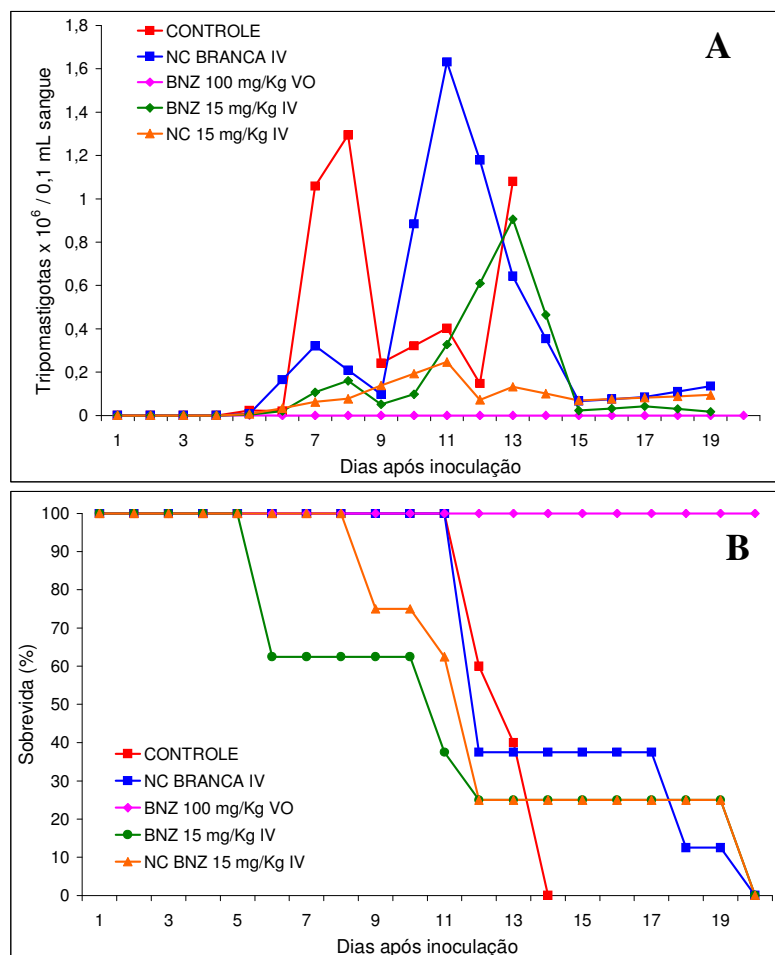


Figura 25: Curva de parasitemia (A) e sobrevivida (B) de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-62 de *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações de BNZ livre ou encapsulado. NC = nanocápsulas; BNZ = benznidazol; IV = via intravenosa; VO = via oral.

No caso das NC não foi possível o aumento do teor de fármaco encapsulado, devido a problemas de estabilidade físico-química do sistema. Um excesso do fármaco nas suspensões nanoparticuladas levou à formação de cristais de difícil redispersão, havendo, portanto, o risco de redução das doses administradas. A administração IV foi realizada pela veia do sinus retroorbital dos animais, o que induziu um enfraquecimento dos animais devido à frequência de administrações, levando algumas vezes a morte durante o tratamento. Os animais apresentaram sinais claros de fadiga devido à doença na fase aguda e ao esquema terapêutico. Portanto, a mortalidade precoce dos animais tratados com as

formulações endovenosas não estaria somente associada a uma parasitemia elevada, mas também a toxicidade da droga por essa via.

Protocolo 2: Animais tratados com benznidazol (fase crônica)

Para os animais tratados durante a fase crônica, infectados com a cepa Be-78, tratados com NC de BNZ a 15 mg/Kg pela via IV, todas as hemoculturas apresentaram resultados positivos durante a primeira análise (30 dias após a coleta da hemocultura). Os resultados se encontram na Tabela 12. Também na fase crônica, não houve melhoria do perfil terapêutico com a utilização de NC, sendo que somente o tratamento convencional foi eficaz em induzir a cura parasitológica, demonstrada pela negatificação dos testes de hemocultura.

Tabela 12: Avaliação do exame de hemocultura realizada em camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações de benznidazol.

Formulação	Hemocultura ¹
Controle	+
NC Branca	+
Suspensão de BNZ – 100 mg/Kg VO	-
Solução de BNZ – 15 mg/Kg IV	+
NC de BNZ – 15 mg/Kg IV	+

¹Leitura realizada 30 dias após o término do tratamento.

Portanto, os resultados obtidos mostram que as NC não foram capazes de prolongar a permanência sanguínea do BNZ, provavelmente devido ao baixo teor de encapsulação do BNZ nas nanopartículas, com valores inferiores a 33%. Entretanto, nenhum sinal de toxicidade aguda foi observado quando as formulações nanoparticuladas foram injetadas pela via IV.

Diante destes resultados, o tratamento utilizando-se o BNZ foi abandonado e outros fármacos mais lipofílicos encapsulados foram estudados nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Protocolo 3: Animais tratados com cetoconazol, itraconazol ou miconazol (fase aguda)

Os animais infectados com a cepa Be-62 do *T. cruzi* foram tratados com formulações IV nanoestruturadas de CTZ, ITZ e MCZ, nas doses de 10, 30 e 40 mg/Kg, respectivamente. As curvas de parasitemia e de sobrevivência estão representadas na Figura 27. As diferentes formulações de CTZ, ITZ e MCZ foram preparadas com o intuito de se reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia desses derivados azólicos para o tratamento específico da doença de Chagas, especialmente na fase crônica. Inicialmente os animais foram tratados durante a fase aguda da infecção, tendo como objetivo avaliar tanto o efeito anti-*T. cruzi* quanto a formulação a ser testada nos estudos de fase crônica. A atividade dessas novas formulações foi testada na cepa Be-62 de *T. cruzi*, sensível ao tratamento com o BNZ.

Os resultados indicaram que os tratamentos via IV com CTZ, ITZ e MCZ encapsulados não foram efetivos na supressão da parasitemia, e que também não houve aumento da sobrevivência em comparação ao grupo controle ($P > 0,05$). A sobrevivência das NC de ITZ foi bastante inferior ao do grupo controle, o que demonstra que provavelmente a toxicidade do fármaco por essa via foi maior. Embora as formulações desses derivados azólicos não tenham apresentado eficácia no tratamento pela via IV, possivelmente devido ao curto tempo de permanência do fármaco na circulação sanguínea, continuou-se o estudo da administração do MCZ por outras vias, devido a inexistência de dados mais completos na literatura utilizando-se este fármaco na doença de Chagas por diferentes vias de administração.

