

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO O EREMANTOLÍDEO C CONTRA O
PARASITO *T. CRUZI* “*IN VITRO*” E NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

DIEGO DIAS RAMOS DORIM

OURO PRETO

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Diego Dias Ramos Dorim

AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO O EREMANTOLÍDEO C CONTRA O
PARASITO *T. CRUZI* “*IN VITRO*” E NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Bahia

Ouro Preto

2010

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof^a. Dr^a. Marta de Lana

Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, UFOP.

Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, UFOP.

Prof^a. Dr^a. Eunice Kazue Kano

Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, USP.

Prof^o. Dr^o. José Mário Carneiro Vilela

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG.

“Dedico este trabalho àqueles que sempre me compreenderam, apoiaram, incentivaram, e respeitaram, sendo os grandes responsáveis por mais essa importante vitória em minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir a vida e assim dar oportunidade de concluir esse trabalho;

Aos meus pais, Dorim e Ana Lúcia, pelo amor, atenção e por não medirem esforços para que eu pudesse permanecer em Ouro Preto;

Ao meu irmão, Dudu, por todo companheirismo e preocupação;

A minha namorada, Lú, pelo amor, pela paciência, companheirismo e incentivo para que eu não desistisse;

A minha orientadora, Vanessa, por todos os ensinamentos, disponibilidade, determinação e convivência;

A prof^a Terezinha Bahia por toda assistência e incentivo;

A Cristina, Elaine, Poly, Carina, Raquel, Liliam, Giani e outros amigos que passaram pelo LDGnano, pela ajuda e bons momentos no laboratório;

A Vanja, Paulo, Ricardo e Jaqueline pelos ensinamentos práticos no biotério e no laboratório de doença de Chagas;

A todos que contribuíram na parte prática no biotério;

Aos funcionários da Escola de Farmácia e do Biotério Central da UFOP;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação;

Aos amigos da República Partenon pela acolhida em Ouro Preto;

Aos colegas de mestrado;

A todas as outras pessoas que com críticas, sugestões e elogios contribuíram de forma direta ou indireta para conclusão deste trabalho.

RESUMO

Neste estudo o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada do eremantolídeo C (EREC) foi realizado visando o estudo de sua atividade contra o *Trypanosoma cruzi*. O EREC é uma substância lipofílica isolada de *Lychnophora trichocarpha* Spreng previamente testada *in vitro* contra este parasito. Para a obtenção de nanocápsulas poliméricas contendo um núcleo oleoso para carreamento do EREC utilizou-se o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado. Nanocápsulas de poly- ϵ -caprolactona (PCL) com diâmetro médio de $194,63 \pm 2,83$ nm e porcentagem de encapsulação de $82,59 \pm 2,40\%$ foram obtidas, confirmando a afinidade entre EREC e núcleo oleoso. Foram ainda desenvolvidos e validados dois métodos de quantificação usando CLAE com detector de arranjos de diiodo (DAD) e espectrofotometria no UV para quantificação do EREC a 265nm em formas farmacêuticas nanoestruturadas. A técnica de CLAE permitiu a quantificação do EREC até o limite de quantificação (LOQ) de $1\mu\text{g/mL}$ e a de espectrofotometria com o (LOQ) de $5\mu\text{g/mL}$. Estudos de liberação mostraram uma liberação prolongada e reduzida do EREC a partir das nanocápsulas com quantidade liberada inferior a 75% em 48 horas, enquanto a quantidade dissolvida da substância livre foi superior a 93% em 12 horas. Uma metodologia para determinação da atividade *in vitro* contra as formas epimastigotas do parasito foi otimizada e validada usando adaptação do método de MTT que demonstrou ser preciso e exato e rápido para o *screening* de novas substâncias, potencialmente ativas contra parasitos da família Trypanosomatidae. Nos estudos *in vitro*, foi verificado um efeito dose-dependente tanto para o EREC livre quanto nanoencapsulado entre as concentrações de 10-100 $\mu\text{g/mL}$, sendo observada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ uma inibição do crescimento dos parasitos próximo de 100%. Os estudos *in vivo* mostraram ser a via oral inadequada para administração de EREC livre ou em nanocápsulas, uma vez que não se observou atividade sobre os parasitos na concentração de 500mg/Kg. A administração do EREC livre ou nanoencapsulado por via intravenosa (10mg/mL) reduziu significativamente a parasitemia e aumentou a sobrevivência dos animais infectados, mas não foi tão eficiente como o benznidazol pela mesma via. Os dados sugerem que doses maiores de EREC possam ser administradas na forma nanoencapsulada com potencial aumento de eficácia em relação ao esquema terapêutico utilizado neste estudo.

ABSTRACT

In the present study, a nanostructured formulation of Eremantholide C (EREC) was developed in order to study its activity against *Trypanosoma cruzi*. EREC is a lipophilic drug extracted and isolated from *Lychnophore trichocarpha* Spreng and that was previously tested *in vitro* against this parasite. To prepare polymeric nanocapsules with an oily core to carry EREC, the interfacial polymer deposition following solvent displacement method was used. Nanocapsules of poly- ϵ -caprolactone (PCL) with mean diameter of $194,63 \pm 2,83$ nm and entrapment % of $82,59 \pm 2,40$ were obtained, confirming the affinity between EREC and oily core of nanocapsules. Two methods of EREC assay were developed and validated using HPLC with DAD detection and UV-spectrophotometry at 265nm with nanocarrier matrices. The HPLC technique allows the EREC quantification up to $1\mu\text{g/mL}$ and UV-spectrophotometry up to $5\mu\text{g/mL}$. Release kinetic studies showed a prolonged and reduced release of EREC from nanocapsules with less than 75% released in 48 hours while free EREC showed 93% of dissolution in 12 hours. A methodology for determination of *in vitro* activity against epimastigotes forms of the parasite was optimized and validated using an adaptation of MTT method. This method proved to be specific, accurate and precise to screening new potential compounds active against *T. cruzi* and other parasites of Trypanosomatidae family. In these studies, free EREC and EREC-loaded nanocapsules showed dose-dependent activity in the range of 10-100 $\mu\text{g/mL}$. At 100 $\mu\text{g/mL}$ dose 100% of parasite growth inhibition was reached. *In vivo* studies indicate that even at 500mg/Kg administrated by oral route, the EREC dose was not enough to induce parasitemia reduction and survival increase in both forms of EREC formulation. By endovenous route, a 10mg/Kg dose of EREC free and loaded in nanocapsules showed a significant reduction on parasitemia and survival increase when compared with non treated group. However, benznidazol administered by the same route was more effective. The results suggest that EREC higher doses could be administered by intravenous route in the encapsulated form with potential to increase efficacy compared to the treatment schedule used in this work.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> _____	5
Figura 2. Representação da estrutura química do NFX (a) e BZ (b). _____	8
Figura 3. Mecanismo de metabolização e ação do BZ. _____	10
Figura 4. Estrutura química das lactonas sesquiterpênicas. _____	13
Figura 5. Fórmula estrutural do EREC (C ₁₉ H ₂₂ O ₆). _____	14
Figura 6. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: A: fármaco dissolvido no núcleo oleoso; B: fármaco adsorvido na parede polimérica. _____	16
Figura 7. Espectro UV de uma amostra de EREC na concentração de 50µg/mL em acetonitrila. _____	26
Figura 8. Cromatograma obtido para amostra de EREC na concentração de 50µg/mL. _____	27
Figura 9. Cromatograma obtido na análise da especificidade do EREC por CLAE. _____	28
Figura 10. Representação do processo de preparação das nanocápsulas. _____	37
Figura 11. Perfil de dissolução/liberação in vitro, a 37°C, de EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 1mg/mL em meio PBS em condição sink (10% da solubilidade máxima do EREC no meio). _____	46
Figura 12. Imagens das nanocápsulas obtidas por MFA. (A) Nanocápsulas brancas; (B) Nanocápsulas contendo EREC. Área de 2,0µm x 2,0µm. _____	47
Figura 13. Avaliação da relação diâmetro/altura das nanocápsulas brancas e nanocápsulas contendo EREC. (A) Nanocápsulas brancas; (B) Nanocápsulas contendo EREC. _____	48
Figura 14. Cinética de crescimento das formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> in vitro. _____	58
Figura 15. Curva de calibração para padronização e validação da metodologia do MTT. _____	59
Figura 16. Comparação entre metodologia da câmara de Neubauer e MTT. _____	61
Figura 17. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> in vitro do Eremantólídeo C, livre ou nanoencapsulado, utilizando as formas epimastigotas da cepa Y. _____	70
Figura 18. Comparação entre a inibição do crescimento das formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> in vitro quando tratadas com diferentes concentrações de Eremantólídeo C livre ou nanoencapsulado. _____	71
Figura 19. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via oral com 500mg/Kg de BZ, ITR, EREC livre ou nanoencapsulado. _____	72
Figura 20. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via oral com 500mg/Kg de BZ, ITR, EREC livre ou nanoencapsulado. _____	73
Figura 21. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com diferentes concentrações de BZ por 10 dias. _____	75
Figura 22. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com diferentes concentrações de BZ por 10 dias. _____	75
Figura 23. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com Eremantólídeo c livre ou nanoencapsulado na concentração de	