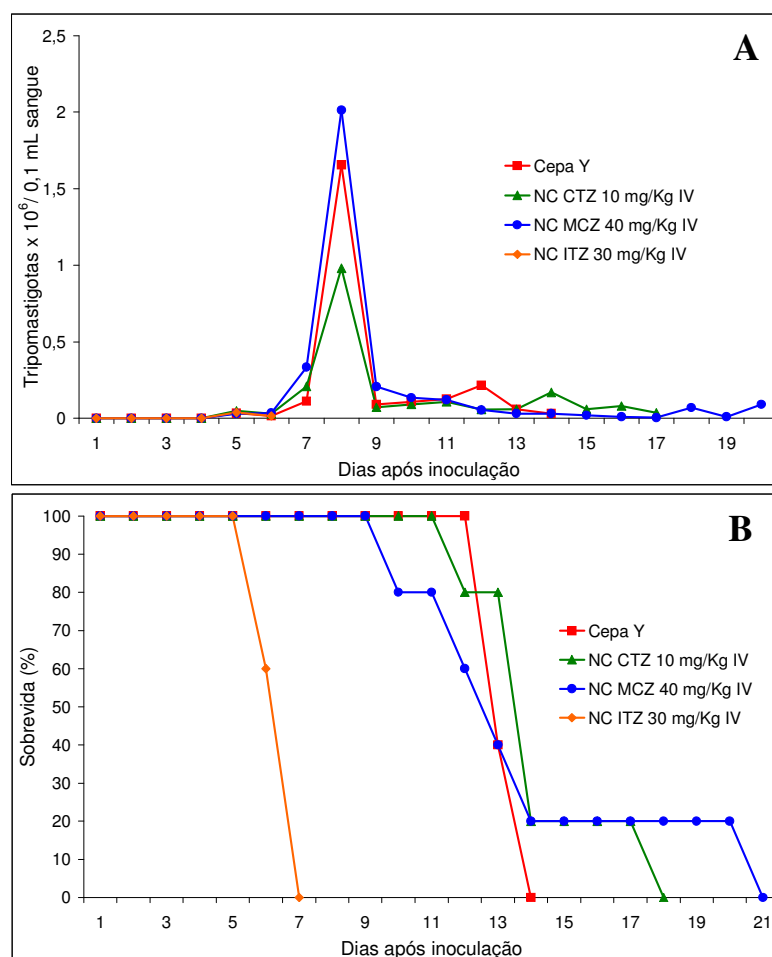


Figura 26: Curva de parasitemia (A) e sobrevivida (B) de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Be-62 do *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações nanoestruturadas contendo CTZ, MCZ ou ITZ. NC = nanocápsulas; CTZ = cetoconazol; MCZ = miconazol; ITZ = itraconazol; IV = via intravenosa.

Protocolo 4 e 5: Animais tratados com miconazol (fase aguda e crônica)

A administração SC e IM do MCZ foi testada, pois essas vias são uma forma de depósito do fármaco no tecido que podem potencialmente prolongar a permanência do fármaco no organismo, o que é necessário para a cura da infecção pelo *T. cruzi*. Os experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da administração SC e IM das formulações nanoestruturadas de MCZ a 100 mg/Kg no controle da parasitemia e da sobrevivida de camundongos infectados com a cepa Y (fase aguda) e Be-78 (fase crônica) do *T. cruzi*. Embora doses altas, próximas da letal IV, descrita para o Dactarin® tenham

vido utilizadas (Levy *et al.*, 1995), a via SC não disponibiliza o fármaco imediatamente para absorção o que permite que doses mais altas sejam utilizadas em relação à via IV. As curvas de parasitemia e sobrevida são mostradas na Figura 28. Os resultados de hemocultura estão representados na Tabela 13.

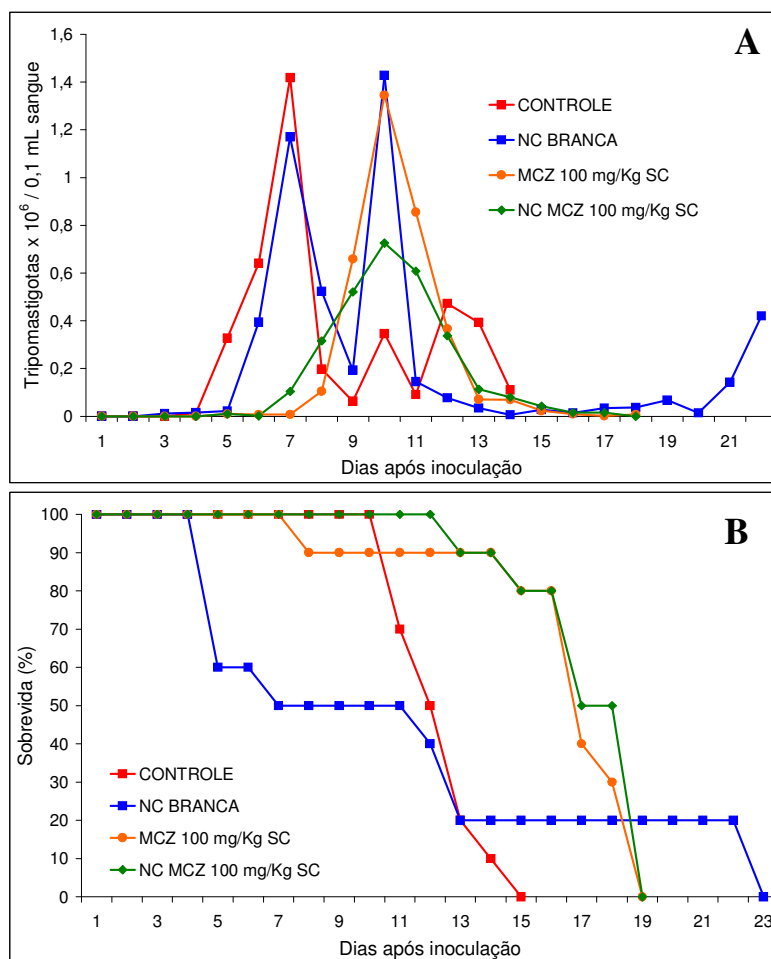


Figura 27: Curva de parasitemia (A) e sobrevida (B) de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com miconazol livre ou encapsulado. NC = nanocápsulas; MCZ = miconazol; SC = via subcutânea.

Houve por sua vez uma significativa supressão da parasitemia ($P < 0.05$) e um significativo aumento da sobrevida dos animais tratados com as formulações SC de MCZ quando comparadas ao controle e as NC brancas. Entretanto, a diferença entre as duas

formulações de MCZ SC não foram significativas, o que pode indicar que as NC sejam também rapidamente absorvidas a partir do sítio de administração da mesma maneira que o MCZ livre.

Tabela 13: Avaliação do exame de hemocultura realizada em camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-78 do *T. cruzi*, tratados com diferentes formulações de MCZ, pelas vias intramuscular ou subcutânea.

Grupo	Parasitemia (10º dia após tratamento)		Hemocultura ¹	
	Via IM	Via SC	Via IM	Via SC
Controle	+	+	+	+
NC Branca	+	+	+	+
Miconazol 100mg/Kg	+	+	+	+
NC Miconazol 100mg/Kg	+	+	+	+

¹Leitura realizada 60 dias após o término do tratamento. IM = intramuscular; SC = subcutânea; NC = nanocápsulas.

O tratamento com nanocápsulas de MCZ pelas vias SC e IM não foi eficaz na fase crônica da infecção, sendo a positividade de 100% na hemocultura. A encapsulação do MCZ não apresentou uma vantagem na terapêutica de casos agudos e crônicos da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, comparado ao tratamento convencional VO com BNZ 100 mg/kg.

Nos estudos realizados ao longo deste trabalho com os fármacos já comercializados, as NC parecem ter sido um veículo adequado, estável e não tóxico de administração de um fármaco insolúvel no sangue pelas vias IV, SC e IM. Foram observados efeitos de redução da toxicidade geral e boa tolerância das formulações de NC. O CTZ foi muito melhor tolerado pela via IV que o mesmo na foram livre.

Deste modo, um novo fármaco de ação anti-*T. cruzi* comprovada *in vitro* (Urbina *et al.*, 2000), mas que possui problemas de permanência sanguínea no modelo murino, o albaconazol (UR-9825), em fase de ensaios pré-clínicos, foi estudado em seguida no presente trabalho com objetivo de avaliar a utilidade das NC no aumento do tempo de residência sanguíneo de drogas lipofílicas. Objetivou-se assim prolongar e controlar a liberação do fármaco no organismo utilizando-se vias de administração adequadas.

Protocolo 6: Animais tratados com albaconazol

A eficácia do ABZ no modelo murino infectado com a cepa Y parcialmente resistente ao BNZ foi avaliada investigando-se diferentes parâmetros: vias de administração, doses, regime de doses e formulações.

Os resultados mostrados na Tabela 14 e na Figura 29 indicam que as NC brancas e os excipientes da suspensão parenteral não exerceram nenhum efeito significativo sobre os níveis de parasitemia ($P > 0,05$) dos animais infectados quando comparados ao controle não tratado que recebeu somente glicose isotônica. Entretanto, os excipientes da suspensão parenteral reduziram significativamente o tempo médio de sobrevida em relação ao controle ($P < 0,05$), evidenciando-se uma ligeira toxicidade geral com o uso dos solventes durante 20 dias.

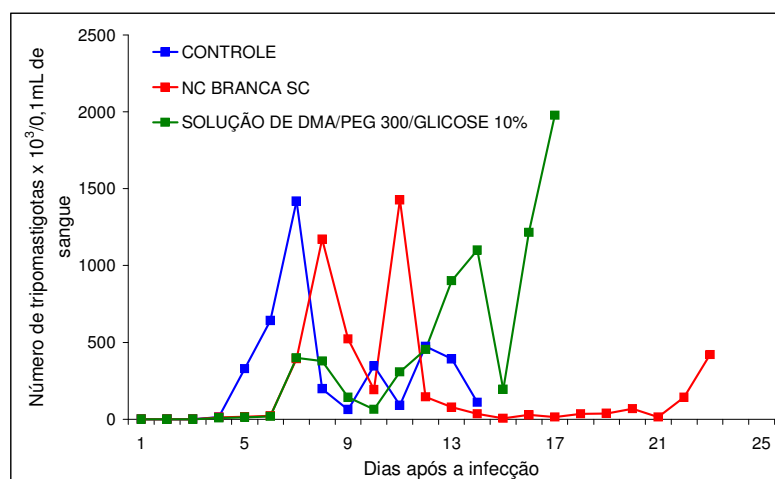


Figura 28: Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com NC branca ou solução de DMA/PEG 300/Glicose 10%. NC = nanocápsulas; SC = via subcutânea; DMA = dimetilacetamida; PEG = polietilenoglicol.

As suspensões de ABZ livre foram administradas por duas vias diferentes (VO e SC) com um regime de tratamento de 20 dias ininterruptos, além de terem sido testadas via SC em três diferentes doses (20, 80 e 120 mg/Kg). De acordo com a Tabela 14, a eficácia foi significativamente maior pela via SC quando comparada à VO na dose de 20 mg/Kg referente ao período patente ($P < 0,05$), à parasitemia durante ($P < 0,05$) e após ($P < 0,05$) o tratamento. A sobrevida foi de 100% para as duas vias de administração. Porém, pela via

SC, 70% dos animais permaneceram com parasitemia negativa até 20 dias após o tratamento, enquanto 100% apresentaram parasitemia patente durante e após o tratamento pela VO. Na dose de 80mg/Kg de ABZ livre via SC, houve uma redução significativa do período patente ($P < 0,02$), sem reativação da parasitemia após o tratamento em 100% dos animais. Entretanto, a sobrevivência foi 30% menor em relação a dose de 20mg/Kg, evidenciando-se uma toxicidade crônica do ABZ, pois os animais morreram na segunda semana após o início do tratamento com valores de parasitemia negativos.

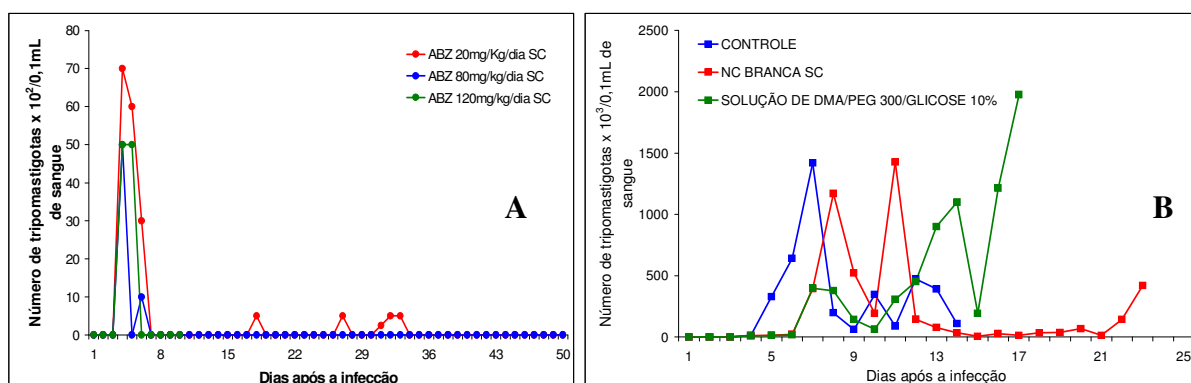


Figura 29: A - Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com diferentes doses de ABZ livre; B – curvas de parasitemia dos grupos controle. ABZ = albaconazol; SC = via subcutânea, NC = nanocápsula, DMA = dimetilacetamida, PEG = polietilenoglicol.