10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _____	77
Figura 24. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _____	78
Figura 25. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _	80
Figura 26. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _____	80
Figura 27. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa com 10mg/Kg/dia, por 10 dias, com EREC livre ou nanoencapsulado. _____	82
Figura 28. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa com 10mg/Kg/dia, por 10 dias, com EREC livre ou nanoencapsulado. _____	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Busca racional de novos fármacos contra o <i>T. cruzi</i> . _____	11
Tabela 2. Compostos da família Asteraceae ativos, in vitro, contra o <i>T. cruzi</i> . _____	13
Tabela 3. Linearidade obtida para o EREC por CLAE. _____	28
Tabela 4. Linearidade obtida para o EREC por espectrofotometria. _____	29
Tabela 5. Sumário dos dados de linearidade obtidos para o EREC por espectrofotometria e CLAE. _____	29
Tabela 6. Precisão intra-dia para quantificação do EREC por CLAE. _____	30
Tabela 7. Precisão inter-dia para quantificação do EREC por CLAE. _____	30
Tabela 8. Precisão intra-dia para quantificação do EREC por espectrofotometria. _____	30
Tabela 9. Precisão inter-dia para quantificação do EREC por espectrofotometria. _____	31
Tabela 10. Sumário dos resultados de precisão e exatidão dos métodos avaliados para quantificação do EREC. _____	31
Tabela 11. Determinação do LOD e LOQ para quantificação do EREC. _____	32
Tabela 12. Análise do tamanho e potencial zeta de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de EREC. _____	44
Tabela 13. Modelização da dissolução e liberação do EREC. _____	46
Tabela 14. Linearidade metodologia do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> . _____	59
Tabela 15. Especificidade da metodologia de do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> . _____	60
Tabela 16. Precisão e exatidão da metodologia do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> . _____	60
Tabela 17. Dados dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com 500mg.kg ⁻¹ BZ, itraconazol, EREC livre ou nanoencapsulado. _____	73
Tabela 18. Dados da sobrevivência dos animais infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com 500mg.kg ⁻¹ BZ, itraconazol, EREC livre ou nanoencapsulado por via oral em dose única. _____	74
Tabela 19. Dados dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com BZ, por via endovenosa durante 10 dias, em diferentes concentrações. O tratamento foi iniciado no 1º dia após a infecção. _____	76
Tabela 20. Dados da sobrevivência dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados, por via endovenosa durante 10 dias, com BZ em diferentes concentrações. O tratamento foi iniciado no 1º dia após a infecção. _____	76
Tabela 21. Dados dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos por via endovenosa. _____	78
Tabela 22. Dados de sobrevivência dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos por via endovenosa. _____	79
Tabela 23. Dados dos animais infectados com 1x10 ⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _____	81

Tabela 24. Dados da sobrevivência dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de T. cruzi, tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos. _____ 82

Tabela 25. Dados dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de T. cruzi, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa por 10 dias com 10mg/Kg/dia com EREC livre ou nanoencapsulado. _____ 83

Tabela 26. Dados da sobrevivência dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de T. cruzi, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa por 10 dias com 10mg/Kg/dia com EREC livre ou nanoencapsulado. _____ 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = por cento ou porcentagem

°C = graus Celsius

AUC = área sob a curva

ALD = anemometria do laser Doppler

BZ = benznidazol

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CV = coeficiente de variação

cm = centímetros

Da = Dalton

DMA = N,N-dimetil-acetamida

DMSO = dimetilsulfóxido

EREC = eremantolídeo C

HCl = ácido clorídrico

ITZ = itraconazol

IV = via endovenosa

g = grama

KCl = cloreto de potássio

Kg = quilograma

LIT = *Liver infusion tryptose*

log *P* = Coeficiente de partição octanol/água

MCZ = miconazol

MFA = microscopia de força atômica

µg = micrograma

µg/mL = micrograma por mililitro

mg = miligrama

mg/mL = miligrama por mililitro

mg/Kg/dia = miligramas por quilograma por dia

mL/min = mililitro por minuto

min = minutos

mL = mililitro

μ L = microlitro

μ m = micrômetro

Na₂PO₄ = fosfato de sódio

NC = Nanocápsulas

NFX = nifurtimox

nm = nanômetros

PBS = meio tampão fosfato

PCL = poli- ϵ -caprolactona

PCS = espectrometria de correlação fotônica

PEG = polietilenoglicol

pH = potencial hidrogeniônico

PLA = ácido poli-*D-L*-(lático)

PLGA = ácido poli (lático-co-glicólico)

p/v = peso por volume

rpm = rotações por minuto

T. cruzi = *Trypanosoma cruzi*

TGI = trato gastrointestinal

UV = ultravioleta

VO = via oral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DA LITERATURA	4
A DOENÇA DE CHAGAS E O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS	8
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PROVENIENTES DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI- <i>T. CRUZI</i>	12
SISTEMAS VETORIZADOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	15
OBJETIVOS	19
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPITULO 1	21
1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO EREC	22
1.1 MATERIAIS E MÉTODOS	22
1.1.1 MATERIAIS	22
1.1.2 PREPARO DE SOLUÇÕES E SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	22
1.1.3 INSTRUMENTOS E CONDIÇÕES ANALÍTICAS	23
1.1.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO EREC	23
1.1.4.1 ESPECIFICIDADE	23
1.1.4.2 LINEARIDADE	24
1.1.4.3 PRECISÃO	24
1.1.4.4 EXATIDÃO	24
1.1.4.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	25
1.2 RESULTADOS	26
1.2.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS	26
1.2.1.1 ESPECIFICIDADE	27
1.2.1.2 LINEARIDADE	28

1.2.1.3	PRECISÃO E EXATIDÃO	30
1.2.2	LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	32
1.3	DISCUSSÃO	33
CAPÍTULO 2		35
<hr/>		
2	PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO O EREMANTOLÍDEO C	36
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1.1	MATERIAIS	36
2.1.2	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS	37
2.1.3	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BZ E ITRACONAZOL	37
2.1.4	SOLUÇÕES E SUSPENSÕES PARA USO EXPERIMENTAL	38
2.1.5	ANÁLISE DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA (z) DAS PARTÍCULAS	40
2.1.6	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM E DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	40
2.1.7	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO EREC EM PBS	41
2.1.8	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO EREC	42
2.1.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS NANOCÁPSULAS	42
2.2	RESULTADOS	44
2.2.1	ANÁLISE DA PUREZA DO BZ, ITRACONAZOL E MICONAZOL	44
2.2.2	ANÁLISE DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA (z) DAS PARTÍCULAS	44
2.2.3	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	45
2.2.4	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO EREC EM PBS	45
2.2.5	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO EREC	45
2.2.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS NANOCÁPSULAS	47
2.3	DISCUSSÃO	49
CAPÍTULO 3		52
<hr/>		
3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DO MTT PARA <i>SCREENING</i> DE NOVOS FÁRMACOS E DE NOVAS FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS	53
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1.1	MATERIAIS	53
3.1.2	PREPARAÇÃO DO MEIO “LIVER INFUSION TRYPTOSE” (LIT)	53
3.1.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA O TESTE DO MTT	54

3.1.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> IN VITRO	54
3.1.5	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DO MTT	55
3.1.6	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DO MTT	56
3.2	RESULTADOS	58
3.2.1	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> IN VITRO	58
3.2.2	PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DO MTT	59
3.3	DISCUSSÃO	62
CAPÍTULO 4		64
<hr/>		
4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANTOLÍDEO <i>C</i> IN VITRO E NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL	65
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANTOLÍDEO <i>C</i> IN VITRO	65
4.1.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANTOLÍDEO <i>C</i> IN VIVO	66
4.1.2.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	66
4.1.2.2	INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS	67
4.1.2.3	SUBSTÂNCIAS E DROGAS UTILIZADAS	67
4.1.2.4	TRATAMENTO POR VIA ORAL	67
4.1.3	TRATAMENTO POR VIA ENDOVENOSA	68
4.1.3.1	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS	68
4.2	RESULTADOS	70
4.2.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANTOLÍDEO <i>C</i> IN VITRO	70
4.2.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANTOLÍDEO <i>C</i> IN VIVO	72
4.2.2.1	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO POR VIA ORAL	72
4.2.2.2	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO UTILIZANDO BZ VIA ENDOVENOSA	74
4.2.3	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO UTILIZANDO O EREC VIA ENDOVENOSA	77
4.2.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS POR VIA ENDOVENOSA COM BZ E EREC	79
4.2.5	COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS COM EREMANTOLÍDEO <i>C</i> POR VIA ORAL E ENDOVENOSA	82
4.3	DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO		88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		90

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) afeta aproximadamente 8-10 milhões de pessoas nas Américas do Sul e Central (WHO, 2009) constituindo um sério problema de saúde pública. Devido ao desinteresse das indústrias farmacêuticas na busca de novos fármacos para o tratamento da doença, esta parasitose foi incluída pela OMS na lista de doenças negligenciadas (TROUILLER *et al.*, 2002).

Atualmente, o único fármaco disponível comercialmente no Brasil para o tratamento da doença de Chagas é o Benznidazol (BZ) (Rochagan®) que teve sua patente recentemente transferida da empresa ROCHE para a LAPEFE em Pernambuco. Várias triagens clínicas, realizadas em diferentes países, têm demonstrado resultados contraditórios em relação à eficácia do tratamento de indivíduos chagásico com BZ (ANDRADE *et al.*, 1992; VIOTTI *et al.*, 1994; RUSSOMANDO *et al.*, 1998; BLANCO *et al.*, 2000; BOTTIEAU *et al.*, 2002; CANÇADO, 2002; ANDRADE *et al.*, 2004), podendo esta diferença estar relacionada com a área geográfica devido às diferenças na variabilidade genética das diferentes cepas de *T. cruzi* (VELOSO *et al.*, 2001). Entretanto, a maioria das triagens clínicas demonstra que o BZ é eficiente no tratamento da transmissão congênita, fase aguda, e no tratamento de crianças e adolescentes (CANÇADO, 2002; SCHIJMAN *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004). No entanto, foi demonstrado que em duas diferentes regiões na Bolívia, o tratamento em crianças não foi eficaz (YUN *et al.*, 2009).