Não houve diferença significativa nos valores de parasitemia máxima para os animais sobreviventes nas três doses utilizadas (20, 80 e 120mg/Kg) pela via SC ($P > 0,05$) (Tabela 14 e Figura 30). Na dose de 120 mg/Kg houve uma redução significativa do tempo médio de sobrevivência ($P < 0,05$), onde os animais morreram todos durante a primeira semana de tratamento com parasitemia negativa. Este resultado indica que esta dose foi extremamente tóxica para os animais. A parasitemia máxima, entretanto, esteve nos mesmos níveis da dose de 80mg/Kg como pode ser observado pela Figura 30 e pela Tabela 14. Os resultados encontrados nesse trabalho indicam que os níveis de eficácia do ABZ livre no modelo murino foram inferiores aos encontrados com o pozaconazol na dose de 20mg/Kg/dia durante 20 dias pela VO onde se atingiu níveis de cura de 90%, segundo Molina *et al.* (2000). Embora os resultados encontrados com o fármaco livre neste trabalho

em termos de sobrevida nas doses de 20 e 80mg/Kg sejam próximos dos encontrados por Urbina *et al.* (2003) com o ravuconazol VO e com o CTZ VO, esses autores evidenciaram cura parasitológica em torno de 20%, o que não foi observado em nosso trabalho. Entretanto, estes resultados foram observados quando os animais foram tratados por 43 dias, enquanto o tratamento com ABZ foi administrado apenas por 20 dias nesse trabalho. A administração duas vezes ao dia das mesmas doses aumentou o índice de cura parasitológica para 70% na dose de 10mg/Kg para o ravuconazol, mas permaneceu a mesma para o CTZ. Como foi previamente discutido, a rápida supressão da parasitemia e os baixos índices curativos desses derivados azólicos estão provavelmente associados às características farmacocinéticas desfavoráveis, como o tempo de meia vida sanguíneo curto que reduz as concentrações disponíveis nos tecidos para erradicação desses parasitos intracelulares (Urbina *et al.*, 2003).

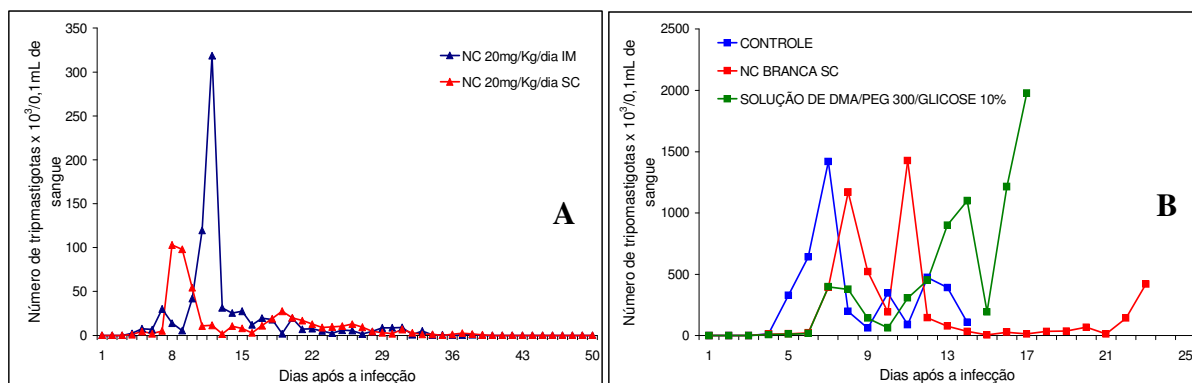


Figura 30: A - Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com 20mg/Kg de ABZ encapsulado, pelas vias IM ou SC. B – curvas de parasitemia dos grupos controle. NC = nanocápsulas; ABZ = albaconazol; IM = intramuscular; SC = via subcutânea, NC = nanocápsula, DMA = dimetilacetamida, PEG = polietilenoglicol.

Portanto, estes dados reforçam a importância da vetorização destes fármacos com o objetivo de melhorar as suas características farmacocinéticas e potencializar a sua atividade tripanocida. Os dados apresentados anteriormente relativos à toxicidade aguda mostraram que a encapsulação do ABZ em NC foi bastante efetivo no aumento da DL_{50} . Foi então avaliada a eficácia das NC contendo ABZ em diferentes doses frente à cepa Y,

parcialmente resistente ao BNZ. Os dados da Tabela 14 mostram que quando o ABZ encapsulado foi administrado através das vias SC ou IM na dose de 20 mg/Kg, não foi observada diferença na sobrevivência dos animais (80-90%). Além disso, não foi observada a redução significativa ($P>0,05$) da parasitemia nos animais tratados com estes esquemas terapêuticos na forma de NC comparados ao ABZ livre (Tabela 14 e Figura 31). Provavelmente o ABZ é rapidamente liberado das NC *in vivo*, o que reduz o tempo de permanência do fármaco no organismo.

Em vista destes resultados, os estudos com doses maiores de ABZ foram prosseguidos somente pela via SC, uma vez que a administração IM não é bem tolerada, difícil de ser realizada nos animais e potencialmente mais irritante devido à administração de polímeros no tecido muscular, os quais aumentam a acidez no tecido após degradação, com potenciais riscos de lesão muscular.

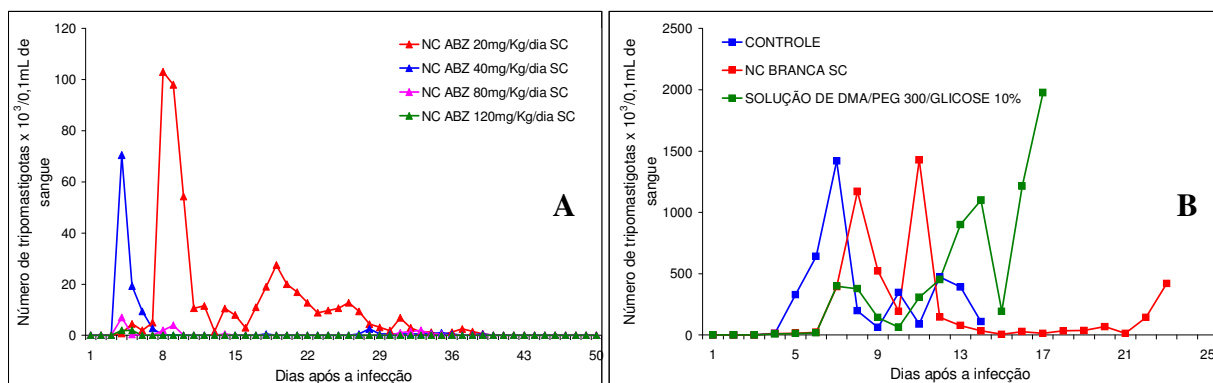


Figura 31: A - Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *T. cruzi*, tratados via SC com diferentes doses de ABZ encapsulado. B - curvas de parasitemia dos grupos controle. NC = nanocápsulas; ABZ = albaconazol; SC = via subcutânea; DMA = dimetilacetamida; PEG = polietilenoglicol.

O uso do ABZ em NC na dose de 40mg/Kg dividido em duas doses diárias de 20mg/Kg implicou em maior tempo para reativação da parasitemia após o término do tratamento e em menor índice de reativação da parasitemia após tratamento em relação ao tratamento realizado com uma única dose diária de 40mg/Kg. Entretanto, a sobrevivência foi menor com o uso de duas doses diárias. Com o aumento das doses para 80 e 120 mg/kg, observou-se um aumento da eficácia com redução significativa do período patente ($P<0,05$), e a eliminação dos parasitos do sangue por um período superior a 120 dias em

20% e 60% dos animais tratados, respectivamente (Tabela 14). Não foram observados efeitos tóxicos durante e após o tratamento, o que diferencia as NC de ABZ do fármaco livre, que nas mesmas doses induziram a morte de 30 e 100% dos animais, respectivamente. Pela Figura 32 observa-se claramente a eliminação rápida e eficaz da parasitemia com as doses de 80 e 120 mg/Kg em NC. Na dose de 120mg/Kg em NC não houve reativação da parasitemia até 60 dias após o fim do tratamento (Tabela 14).

Os dados sugerem que nas mesmas doses, o albaconazol na forma livre é mais rapidamente liberado para o sangue e exerce seu efeito, ao passo que as nanocápsulas, provavelmente, retêm a droga a elas associadas por maior tempo, reduzindo a concentração que chega ao sangue e a velocidade de absorção, sendo nesse caso menos ativas. Entretanto, em doses maiores, 120mg/mL, as nanocápsulas foram mais ativas que o fármaco livre e muito menos tóxicas, indicando que são necessárias doses maiores para que a fração de dose liberada rapidamente reduza a parasitemia. Assim sendo, a fração retida nas NC é liberada mais lentamente causando o efeito supressivo sobre a parasitemia por maior tempo. A permanência do albaconazol no organismo parece ter sido alterada pelas nanocápsulas, ao mesmo tempo em que foi observada uma clara redução da toxicidade geral.

Tabela 14: Sumário dos dados da avaliação dos animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com diferentes formulações e doses de ABZ.

Dose (mg/kg/dia)	Via	Sobrevida	TMS ¹ (dias)	Período Patente (\pm DP ²)	TPN ³ (dias)		
					90	120	
Controle	SC	0/10	11,4 \pm 1,3	8,3 \pm 1,5	NA ⁹	NA	
NC Branca	SC	0/10	10,2 \pm 7,6	7,2 \pm 7,6	NA	NA	
DMA/PEG300	SC	0/10	8,4 \pm 4,9*	5,4 \pm 4,9	NA	NA	
Benznidazol (100mg)	VO	10/10	>60	0	10/10	10/10	
ABZ livre	20	VO	10/10	>60*	30 \pm 4,8	NA	NA
	20	SC	10/10	>60*	9,8 \pm 12,4	NA	NA
	80	SC	7/10	>60 ⁴ *	1,4 \pm 0,8	3/7	0/7
	120	SC	0/10	4,7 \pm 1,6*	1 \pm 0,0	NA	NA
ABZ Nanocápsulas	20	IM	9/10	>60 ⁵ *	27,1 \pm 3,1	NA	NA
	20	SC	8/10	>60 ⁶ *	30,1 \pm 6,1	NA	NA
	40 (2x 20)	SC	9/10	>60 ⁷ *	16,5 \pm 14,6	NA	NA
	40	SC	10/10	>60*	22,6 \pm 11,9	NA	NA
	80	SC	10/10	>60*	22,4 \pm 12,8	2/10	2/10 ⁸
	120	SC	10/10	>60*	1,1 \pm 0,3	6/10	6/10 ⁸

¹TMS = tempo médio de sobrevida; ²DP = desvio padrão; ³TPN = testes parasitológicos negativos (em dias após a realização da hemocultura); ⁴Animais morreram no 9^o, 10^o e 13^o dia após inoculação; ⁵Animal morreu no 33^o dia após inoculação; ⁶Animais morreram no 21^o e 27^o dia após inoculação; ⁷Animal morreu no 6^o dia após inoculação; ⁸ positivos 180 dias após o término do tratamento; ⁹ NA = não avaliado; *Significativamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$).

Continuação da Tabela 14

Dose (mg/kg/dia)	Via	Durante o tratamento			
		Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima	
Controle	SC	0/10	1.418.000 ± 969.336	7	
NC Branca	SC	0/10	1.427.000 ± 3.082.271	11	
DMA/PEG300	SC	0/10	1.976.000 ± 0	17	
ABZ livre	20	VO	0/10	27.000 ± 29.078*	19
	20	SC	9/10	500 ± 1.581*	18
	80	SC	10/10	0*	NA ⁴
	120 ³	SC	10/10	0*	NA
ABZ Nanocápsulas	20	IM.	0/10	318.500 ± 558.535*	12
	20	SC	0/10	103.000 ± 104.488*	8
	40 (2 x 20)	SC	5/9	3.333 ± 5.590*	8
	40	SC	9/10	500 ± 1.581*	18
	80	SC	9/10	4.000 ± 12.649*	9
	120	SC	10/10	0*	NA

¹Avaliada do 4º ao 20º dia após o início do tratamento; ²DP = desvio padrão; ³Todos os camundongos morreram até o 7º dia de tratamento; ⁴NA = não avaliado; *Significativamente diferente do grupo controle. ($P < 0,05$).

Continuação Tabela 14

Dose (mg/kg/dia)	Via	Após o tratamento			
		Nº de camundongos com reativação da parasitemia/total	TMR ¹ (dias)	Parasitemia máxima (média ± DP ²)	Dia da parasitemia máxima
Controle	SC	NA ³	NA	NA	NA
NC Branca	SC	NA	NA	NA	NA
DMA/PEG300	SC	NA	NA	NA	NA
ABZ livre	20	VO	NA	7.500 ± 4.249*	28
	20	SC	2/10	500 ± 1.581*	27
	80	SC	0/10	0*	NA
	120 ^b	SC ^c	NA	NA	NA
ABZ Nanocápsulas	20	IM	NA	9.000 ± 11.499	31
	20	SC	NA	12.778 ± 16.976	26
	40 (2 x 20)	SC	5/9	3.890 ± 8.580*	35
	40	SC	8/10	2.500 ± 3.536*	28
	80	SC	8/10	2.000 ± 2.582*	33
	120	SC	0/10	0*	NA

¹ TMR, tempo médio de reativação da parasitemia; ² DP = desvio padrão; ³ NA= não avaliado; * Significativamente diferente do grupo tratado com NC 20mg/Kg/dia via SC.