Por outro lado, a maior limitação do tratamento com o BZ é a sua baixa atividade durante a fase crônica da infecção (GUEDES *et al.*, 2006). O objetivo do tratamento é 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; CROFT *et al.*, 2005). Diante das controvérsias acerca da quimioterapia atual da doença de Chagas (URBINA, J. A. e DOCAMPO, R., 2003) e, do maior conhecimento sobre a bioquímica básica do *T. cruzi*, que tem levado à identificação de novos alvos para quimioterapia da doença de Chagas, a busca racional por novos fármacos vem se

intensificando e visa obter novas substâncias com maior eficácia terapêutica na fase aguda e crônica da doença, além de menor toxicidade para o paciente (ROMERO *et al.*, 2009). Associado a estas moléculas estão os estudos envolvendo os produtos naturais com potencial atividade anti-*T. cruzi*, como o eremantolídeo C (EREC) (CHIARI *et al.*, 1991; CHIARI *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Assim, visando obter uma maior atividade para fármacos contra o *T. cruzi* com doses e efeitos colaterais reduzidos, uma opção tecnológica seria a vetorização destas substâncias em sistemas nanométricos para administração parenteral (ROMERO *et al.*, 2009).

Diante disso, visando obter uma maior atividade contra o *T. cruzi* e reduzir potenciais efeitos adversos, a vetorização do EREC em sistemas nanoestruturados do tipo nanocápsulas (NC) foi uma alternativa investigada, no presente trabalho, *in vitro* e em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*. A expectativa é de que a encapsulação dessa substância no núcleo oleoso das NC possa reduzir a toxicidade do mesmo para tecidos vitais do hospedeiro, e por outro lado, aumentar a seletividade para células hospedeiras contendo o parasito, melhorando a eficácia no tratamento da doença, como já demonstrado em outros sistemas (YOSHIHARA *et al.*, 1987; URBINA *et al.*, 1988; BARRATT, 2000; MOLINA *et al.*, 2001; MORILLA *et al.*, 2004; MORILLA *et al.*, 2005). 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 administração e o número de doses.

Neste contexto, o presente trabalho trata do desenvolvimento farmacotécnico e da caracterização físico-química de formulações nanoestruturadas contendo EREC, uma substância de origem vegetal, com atividade anti-*T. cruzi*, além da avaliação biológica dessas preparações *in vitro*, em cultura acelular de epimastigotas de *T. cruzi*, e *in vivo* contra a doença de Chagas experimental.

REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas, uma enfermidade causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parasito da família Trypanosomatidae pertencente à ordem Kinetoplastida vem afetando a sociedade à muito tempo, mesmo antes da descoberta do continente americano, como foi demonstrado em estudos paleoepidemiológico (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Atualmente é endêmica nas Américas do Sul e Central, locais onde se encontram cerca de 8-10 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2009) e gera um gasto de aproximadamente 6,5 bilhões de dólares/ano para os governos da região (WHO, 1997). A falta de interesse das indústrias farmacêuticas e a ausência das políticas sociais para a doença de Chagas são os grandes responsáveis pela limitada busca por novos fármacos contra a doença (TROUILLER *et al.*, 2002) que afeta, principalmente, as populações de baixa renda da América Latina (BEYRER *et al.*, 2006).

O ciclo de vida do *T. cruzi* foi primariamente descrito pelo brasileiro Dr. Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) e está representado na Figura 1.

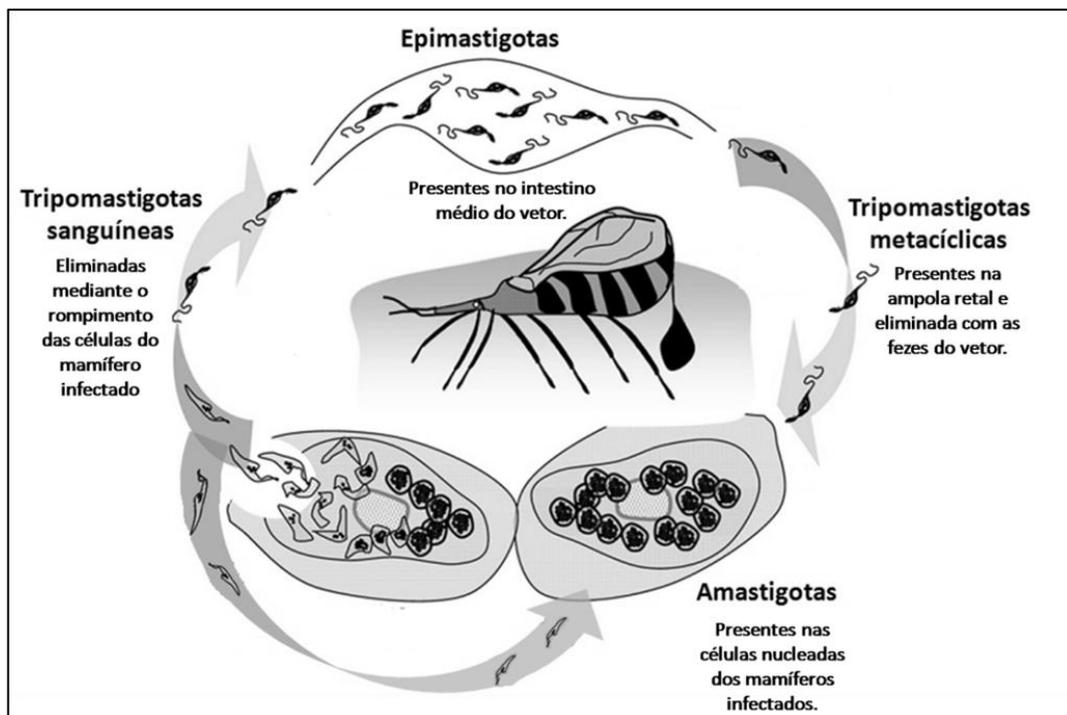


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*

Fonte: Adaptado de Romero (ROMERO *et al.*, 2009).

Pode-se observar um ciclo de vida complexo com formas infectantes para o inseto

vetor e para os hospedeiros vertebrados. No vetor, o parasito prolifera no lúmen do intestino médio na forma epimastigotas que se diferenciam, na ampola retal, na forma tripomastigota metacíclica que são descarregadas juntamente com as fezes do vetor no momento da picada. Ao picar um mamífero e eliminar suas fezes, através da lesão na pele ou contato com mucosas, as tripomastigotas alcançam a circulação sanguínea e invadem as células, principalmente, muscular do coração, do esôfago e do sistema retículo endotelial. No interior dessas células elas se diferenciam em formas amastigotas, aflageladas, que proliferam por divisão binária e se agrupam formando os ninhos de amastigotas no interior dos tecidos afetados. Essas formas, posteriormente, sofrem uma diferenciação para a forma tripomastigota sanguínea que levam a lise celular para atingirem novamente a circulação sanguínea e, a partir daí, invadirem novas células nucleadas ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo (CHAGAS, 1909; BRENER, 1973; PINTO *et al.*, 1999; NEVES, 2005).

A principal forma de transmissão da doença para o homem é através das fezes contaminadas do inseto vetor (>80%) (ROMERO *et al.*, 2009) pertencente à subfamília *Triatominae* (*Hemiptera:Revuduviiidae*) que apresenta 130 espécies potencialmente capazes de transmissão. Entretanto, na transmissão da doença humana existem 12 espécies de maior importância (LENT *et al.*, 1979; SCHOFIELD *et al.*, 2009). No Brasil, a doença humana é transmitida principalmente pelas espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (MONCAYO *et al.*, 2006). Além da infecção pelo triatomíneo, outras formas de infecção (MONCAYO *et al.*, 2006) são através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (15%) (LEIBY *et al.*, 2002; LEIBY *et al.*, 2008), transplacentária (4%) e por via oral através de alimentos contaminados (<1%) (ROMERO *et al.*, 2009), sendo que esta última vem tendo maior destaque nos últimos anos pelos recentes acontecimentos envolvendo o consumo do suco extraído da cana-de-açúcar e do açaí que apresentaram contaminação com o *T.cruzi* (PEREIRA *et al.*, 2009).

Os sinais iniciais da doença de Chagas são observados em um número restrito de indivíduos e podem ocorrer no próprio lugar onde se deu a contaminação (chagoma de inoculação) ou nas mucosas oculares (sinal de Romanã), sendo esta caracterizada por edema bipalbebral, unilateral, violáceo e indolor. Estes sinais surgem mais ou menos de 4 a 6 dias após o contato do triatomíneo com hospedeiro definitivo. Os parasitos eliminados pelo

triatomíneo irão invadir os tecidos da região picada onde será iniciado um processo inflamatório (MONCAYO *et al.*, 2006). Essas lesões iniciais quase sempre se fazem acompanhar de linfadenopatias nas regiões próximas do local de contaminação.