Observou-se, portanto, uma resposta terapêutica dose dependente quando as NC foram utilizadas, com uma redução significativa da toxicidade para os animais. Estes dados indicam que provavelmente o perfil farmacocinético da droga foi alterado com o uso das NC. Na forma de NC as doses necessárias de ABZ para eliminação da parasitemia são significativamente mais altas. Isto pode ser devido à formação de um depósito de NC no tecido subcutâneo que não disponibiliza imediatamente a quantidade de fármaco para erradicação da parasitemia, mas que a médio e longo prazo mantém os níveis sanguíneos da droga mais altos, permitindo uma reativação da parasitemia muito mais lenta. Essa hipótese leva em consideração que as NC são capazes de reter o fármaco por maior tempo em seu interior e a liberação tanto do fármaco quanto das próprias NC a partir do tecido subcutâneo seria mais lenta. O estudo de liberação do ABZ das NC na salina mostrou que no máximo 45% da droga foi liberada das formulações nas primeiras 10 horas, fato que corrobora a hipótese de que uma menor fração de ABZ livre esteja disponível no sangue para exercer os efeitos tripanocidas rápidos contra as formas tripomastigotas sanguíneas. Os dados sugerem que nas mesmas doses, o albaconazol na forma livre é mais rapidamente liberado para o sangue e exerce seu efeito, ao passo que as nanocápsulas, provavelmente, retêm a droga a elas associadas por maior tempo, reduzindo a concentração que chega ao sangue e a velocidade de absorção, sendo nesse caso menos ativas. Entretanto, em doses maiores, 120mg/mL, as nanocápsulas foram mais ativas que o fármaco livre e muito menos tóxicas, indicando que são necessárias doses maiores para que a fração de dose liberada rapidamente reduza a parasitemia e a fração retida nas NC seja liberada lentamente causando o efeito supressivo sobre a parasitemia por maior tempo.

Apesar de não ter sido obtida a cura parasitológica dos animais tratados com as novas formulações de ABZ, os resultados obtidos foram positivos no sentido da melhoria do tempo de permanência do ABZ no tecido subcutâneo que permitiu uma ação mais sustentada levando ao aumento do tempo médio de sobrevivência, do número de testes parasitológicos negativos e do período necessário para reativação da parasitemia. Esses resultados podem ser provavelmente atribuídos às modificações na biodistribuição da droga quando administrada pela via SC na forma livre ou encapsulada.

A eficácia no modelo murino foi reduzida embora no modelo cão a cura parasitológica e sorológica também não tenham sido obtidas em 100% dos casos com o ABZ (Guedes *et al.*, 2004). Somente um regime de múltiplas doses diárias foi capaz de melhorar a eficácia terapêutica, o que indica também que o ABZ possui propriedades farmacocinéticas pouco favoráveis em diferentes modelos animais. Daí a necessidade de desenvolver formulações mais adequadas visando a liberação controlada desse tipo de fármaco para melhorar o regime terapêutico, a eficácia e a adesão dos pacientes de fase crônica ao tratamento.

Finalmente, o efeito mais promissor observado nesse trabalho, foi mais uma vez relativo à toxicidade geral reduzida do ABZ na forma encapsulada. Esse efeito foi observado por diferentes autores, os quais atribuem a redução da toxicidade ao menor acesso das NC aos órgãos e tecidos vitais irrigados por vasos revestidos por endotélios contínuos, os quais reduzem o extravasamento da droga encapsulada em partículas maiores que 150nm para os tecidos subjacentes quando administradas pela via IV (Lasic, 1998, Barratt, 2000, Mosqueira *et al.*, 2004 e Leite *et al.*, 2006). Nossos resultados reforçam essa hipótese, mesmo que nesse trabalho a via subcutânea tenha sido mais utilizada. O tamanho reduzido das NC e a capacidade de achatamento e maleabilidade da membrana polimérica observados podem provavelmente permitir que as NC penetrem na circulação sanguínea a partir do tecido subcutâneo e sejam passivamente direcionadas para tecidos irrigados por vasos com endotélios descontínuos, tais como fígado, baço e medula óssea. Como já argumentado por Tarlenton (2001), a eliminação tecidual do parasita é uma das metas do tratamento na fase crônica da doença de Chagas e permite uma redução significativa dos sintomas e da mortalidade em humanos.

Desta maneira, estudos mais aprofundados da infecção tecidual em animais tratados com as diferentes doses e formulações de ABZ livre e encapsulado, são posteriormente necessárias para se estabelecer uma relação entre encapsulamento e capacidade de atuação do ABZ nos diferentes tecidos para uma otimização dos resultados de eficácia na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

- Diferentes fármacos derivados azólicos de natureza lipofílica foram efetivamente associados à nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona e as formulações se mantiveram estáveis durante os experimentos *in vitro* e *in vivo*. Especialmente o albaconazol, foi encapsulado com porcentagens de encapsulação próximos de 100%, o que indica que o sistema foi adequado para associação do ABZ.
- Foi desenvolvida uma nova metodologia de doseamento do albaconazol baseada na espectrometria de absorção do ABZ no ultravioleta, que permitiu que as nanocápsulas de albaconazol fossem caracterizadas com relação ao seu teor, eficiência de encapsulação e cinética de liberação a partir das NC.
- A MFA foi uma técnica considerada precisa para determinar a variabilidade na relação diâmetro/altura devido as deformações das nanocápsulas sob pressão. Entretanto, esta técnica nas condições utilizadas não foi totalmente adequada para avaliação de variações de tamanho das nanopartículas. A AFM permitiu, entretanto, observar as nanocápsulas com relação a sua morfologia e a determinar a influência das quantidades de ABZ na formulação e na saturação do sistema nanoparticulado, além de permitir determinar o tamanho e evidenciar a capacidade de achatamento das NC.
- Os estudos de potencial zeta evidenciaram a associação do ABZ as NC e à sua superfície e também auxiliaram na determinação da capacidade máxima de encapsulação do ABZ no sistema.
- Os estudos *in vitro* permitiram observar que a encapsulação do ABZ em NC não foi capaz de reverter a resistência natural de cepas naturalmente resistentes ao BNZ e ao ABZ, tais como a cepa Colombiana de *T. cruzi*.
- Os estudos de eficácia realizados pela via intravenosa com ABZ, MCZ, CTZ e ITZ, demonstraram que a encapsulação não permitiu uma melhoria da eficácia para esses fármacos para cepas sensíveis ao BNZ. No caso do BNZ houve mesmo uma redução da eficácia e um aumento da toxicidade pela via IV em relação à via oral.

Provavelmente as NC não permitem um real controle da liberação das drogas no sangue com as formulações e drogas utilizadas, o que não permitiu melhoria das propriedades farmacocinéticas dos fármacos supracitados.