A doença apresenta uma fase aguda e uma fase crônica. Na fase aguda, quando sintomática, a febre é um dos sintomas mais frequentes. Trata-se de febre baixa e contínua, com duração prolongada (semanas). O "mal estar", a falta de apetite, taquicardia, hepato e esplenomegalia, edemas na face e no corpo, vão aparecendo alguns dias após a penetração do parasito e complementa, em seu conjunto, o quadro que indica sua disseminação pelo organismo (MONCAYO *et al.*, 2006; GUTIERREZ *et al.*, 2009). É importante notar que o quadro assim descrito é muito mais comum em crianças, especialmente as mais jovens (1 a 5 anos) em que a taxa de mortalidade nesta fase da doença pode chegar a 8% (RODRIGUES COURA *et al.*, 2002).

Em adultos, geralmente, esses sinais ficam muito atenuados e a fase inicial da doença passa despercebida, confundindo-se com uma "gripe" ou "mal estar" passageiro. Essa fase dura, em geral, algumas semanas, tendendo a febre e os demais sintomas ao desaparecimento espontâneo. Em certos casos graves, sobretudo em crianças, pode sobrevir a morte em consequência de um ataque dos parasitos aos órgãos e tecidos mais nobres do corpo, como o coração e o sistema nervoso central (PELLEGRINO, 1953; SUCAM, 1989; NEVES, 2005; MONCAYO *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006; GUTIERREZ *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2009).

A fase aguda é seguida por uma infecção crônica na qual os parasitos raramente são detectados através dos métodos parasitológicos convencionais. Os pacientes permanecem assintomáticos e, aproximadamente, 70-85% das pessoas infectadas persistem nesse estado, conhecido como forma indeterminada da doença de Chagas crônica, para o resto das suas vidas (BARRETT, 2003). Porém, a evolução da forma indeterminada para uma das formas clínicas da doença de Chagas crônica é outra possibilidade muito frequente; isto geralmente acontece 10-20 anos após a fase aguda, de forma lenta e progressiva (TARLETON, 2003), e 15-30% dos indivíduos infectados apresentam órgãos lesados, produzindo as formas cardíacas e/ou digestivas da doença crônica. A condição clínica de maior importância é a cardiomiopatia chagásica que pode levar a quadros de arritmia, aneurismas ventriculares, falência cardíaca, tromboembolismo e até mesmo morte súbita (BESTETTI *et al.*, 1987;

DAVILA *et al.*, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2007). A cardiomiopatia chagásica pode ser facilmente identificada através de exames de eletrocardiograma. A forma digestiva (megaesôfago e megacólon) é detectada em 5-10% dos pacientes infectados e levam a uma dificuldade de deglutição e defecação, respectivamente (PRATA, 2001; NEVES, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Quimioterapia da doença de Chagas

Desde 1912, três anos após a descoberta da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), os estudos em busca do tratamento dessa doença foram se intensificando. No entanto, não se encontrou até o momento um esquema terapêutico que seja efetivo tanto na fase aguda quanto na fase crônica.

A quimioterapia atual baseia-se no uso do Nifurtimox (NFX) Figura 2 (a), 5-nitrofurano [3-metil-4-(5'-nitrofurfuridano-amina) tetraidro-4H-1,4-tiazina 1,1-dioxido (Lampit[®], Bayer), fármaco da classe dos nitrofuranos e do Benznidazol (BZ) Figura 2 (b), 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-acetamida (Rochagan[®]), pertencente à classe dos nitroimidazóis.

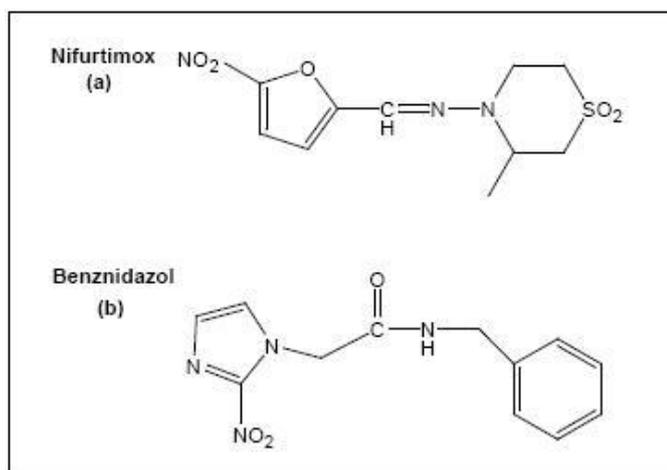


Figura 2. Representação da estrutura química do NFX (a) e BZ (b).

Uma importante consideração a ser feita sobre a quimioterapia da doença utilizando estes dois compostos é que sua eficácia terapêutica é melhor sobre formas infectantes extracelulares do que sobre as formas intracelulares predominantes na fase crônica da

doença (CASTRO, 2000; PINTO, 2003; URBINA, J.A. *et al.*, 2003; NEVES, 2005). Além disso, essa eficácia terapêutica é variável em pacientes oriundos de diferentes áreas geográficas, provavelmente pelas diferentes respostas que cada diferente cepa de *T. cruzi* apresenta aos fármacos de escolha, à variabilidade da sensibilidade ao Bz em diferentes regiões e à variabilidade genética do parasito (VELOSO *et al.*, 2001; COURA *et al.*, 2002; URBINA, J. A. e DOCAMPO, R., 2003). Dentre as cepas existentes pode-se citar a Berenice-78 como susceptível, cepa Y parcialmente resistente e cepa Colombina resistente, levando em consideração o BZ como fármaco de escolha (MURTA *et al.*, 1998; VELOSO *et al.*, 2001).

O NFX, comercializado sob o nome de Lampit® teve sua produção descontinuada na década de 80, no entanto, atualmente, é produzido e empregado predominantemente na América Central (COURA, 2009).

O Benznidazol (Rochagan®) é no momento o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da doença de Chagas. Experimentalmente, este fármaco, apresenta alto nível de atividade, *in vitro e in vivo*, contra o *T. cruzi* (BRENER, 1968; RICHLE, 1973). Clinicamente, o BZ apresenta um regime terapêutico contra a doença de Chagas de 5-10mg/Kg/dia, divididos em 2-3 doses diária por 30-60 dias (BRENER, 1968; RAAFLAUB *et al.*, 1979; COURA *et al.*, 1997; BARRETT, 2003; RAETHER *et al.*, 2003). Dessa forma tentam-se obter uma alta concentração plasmática do fármaco a fim de eliminar as formas tripomastigotas sanguíneas circulantes no paciente, impedindo assim a invasão de novas células. Assim, o BZ apresenta eficácia no tratamento da fase aguda da doença de Chagas, com índices de cura parasitológica em adultos variando entre 40-76%, como demonstrado em trabalhos com cães (GUEDES *et al.*, 2006).

Os principais efeitos colaterais observados durante o tratamento com BZ são de hipersensibilidade (dermatites, edema generalizado, infarto ganglionar, dores musculares e nas articulações), depleção da medula óssea (trombocitopenia púrpura e agranulocitose) e polineuropatias periféricas. Estes efeitos colaterais podem ser controlados com administração de anti-histamínicos, corticosteroides e, em casos mais graves de agranulocitose, trombocitopenia púrpura ou síndrome de Stevens-Johnson, com a suspensão do tratamento (CROFT, 1997; CASTRO *et al.*, 2006). Esses fatores são grandemente responsáveis pelo abandono da terapia por 20-30% dos pacientes (CROFT, 1997; MURTA *et al.*, 1998).

O NFX e o BZ envolvem em seu mecanismo de ação a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO_2) dos fármacos é reduzido a um grupo amina pela ação de enzimas nitroredutases, expressas pelo parasito, levando a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos (MORENO *et al.*, 1982; MAYA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2006). O mecanismo de ação do BZ, de acordo com a literatura (POLAK *et al.*, 1978; DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; MORELLO, 1988), está representado na Figura 3.

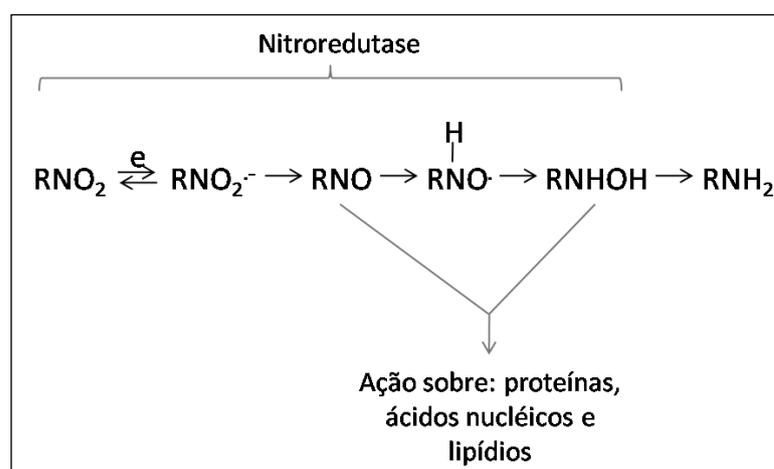


Figura 3. Mecanismo de metabolização e ação do BZ.

Diante de todas as limitações e controvérsias acerca da quimioterapia atual da doença de Chagas e, a cada dia, um maior conhecimento sobre a bioquímica do *T. cruzi*, a busca racional por novos fármacos vem se intensificando. Assim, novos estudos visam obter substâncias com maior eficácia terapêutica na fase aguda e crônica da doença, além de menor toxicidade para o paciente.

Dentre essas novas alternativas terapêuticas encontram-se substâncias que atuam inibindo a síntese de ergosterol, uma vez que análises dos componentes de membrana do parasito demonstraram a presença dessa substância (FURLONG, 1989). A avaliação pré-clínica e clínica desses compostos, dentre elas os triazóis (fluconazol, itraconazol) (ROBERTS, 2003; URBINA, J. A. e DOCAMPO, R., 2003; URBINA, 2009), imidazóis (miconazol, cetoconazol) (BUCKNER, 2003; HUCKE, 2005; LEPESHEVA, 2007; KRAUS, 2009; SURYADEVARA, 2009), derivados azólicos (posaconazol), indometacina amidas (KONKLE, 2009) e novas moléculas baseadas no composto N-[4-piridil]-formamida (CHEN, 2009; MCKERROW, 2009) atuam inibindo a enzima c-14- α -demetilase (CYP51) (WILKINSON *et al.*,

2009), envolvida na biossíntese do ergosterol. Além destas, os compostos alopurinol e os bisfosfonatos foram estudados pela capacidade de ação como substrato alternativo do sistema hipoxantina-guanidina fosforil transferase (MARR *et al.*, 1978; MARR *et al.*, 1984) e inibindo enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas, como a farnesil-pirofosfato sintase, esqualeno sintase ou bombas de prótons (DOCAMPO, 2001; DOCAMPO *et al.*, 2001), respectivamente. No entanto, estudos feitos posteriormente demonstraram ser o alopurinol ineficaz durante a fase aguda da doença (LAURIA-PIRES *et al.*, 1998). Os principais alvos e fármacos pesquisados como alternativas para o tratamento da doença de Chagas estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Busca racional de novos fármacos contra o *T. cruzi*.

Mecanismo geral	Alvo específico	Substância	Referência bibliográfica	
Metabolismo reductivo	Síntese e metabolismo da tripanotona	Tioridazina	(RIVAROLA <i>et al.</i> , 1999; LO PRESTI <i>et al.</i> , 2004)	
		Itraconazol	(APT <i>et al.</i> , 2003)	
Inibidor da biossíntese de ergosterol	14- α -desmetilase	Posaconazol	(MOLINA, MARTINS-FILHO <i>et al.</i> , 2000)	
		D0870	(URBINA <i>et al.</i> , 1996; MOLINA, BRENER <i>et al.</i> , 2000)	
		UR-9825	(URBINA <i>et al.</i> , 2000)	
	Esqualeno sintetase	Óxido de esqualeno sintase	TAK-187	(URBINA, J. A., PAYARES, G., SANOJA, C., MOLINA, J. <i>et al.</i> , 2003; CORRALES <i>et al.</i> , 2005)
			Ravuconazol	(URBINA, J. A., PAYARES, G., SANOJA, C., LIRA, R. <i>et al.</i> , 2003)
			E5700 e ER-119884	(URBINA <i>et al.</i> , 2004)
			Inibidores OSC	(BUCKNER <i>et al.</i> , 2001)
Amiodarona			(ROSENBAUM <i>et al.</i> , 1983)	
Inibidores da sisteina protease	-	K-777	(ENGEL <i>et al.</i> , 1998)	

Inibidores do metabolismo de pirofosfato	Farnesilpirofosfato sintase	Residronato Pamidronato Ibandronato	(GARZONI <i>et al.</i> , 2004) (DOCAMPO <i>et al.</i> , 2001)
Inibidores de purina	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase	Allopurinol	(APT <i>et al.</i> , 2003; RASSI <i>et al.</i> , 2007)

Fonte: Adaptado de (ROMERO *et al.*, 2009).

Além das supracitadas moléculas, outros estudos envolvendo produtos naturais com potencial atividade anti-*T. cruzi*, de diversas classes como as quinonas, os flavonóides, os alcalóides, os terpenos entre outros serão apresentados a seguir.

Potencial de utilização de substâncias provenientes de produtos naturais com atividade anti-*T. cruzi*

Uma revisão na literatura permite descrever uma série de substâncias de origem vegetal com potencial atividade anti-*T. cruzi* (KAYSER *et al.*, 2003; SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 2007). Dentre estes, pode-se descrever os pertencentes à classe das quinonas como a anaftoquinona β -lapachona, com atividade demonstrada contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do parasito (CASTRO, 1993), o 3 alil- β -lapachona, um derivado de transformação química da anaftoquinona β -lapachona, que foi sugerido como alternativa de uso em controle de bancos de sangue por mostrar-se ativa contra as formas tripomastigotas do parasito (CASTRO, 1993), a plumbagina, que demonstrou 100% ativa *in vitro* em amostras de sangue contaminado (FOURNET *et al.*, 1994) e a embelina, que em uma concentração de 100 μ g/mL foi capaz de induzir 100% de lise aos parasitos (FERESIN *et al.*, 2003). Outras classes com compostos potencialmente ativos são a classe dos flavonóides e dos alcalóides. A primeira é representada pela 3-metoxiflavonol penduletina (99% ativa), flavanona sacuranetina (100% ativa), luteolina (99% ativa) e vicenina-2 (100% ativa) contra o parasito presente no sangue contaminado na concentração de 500 μ g/mL (RIBEIRO *et al.*, 1997; GRAEL *et al.*, 2005). Além dessas, outra substâncias pertencente aos flavonóides é a quercetina-3-metil éter, que apresentou atividade tripanossomicida significativa (TAKEARA *et al.*, 2003). Dentre os alcalóides ganham destaque a cocsolina, dafnandrina, dafnolina e

limacina, todas 100% ativas contra o parasito (FOURNET *et al.*, 1994).

Outra classe de destaque nos testes contra o *T. cruzi* é a dos terpenos, representada por espécies vegetais da família Asteraceae. Dentre as 55 espécies vegetais estudadas pertencentes a esta família (SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 2007), destacam-se a *Lychnophora passerina* (Mart ex. DC) Gardn, *Lychnophora pinaster* Mart. e *Lychnophora trichocarpha* Spreng, que já tiveram seus estudos fitoquímicos realizados (CHIARI *et al.*, 1991; CHIARI *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996). Dentre todos os constituintes químicos isolados dessas espécies, o de maior destaque são as lactonas sesquiterpênicas, avaliadas *in vitro* em sangue contaminado, contra as cepas Y e CL de *T. cruzi*. Um resumo da atividade destes compostos e as estruturas químicas são representados na Tabela 2 e na Figura 4.

Tabela 2. Compostos da família Asteraceae ativos, *in vitro*, contra o *T. cruzi*.

Composto	Espécie	Cepa Y ($\mu\text{g/mL}$)	Cepa CL ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição de crescimento (%)
Goiazensólideo	<i>L. passerina</i>	240	-	100
Licnofólideo	<i>L. trichocarpha</i>	150	150	50
Eremantólideo C	<i>L. trichocarpha</i>	3600	14400	100
Ácido licnofóico	<i>L. pinaster</i>	12	-	50

Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 1996)

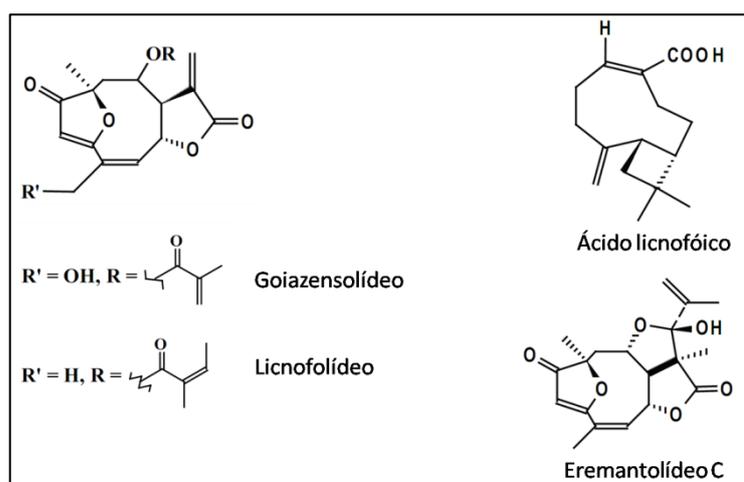


Figura 4. Estrutura química das lactonas sesquiterpênicas.

Fonte: (SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 2007)

O eremantolídeo C (EREC) (6,9-epóxi-2H-1,4-dioxiacilodeca[cd]pentaleno-2,7(4aH)-diona, 2^a, 3, 5, 6, 11^a, 11b-hexahidro-3-hidróxi-2^a,6,10-trimetil-3-(1-metiletenil)-,(2aS, 3R, 4aS, 6R, 10Z, 11aR, 11bR), Figura 5, é uma lactona sesquiterpena extraída das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng (OLIVEIRA *et al.*, 1996; SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 1998), espécie nativa do cerrado brasileiro, pertencente à família Asteraceae e conhecida como “Arnica”, sendo amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de feridas, alívio de dores de cabeça, anti-inflamatório e antireumático (OLIVEIRA *et al.*, 1996). É uma substância pouco solúvel em água e em etanol, $\log P=1,496 \pm 0,723$ (ACD/LABS, 2010). Em laboratório, este composto mostrou-se ativo, *in vitro*, contra formas tripomastigotas do *T. cruzi* em amostras de sangue contaminado. Avaliações feitas com a cepa Y e CL de *T. cruzi* demonstrou 100% de inibição do crescimento do parasito, com as concentrações de substância de 3,6mg/mL e 14,4mg/mL, respectivamente (CHIARI *et al.*, 1991; CHIARI *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996).