- O cetoconazol e particularmente, o albaconazol associados às NC mostraram-se menos tóxicos para os animais, com significativo aumento da DMT para as formulações nanoestruturadas.
- A associação do ABZ às NC permitiu obter resultados positivos no sentido da melhoria do tempo de permanência do ABZ no tecido subcutâneo levando a uma ação mais sustentada com aumento do tempo médio de sobrevida, do número de testes parasitológicos negativos e do período necessário para reativação da parasitemia, apesar de não ter sido obtida a cura parasitológica dos animais tratados com as novas formulações de NC de ABZ.
- Em resumo, o presente trabalho ressalta a importância de se avaliar já na fase pré-clínica formulações diferenciadas que visem melhorar o regime posológico e as propriedades farmacocinéticas, reduzir a toxicidade das diferentes drogas em fase de desenvolvimento e avaliação biológica, sob o risco de se descartar previamente substâncias com alto potencial terapêutico, mas inadequadamente formuladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Resolução n 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. Physicochemical characterization of polymeric nanocapsules and *in vitro* release evaluation of indomethacin as a drug model. *S.T.P. Pharma.*, v. 5, p. 647-651, 1989.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISEUX, F.; BENITA, S. *In vitro* release kinetic pattern of indomethacin from poly (D-L-lactide) nanocapsules. *J. Pharm. Sci.*, v. 79(9), p. 763-767, 1991.

ANDRADE, A. L. S. S.; MARTELLI, C. M. T.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; AIRES, A. I. S.; SOUSSUMI, L. M. T.; COVAS, D. T.; SILVA, L. S.; ANDRADE, J. G.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 71(5), p. 594-597, 2004.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J. B.; FILHO, F. F.; LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 86, p. 624-626, 1992.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59(1), p. 133-138, 1998.

APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SANCHEZ, G.; VARGAS, S. L.; RODRIGUEZ, J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 97(1), p. 23-29, 2003.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; CANCADO, J. R.; FERRARI, T. C.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; MOREIRA, M. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis.*, v.182(2), p. 634-638, 2000.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today*, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BARTROLI, J.; TURMO, E.; ALGUERO, M.; BONCOMPTE, E.; VERICAT, M. L.; CONTE, L.; RAMIS, J.; MERLOS, M.; GARCIA-RAFANELL, J.; FORN, J. New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. *J. Med. Chem.*, v. 41(11), p. 1869-1882, 1998.

BIRDI, K. S.; VU, D. T.; MOESBY, L.; KRISTENSEN, D.; OLSEN, K.; ANDERSEN, K.B. Application of Scanning Tunnelling Microscopy (STM) and Atomic Force Microscopy (AFM) in Colloid and Surface Chemistry. In: *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, cap. 19, p. 701-739, 1997.

BLANCO, S. B.; SEGURA, E. L.; CURA, E. M.; CHUIT, R.; TULIÁN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J. F.; GÜRTLER, R. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop. Med. and Internat. Health*, v. 5(4), p. 293-301, 2000.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 27, p. 347-383, 1973.

BRENER, Z.; CANCEADO, J. R.; GALVAO, L. M.; DA LUZ, Z. M.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, L. M.; CANCEADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 88(1), p. 149-53, 1993

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 331-336, 1999.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 44, p. 29-37, 2002.

CAUCHETIER, E.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; FESSI, H.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 97(3), p. 259-268, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>>. Acessado em: 01 dez. 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 22, p. 19-23, 1989.

COURA, J. R. & CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97(1), p. 3-24, 2002.

CROFT, S. L. The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, v. 114 (S3-15), 1997.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94(2), p. 215-220, 1999.

DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and Kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, v. 44, p. 880-891, 1988.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; TURRENS, J. F.; KATZIN, A. M.; GONZALEZ-CAPPA, S. M.; STOPPANI, A.O. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 3(3), p. 169-180, 1981.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.*, v. 73, p. 1-27, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4.Ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. Fr. Pat. 86.18.444, 1986.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, v. 81, p. 755-759, 1987.

FLORENCE A. T., ATTWOOD, D. Emulsões, Suspensões e Dispersões. In: _____. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, cap. 7, p. 345-411.

GONZÁLEZ-MARTÍN G., FIGUEROA C., MERINO I., OSUNA A. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomatropic carrier: preparation and trypanocidal activity. *Eur J Pharm Biopharm.* v. 49(2), p. 137-142, 2000.

GUEDES, P. M.; URBINA, J. A.; LANA, M.; AFONSO, L. C.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48(11), p. 4286-4292, 2004.

GUEDES, P. M. M.; FIETTO, J. L. R.; LANA, M.; BAHIA, M. T. Advancens in Chagas Disease Chemotherapy. *Antiinfective Agents in Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 2, p. 175-185, 2006.

GUTERRES, S.S., FESSI, H., BARRATT, G., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.*, v. 12(10), p. 1545-1547, 1995.

GRAF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, v. 263, n. 5153, p. 1600-1603, 1994.

ITO, C.; SHIBUTANI, Y.; SUGAWARA, T.; ASAOKA, T.; NAKANO, K.; OHNISHI, H.; KAWAOI, A. Toxicological studies of miconazole. I. Acute and subacute toxicity studies of miconazole in mice and rats. *Iyakuhi Kenkyu.* v. 7(3), p. 353-66, 1976.

KREUTER, J. Nanoparticles. In: _____. *Drugs and the Pharmaceut. Sci.* New York: Marcel Dekker Inc., 1994. v.66, cap. 5, p. 219-342.

LANA, M. & CHIARI, E. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-62 e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81(3), p. 247-253, 1986.

LANA, M.; CHIARI, C. A.; CHIARI, E.; MOREL, C. M.; GONÇALVES, A. M.; ROMANHA, A. J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol. Res.*, v. 82, p. 257-260, 1996.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.*, v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LAURENCIN C. T., ELGENDY H. The Biocompatibility and Toxicity of Degradable Polymeric Materials: Implications for Drug Delivery. In: DOMB, A. J. *Pol. Site-specific Pharm.* New York: John Wiley & Sons Ltda, 1994. cap. 2, p. 27-46.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sci.*, v. 9, p. 411-418, 1999.

LEITE, E. A. Nanocápsulas de poli-epsilon-caprolactona contendo halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo da cardiotoxicidade. 2006.144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

LEITE, E. A.; VILELA, J. M. C.; MOSQUEIRA, V. C. F.; ANDRADE, M. S. Poly-Caprolactone Nanocapsules Morphological Features by Atomic Force Microscopy. *Microsc. Microanalysis*, v.11 (supp 3), p. 48-51, 2005.

LEVY, M. Y & BENITA, S. Drug release from submicron O/W emulsion: a new *in vitro* kinetic evaluation model. *Int. J. Pharm.*, v. 66, p. 29-37. 1990.