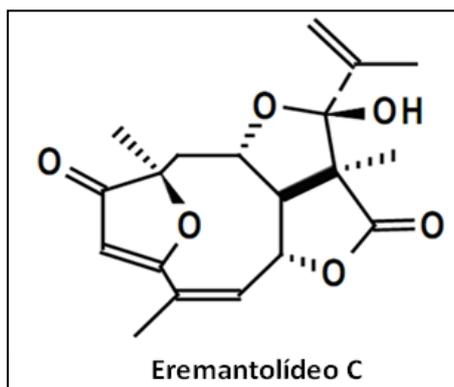


Figura 5. Fórmula estrutural do EREC (C₁₉H₂₂O₆).

Associado a isso, estudos de avaliação da segurança terapêutica do EREC utilizando camundongos Swiss demonstraram a ausência de sinais de toxicidade aguda (piloereção, salivação, alteração do tônus da cauda, movimentos de baixar a cabeça e de cheirar, frequência de defecação, agitação motora ou redução da mobilidade, convulsão e/ou óbito) na concentração de até 20mg/Kg quando administrado por via intraperitoneal (PAULA *et al.*, 2006). Estudos relatando dados sobre a citotoxicidade para essa substância não foram encontradas na literatura. Em contrapartida, o licnofolídeo, uma outra lactona sesquiterpênica, também obtido de *L. trichocarpa*, induziu, na concentração de

26,67mg/kg, um aumento significativo no número de aberrações cromossômicas e citotoxicidade (CANALLE *et al.*, 2001).

Dessa forma, o EREC é uma substância com potencial utilização no tratamento da doença de Chagas por apresentar atividade *in vitro* e baixa toxicidade, se comparada ao licnofolídeo, obtido da mesma espécie vegetal. Assim, visando obter forma farmacêutica dispersível em água, o EREC foi vetorizado em nanocápsulas, com objetivo de melhorar o direcionamento da molécula por via parenteral para as células alvo da infecção dos parasitos na fase aguda, tais como os fagócitos, tecido linfóide e demais órgãos acometidos na doença de Chagas.

Sistemas vetorizados para o tratamento da doença de Chagas

Os sistemas vetorizados, também chamados de carreadores coloidais, são sistemas de transporte de fármacos com a capacidade de direcionar as substâncias carreadas dentro do organismo. Assim, pode-se aumentar a concentração no sítio de ação e reduzir a concentração em tecidos e células sensíveis e, conseqüentemente, minimizar os efeitos adversos. Assim, pode-se melhorar a terapêutica, com óbvios benefícios para o paciente (ALLEMANN *et al.*, 1993).

Dentre os sistemas vetorizados, as nanocápsulas poliméricas (NC) são nanopartículas que variam entre 20-500nm (FESSI *et al.*, 1989) constituídas de um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica externa. Na interface polímero-núcleo oleoso encontram-se tensoativos lipofílicos e/ou hidrofílicos que destinam à estabilização do sistema. Os óleos utilizados na composição do núcleo das NC podem ser de origem animal ou vegetal, atóxicos, que em geral possuem capacidade de dissolver o fármaco em questão (LEGRAND *et al.*, 1999). Dessa forma, uma característica físico-química essencial aos fármacos candidatos para serem utilizados nesse sistema é a lipofilicidade, o que garante afinidade e boa solubilidade no núcleo oleoso. Na literatura existem trabalhos que demonstraram a incorporação do halofantrino, uma substância altamente lipofílica, nas NC poliméricas de ácido poli-lático (PLA) (MOSQUEIRA *et al.*, 2004; MOSQUEIRA *et al.*, 2006). Além do núcleo oleoso é possível que o fármaco encontre-se adsorvido à matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A Figura 6 demonstra duas possíveis formas de incorporação de fármaco às NC.

Os polímeros utilizados na obtenção dessas partículas, dentre eles a poli- ϵ -caprolactona (PCL) (HAMOUDEH *et al.*, 2006), são de fácil manipulação, estáveis nos fluidos biológicos, geralmente sintéticos e biodegradáveis (DOMB, 1994), tornando-se atrativo na produção de nanopartículas para veiculação e controle de liberação de fármacos e substâncias lipofílicas (LEROUX *et al.*, 1995) por diferentes vias (COUVREUR *et al.*, 2002).

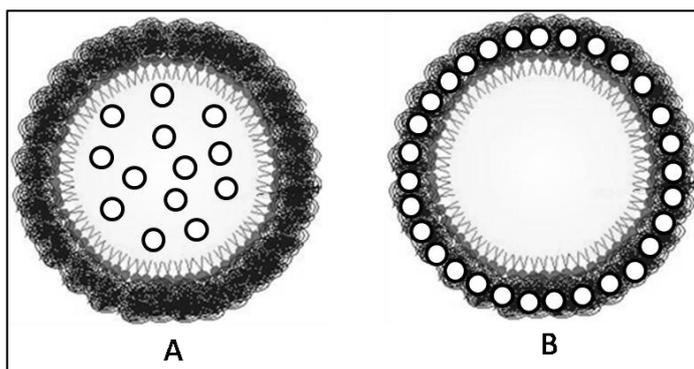


Figura 6. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: A: fármaco dissolvido no núcleo oleoso; B: fármaco adsorvido na parede polimérica.

Existem vários métodos descritos de preparação de NC poliméricas que podem ser divididos em duas classes principais (REIS *et al.*, 2006); os métodos que envolvem reações de polimerização *in situ* (REIS *et al.*, 2006) e os métodos que empregam polímeros pré-formados, tais como a nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989). Este último caracteriza-se por apresentar simples e rápida execução, baixo custo e facilidade de transposição para escala industrial.

A caracterização dos sistemas nanoparticulados é complexa, mas se faz necessária para avaliação da estabilidade das formulações, o que interfere sobre o perfil de distribuição das nanoestruturas *in vivo* após administração (LEGRAND *et al.*, 1999; BARRATT, 2000). A análise morfológica por microscopia de força atômica (LEITE *et al.*, 2005; DE ASSIS *et al.*, 2008), distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial elétrico superficial (potencial zeta), teor e eficiência de encapsulação e cinética de liberação do fármaco a partir das nanopartículas são os parâmetros geralmente investigados durante as etapas de caracterização físico-química dos sistemas nanométricos (LEGRAND *et al.*, 1999).

O uso de nanoestruturas como as NC poliméricas, nanoesferas e lipossomas vem

sendo amplamente explorado por seu potencial terapêutico e capacidade de direcionamento de fármacos no organismo (BARRATT, 2000; COUVREUR *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram diferentes aplicações terapêuticas das NC baseadas em suas propriedades de carreamento de fármacos insolúveis ou de baixa solubilidade em água (BARRATT, 2000). Os mais citados são relativos à proteção contra a inativação do ativo no trato gastrointestinal (LOWE *et al.*, 1994), a proteção contra a toxicidade de fármacos sobre a mucosa gástrica (AMMOURY *et al.*, 1991; GUTERRES *et al.*, 1995), o aumento da permeação em mucosas (ABOUBAKAR *et al.*, 1999) e o prolongamento do tempo de circulação do fármaco na corrente sanguínea (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; MOSQUEIRA *et al.*, 2004).

Na doença de Chagas, a utilização de vetores nanométricos vem sendo modestamente utilizada (ROMERO *et al.*, 2009). Estudos realizados, *in vitro*, no final da década de 80 utilizando a estearilamina encapsulada em lipossomas de fosfatidilcolina revelou uma rápida taxa de mortalidade das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi* (YOSHIHARA *et al.*, 1987). Uma década depois novos estudos, dessa vez envolvendo o NFX, demonstraram que as nanoesferas de poli-alquil-cianoacrilato dobraram a atividade deste fármaco contra as formas epimastigotas na dose de 2µg/mL, comparado ao fármaco livre (GONZALEZ-MARTIN *et al.*, 1998). Em 1999, formulações lipídicas contendo anfotericina B foram testadas, *in vitro*, contra as formas tripomastigotas e amastigota do parasito e apresentaram alta atividade quando comparada à atividade apresentada pelo benznidazol (YARDLEY *et al.*, 1999). Em trabalhos envolvendo o alopurinol contra as formas epimastigotas, *in vitro*, foi demonstrado que as nanoesferas contendo o fármaco foram capazes de levar a morte 91,5% dos parasitos enquanto o fármaco livre teve apenas 45,9% de atividade (GONZALEZ-MARTÍN *et al.*, 2000). *In vivo*, estudos realizados com nanoesferas de ácido poli-lático-poli-etilenoglicol (PLA-PEG) contendo o bis-triazol D0870 visando minimizar a opsonização e captura pelo sistema mononuclear fagocitário demonstrou 60% de cura em animais infectado com a Cepa Y do parasito na concentração de 3mg/Kg, enquanto o BZ, fármaco de escolha no tratamento clínico da doença, na concentração de 100mg/Kg, apresentou uma porcentagem de cura de 47% (MOLINA *et al.*, 2001).

Diante do exposto, considerando a importância epidemiológica da doença de Chagas

no mundo, a ausência de uma quimioterapia satisfatória, os promissores resultados obtidos *in vitro* para o EREC e os estudos utilizando nanoestruturas que vem sendo realizados com novas perspectivas sobre a doença, a associação desta substância de origem vegetal às NC, contendo polímeros de baixo custo e características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, podem contribuir na busca racional de medicamentos contra a doença uma vez que o uso desta tecnologia visa aumentar a atividade terapêutica das moléculas a ela associada sem um aumento da dose ou dos efeitos colaterais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Preparar e a caracterizar uma formulação de nanocápsulas (NC) poliméricas contendo o eremantolídeo C (EREC), uma substância hidrofóbica extraída de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. Investigar a atividade das novas nanocápsulas de EREC *in vitro* e *in vivo* em modelo experimental de doença de Chagas. Além disso, foi desenvolver e validar uma metodologia de quantificação do EREC.