LEVY, M. Y, POLACHECK, I, BARENHOLZ, Y., BENITA, S. Efficacy evaluation of a novel submicron miconazole emulsion in a murine Cryptococcosis model. *Pharm. Res.*, v. 12, p. 223-230. 1995.

LIENDO, A.; LAZARDI, K.; URBINA, J. A. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 41(2), p. 197-205, 1998.

LI, S.; PALMER, A. F. Structure of small actin-containing liposomes probed by atomic force microscopy: effect of actin concentration & liposome size. *Langmuir*, v. 20, n. 19, p. 7917-7925, 2004.

LUZ, Z. M.; COUTINHO, J. R.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, p. 143-148, 1994.

MAGALHÃES, N. S. S.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; SEILLER, M. An *in vitro* release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of clofibrade. *J. Microencapsulation*, v. 12, p. 195-205, 1995.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Size measurements. *Manual Number MAN 0149 Issue 2.0*. 2000.

McCABE, R. E.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32(5), p. 960-962, 1983.

McCABE, R. E., REMINGTON, J. S., ARAUJO, F. G. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. *J. Infect. Dis.*, v. 150(4), p. 594-601, 1984.

McCABE, R. E., REMINGTON J. S., ARAUJO, F. G. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 35(2), p. 280-284, 1986.

MILNE, G.W.A. In: _____. *Drugs: Synonyms & Properties*. 2 ed. Nova Iorque. Ashgate Inc. 2000.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activity of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, p. 150-155, 2000.

MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; URBINA, J. A. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 46(1), p. 137-40, 2000.

MOLINA J, URBINA J, GREF R, BRENER Z, RODRIGUES JÚNIOR JM. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 47(1), p. 101-104, 2001.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98(5), p. 577-591, 2003.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 54, n. 3, p. 281-284, 2002.

MOREIRA, A. A.; DE SOUZA, H. B.; AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; PINTO, P. L.; TOLEZANO, J. E.; NUNES, E.V.; OKUMURA, M. Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 34(2), p. 177-180, 1992.

MORILLA, M.J., MONTANARI, J.A., PRIETO, M.J., LOPEZ, M.O., PETRAY, P.B., ROMERO, E.L. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *Int. J. Pharm.*, v. 278(2), p. 311-318, 2004.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, p. 614-626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm. Res.*, v.18, n.10, p. 1411-1419, 2001.

MOSQUEIRA, V. C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 4, p. 1222-1228, 2004.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEITE, E. A.; BARROS, C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric Nanostructures For drug Delivery: Characterization By Atomic Force Microscopy. *Microscopy & Microanalysis*, v. 11, n.3, p. 36-39, 2005.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulation for parenteral delivery of halofantrine. *J. Nanosci. Nanotech.*, v.6, p. 1-10, 2006.

MURTA, S.M., GAZZINELLI, R.T., BRENER, Z., ROMANHA, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 93(2) p. 203-14, 1998.

NEVES, B. R. A.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica : uma introdução. *Cerâmica*, v.44, n.290, p. 212-219, 1998.

OWENS, III D. E. & PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 307, p. 93-102, 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Etiological treatment of Chagas disease. *Rev. Pat. Trop.*, v. 28, p. 247-279, 1998.

PARK, I. Y.; KIM, E. J.; PARK, H.; FIELDS, K.; DUNKER, A. K.; KANG, C. Interaction between cardiac calsequestrin and drugs with known cardiotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, v. 67, n. 1, p. 97-104, 2005.

POSPISIL J; POSTUPA J; OTCENASEK M; VEJBORA O. Pathogenicity of *Trichosporon capitatum* for normal and irradiated mice and the efficacy of miconazole on experimental systemic trichosporosis in mice. *Mycoses*, v. 33, n.11-12, p. 559-66, 1990.

RASSI, A. & LUQUETTI, A. O. Therapy of Chagas' disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E. & RASSI, A., (Eds) Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT BRAZIL São Paulo, Brazil*, p. 237-256, 1992.

RUBE, A.; HAUSE, G.; MADER, K.; KOHLBRECHER, J. Core-shell structure of Miglyol/poly(D,L-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *J. Control Release*, v. 107, n. 2, p. 244-252, 2005.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation sepectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur. J. Pharm. Sciences.*, v. 25, p. 81-89, 2005.

RUSSOMANDO, G.; DE TOMASSONE, M. M.; DE GUILLEN, I.; ACOSTA, N.; VERA, N.; ALMIRON, M.; CANDIA, N.; CALCENA, M. F.; FIGUEREDO, A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59(3), p. 487-491, 1998.

SÁNCHEZ, G., CUELLAR, D., ZULANTAY, I., GAJARDO, M., GONZÁLEZ-MARTIN, G. Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biol. Res. V.* 35(1), p. 39-45, 2002.

SANOJA, C., LIRA, R., PAYARES, G., URBINA, J. A. In vitro and in vivo activities of the triazole derivative BMS-207147 (ravuconazole) against *Trypanosoma cruzi* (Resumo). *Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: American Society for Microbiology, Toronto*, p. 513, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SCHIJMAN, A. G.; ALTICHEH, J.; BURGOS, J. M.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, M. J.; FREILIJ, H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 52(3), p. 441-449, 2003.

SILVEIRA, C. A.; CASTILLO, E.; CASTRO, C. Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33(2), p. 191-196, 2000.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59(4), p. 526-529, 1999.

STREIGER, M. L.; DEL BARCO, M. L.; FABBRO, D. L.; ARIAS, E. D.; AMICONE, N. A. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37(5), p. 365-375, 2004.

TAKINO, T., KONISHI, K., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 17(1), p. 121-125, 1994.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, v. 1; 31(5-6), p. 550-554, 2001.

TOLEDO, M. J. O.; GASPERI, M. V.; MARQUES DE ARAÚJO, S.; LANA, M. Berenice-62 e Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benznidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 201, 1995.

TOLEDO, M. J. O.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T.; TIBAYRENC, M., LANA, M. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Rev. Adv. In. Antimicrob. Agents & Chemother.*, v. 4, p.11-22, 2004.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*, v. 16; 273 (5277), p. 969-71, 1996.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L. M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42(7), p. 1771-7, 1998.

URBINA, J.A.; LIRA, R.; VISBAL, G.; BARTROLI, J. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44 (9), p. 2498-2502, 2000.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 14(6), p. 733-741, 2001.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, p. 287-295, 2002.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, v. 19(11), p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A. J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 21(1), p. 27-38, 2003a.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 21(1), p. 39-48, 2003b.

VELOSO, V.M., CARNEIRO, C.M., TOLEDO, M.J., LANA, M., CHIARI, E., TAFURI, W.L., BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 96(7), p. 1005-11, 2001.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.*, v. 127(1), p. 151-162, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Infectious Diseases Home Burdens and Trends (2005). Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)