Objetivos específicos

- 1- Desenvolver e validar a metodologia de quantificação do EREC por espectrofotometria UV-VIS;
- 2- Desenvolver e validar a metodologia de quantificação do EREC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se detecção por arranjos de diodo (DAD);
- 3- Desenvolver a formulação coloidal de NC poliméricas contendo EREC a partir do polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL);
- 4- Caracterizar as NC: distribuição de tamanho da população de partículas, determinação da porcentagem de encapsulação e da carga superficial (potencial zeta);
- 5- Avaliar a cinética de liberação "*in vitro*" do EREC a partir das NC;
- 6- Determinar as características morfológicas das nanocápsulas por Microscopia de Força Atômica;
- 7- Otimizar e validar a metodologia de "*screening*" para avaliação de substâncias nanoestruturadas e produtos vegetais, "*in vitro*", frente às formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*;
- 8- Avaliar a atividade do EREC livre ou nanoencapsulado contra o *T. cruzi*, "*in vitro*", no modelo citado acima;
- 9- Avaliar a atividade do EREC livre ou nanoencapsulado, "*in vivo*", utilizando como modelo experimental camundongos Swiss infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

CAPITULO 1

Validação dos métodos analíticos para quantificação do eremantolídeo C

1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO EREC

1.1 Materiais e métodos

1.1.1 *Materiais*

Para desenvolvimento e validação das metodologias de quantificação do EREC por CLAE e espectrofotometria foram utilizados os solventes acetonitrila, metanol e acetona grau HPLC (TEDIA, EUA). Água ultrapura foi obtida no sistema Symplicity System 185, (Millipore USA). A substância utilizada em todos os experimentos, o eremantolídeo C (EREC) (6,9-epóxi-2H-1,4-dioxiacilodeca[cd]pentaleno-2,7(4aH)-diona, 2^a, 3, 5, 6, 11^a, 11b-hexahidro-3-hidróxi-2^a,6,10-trimetil-3-(1-metiletenil)-, (2aS, 3R, 4aS, 6R, 10Z, 11aR, 11bR), foi extraído, purificado, caracterizado (SAÚDE-GUIMARÃES *et al.*, 1998) e cedido pela professora Dênia Antunes Saúde-Guimarães da Escola de Farmácia da UFOP.

1.1.2 *Preparo de Soluções e suspensões de nanocápsulas*

A solução de EREC foi preparada na concentração de 1mg/mL em acetonitrila em um balão volumétrico. A suspensão de nanocápsulas brancas (sem o EREC) foi preparada pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). A fase orgânica foi constituída de 0,6% (p/v) de PCL (polímero); 0,75% (p/v) de Epikuron 170[®] (tensoativo hidrofóbico); 2,5 % (v/v) de Mygliol 810N (fase oleosa). Descrito de forma sucinta, o PCL, Epikuron 170 e o Miglyol 810 foram dissolvidos em 10mL de acetona com auxílio de um agitador magnético (modelo PC-200, Corning, EUA) a 30°C a 250rpm. A solução obtida foi transferida para a fase externa, aquosa (20mL), contendo 0,75% p/v de Pluronic F68 (tensoativo hidrofílico). A mistura foi então mantida durante 10 minutos sob agitação, com auxílio de um agitador magnético, a 500rpm. Finalmente, a suspensão coloidal obtida foi concentrada com auxílio de um rotavapor (Laborota 4000/4001 Heidolph

Instruments, Alemanha) até um volume final de 10mL.

1.1.3 Instrumentos e condições analíticas

As análises de CLAE foram realizadas em um equipamento que consistia em um cromatógrafo líquido, modelo Alliance 2695, composto por amostrador automático, bomba, forno de coluna e detector de arranjos de diodo (DAD), (Waters, Milford - USA). A separação foi feita com fluxo de fase móvel isocrático de 1mL/min numa coluna Gemini Phenomenex de 150mm x 4.6mm, com partículas de 4µm de tamanho, protegida por uma pré-coluna Phenomenex, modelo AJO-7597 C18, de (2mm x 4,6mm x 3µm), todos mantidos a 30°C. O comprimento de onda monitorado foi de 265nm. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de metanol e água (60:40)., num fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi de 25µL.

As análises por espectrofotometria do ultravioleta, por sua vez, foram realizadas no espectrofotômetro UV-VIS Helios α (Thermo Spectronic, EN) em um comprimento de onda de 265nm utilizando-se a mesma mistura de solventes acima como branco.

1.1.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do EREC

Os métodos cromatográfico e espectrofotométrico desenvolvidos foram validados de acordo com os procedimentos descritos no guia de validação de métodos analíticos da ANVISA (ANVISA, 2003).

1.1.4.1 Especificidade

Para análise por CLAE, uma solução contendo nanocápsulas brancas (matriz) e uma solução contendo uma mistura de EREC e nanocápsulas brancas foram preparadas por dissolução em acetonitrila pura. Essas soluções foram injetadas no cromatógrafo e os cromatogramas foram comparados para avaliar a presença de picos interferentes no mesmo

tempo de retenção do EREC.

Para análise por espectrofotometria, obteve-se um espectro UV-VIS de ambas as soluções no comprimento de onda de 265nm para avaliar a presença de interferentes.

1.1.4.2 Linearidade

A soluções padrão contendo 1mg/mL de EREC em acetonitrila foram preparadas em três réplicas. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em acetonitrila até obtenção de onze concentrações, correspondendo a 1,0, 2,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0 40,0 e 50,0µg/mL de EREC. A curva de calibração de concentração *versus* área do pico ou absorbância foi construída para os métodos de CLAE e espectrofotometria, respectivamente. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear no software Microsoft Excel® (Microsoft, EUA).

1.1.4.3 Precisão

A precisão intra-dia foi avaliada por análise de cinco amostras (n=5) nas concentrações baixas (10 e 2µg/mL de EREC para espectrofotometria e CLAE, respectivamente), médias (25 e 15µg/mL de EREC para espectrofotometria e CLAE, respectivamente) e altas (40 e 30µg/mL de EREC para espectrofotometria e CLAE, respectivamente). Similarmente, a precisão inter-dia foi avaliada em dois dias consecutivos (n=10). A concentração de EREC e o erro padrão relativo (RSD) foram calculados.

1.1.4.4 Exatidão

O EREC foi pesado com exatidão e acrescentado a uma mistura de nanocápsulas brancas em três concentrações diferentes (10, 25, e 40µg/mL para ao método espectrofotométrico e 2, 15, e 30µg/mL para o método de CLAE). Para cada concentração, foram preparadas amostras em quatro réplicas, com acetonitrila, e a porcentagem de

recuperação foi determinada pelos métodos de espectrofotometria UV e CLAE.

1.1.4.5 Limites de detecção e quantificação

Soluções diluídas de EREC foram preparadas e analisadas pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico, em concentrações decrescentes, na faixa de 0,05-5,0µg/mL.

Para ambos os métodos, o limite de detecção (LOD) foi definido como a menor concentração do analito que apresentou uma relação de 3 vezes do sinal de ruído da linha de base, sendo a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado; já o limite de quantificação (LOQ) foi considerado como a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

1.2 Resultados

1.2.1 Validação dos métodos analíticos

O espectro de varredura referente à absorção do EREC na região do ultravioleta (UV) entre 190-380nm está representado na Figura 7 sendo o máximo de absorção detectado a 265nm.

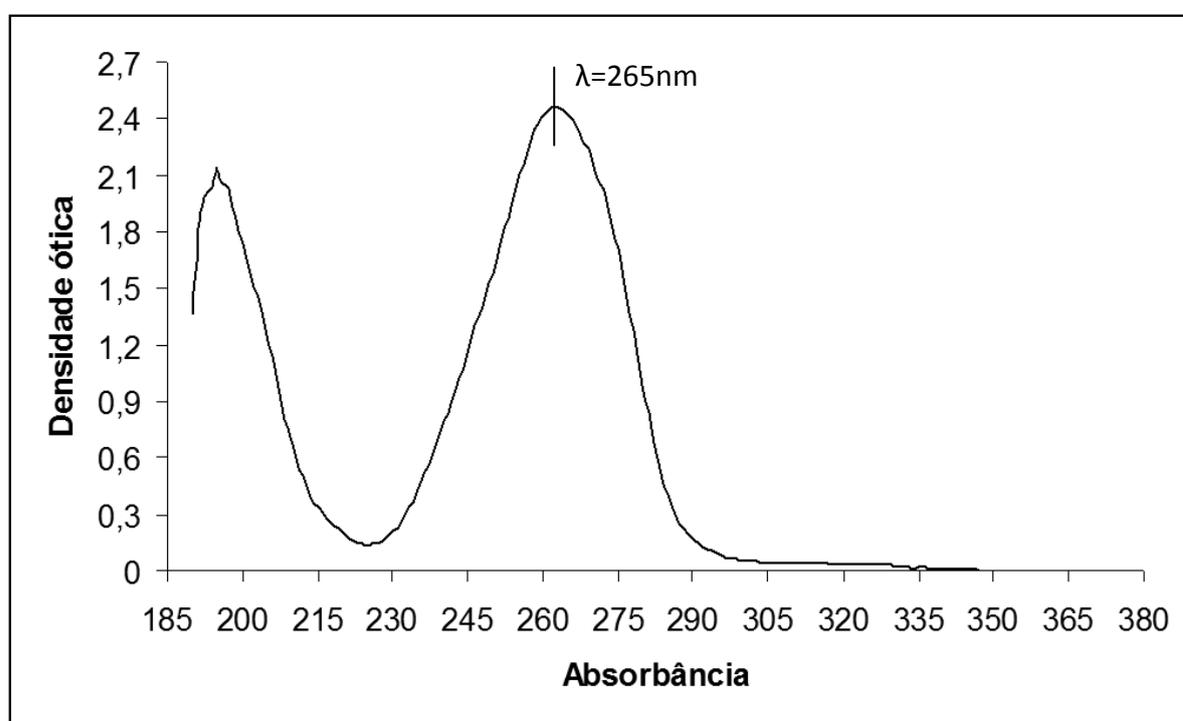


Figura 7. Espectro UV de uma amostra de EREC na concentração de 50µg/mL em acetonitrila.

No desenvolvimento da metodologia analítica a ser utilizada para quantificação do EREC por CLAE, foram testadas fases móveis de metanol:água em diferentes proporções. Uma boa resolução do cromatograma e um pico simétrico foi obtido com a utilização da fase móvel na proporção de 60:40, levando a obtenção de um tempo de retenção de aproximadamente 9 minutos no comprimento de onda de 265nm. O cromatograma obtido nas condições acima descritas está representado na Figura 8.

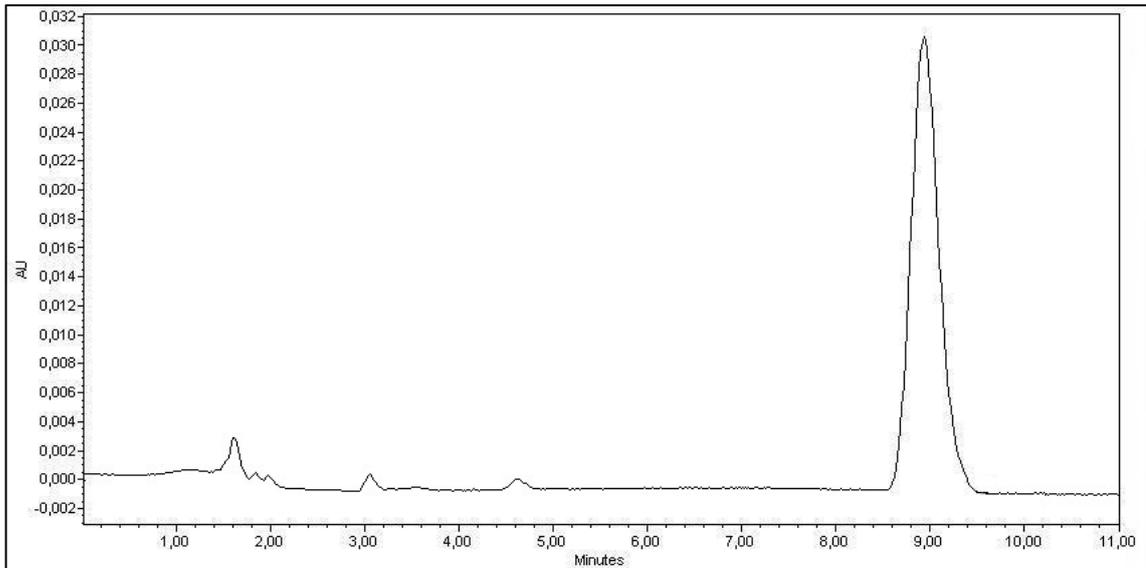


Figura 8. Cromatograma obtido para amostra de EREC na concentração de 50 μ g/mL.

1.2.1.1 Especificidade

Possíveis interferências dos componentes dos excipientes utilizados no preparo das nanocápsulas na quantificação do EREC foram investigadas e não foram observados picos na nas amostras da matriz com o mesmo tempo de retenção do EREC. Sendo assim o pico no tempo de retenção de 9 minutos foi considerado puro, demonstrando que não existe interferência dos excipientes da formulação eluindo no mesmo tempo de retenção do pico de interesse. O cromatograma obtido com a mistura de EREC e NC, NC brancas e dos solventes estão mostrados na Figura 9.

Para o método de espectrofotometria UV não foram encontradas absorções a 265nm quando avaliadas apenas as NC brancas e solventes.

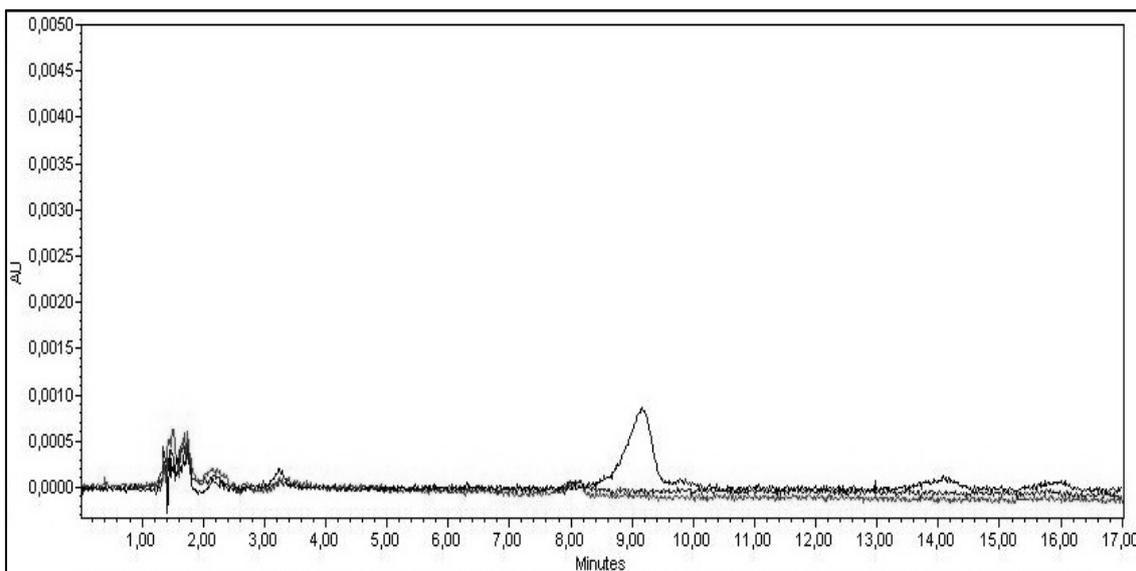


Figura 9. Cromatograma obtido na análise da especificidade do EREC por CLAE.

1.2.1.2 Linearidade

Os dados do estudo de linearidade do EREC por CLAE e espectrofotometria estão representados nas Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. Linearidade obtida para o EREC por CLAE.

Concentração de EREC ($\mu\text{g/mL}$)	Área média ^a \pm DP ¹	CV ² %
1,0	22878,6 \pm 870,2	3,80*
2,0	53154,4 \pm 1094,6	2,06*
5,0	140332,4 \pm 1409,4	1,00*
10,0	281226,4 \pm 7833,6	2,79*
15,0	429822,4 \pm 2992,2	0,70*
20,0	571658,6 \pm 3463,9	0,61*
25,0	748618,8 \pm 3945,1	0,53*
30,0	871807,4 \pm 5199,8	0,60*

^an=5;

¹Desvio padrão

²Coefficiente de variação

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Tabela 4. Linearidade obtida para o EREC por espectrofotometria.

Concentração de EREC ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância média (265nm) ^a \pm DP ¹	CV ² %
5	0,1346 \pm 0,0026	1,93*
7,5	0,199 \pm 0,0022	1,12*
10	0,2546 \pm 0,0020	0,81*
15	0,3814 \pm 0,0005	0,14*
20	0,5262 \pm 0,0052	1,00*
25	0,6322 \pm 0,0008	0,13*
30	0,7414 \pm 0,0009	0,12*
40	1,0170 \pm 0,0014	0,13*

^an=5;¹Desvio padrão;²Coefficiente de variação;

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Uma relação linear foi encontrada entre as concentrações de EREC e a resposta obtida tanto pelo método de CLAE quanto por espectrofotometria. A análise de regressão dos dados é apresentada na Tabela 5. Altos valores (0,999) foram encontrados para o coeficiente de regressão (R^2) para os dois métodos. Nenhum desvio significativo da linearidade foi detectado nessa faixa analisada.

Tabela 5. Sumário dos dados de linearidade obtidos para o EREC por espectrofotometria e CLAE.

Parâmetros de regressão	UV ²	CLAE ³
Coeficiente de regressão (R^2)	0,999	0,999
Inclinação \pm DP ¹	0,0250 \pm 0,00004	29537,81 \pm 157,08
Interceptação \pm DP ¹	0,0094 \pm 0,002507	-8823,01 \pm 1966,74
Erro padrão relativo (%)	0,02	0,02
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	5-40	1-30
Número de concentrações	8	8

¹Desvio padrão;²Espectrofotometria do ultra-violeta;³Cromatografia líquida de alta eficiência.

1.2.1.3 Precisão e exatidão

Os resultados referentes à precisão de quantificação do EREC, intra e inter-dia, pelo método de CLAE estão representados na Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente.

Tabela 6. Precisão intra-dia para quantificação do EREC por CLAE.

Concentração de EREC ($\mu\text{g/mL}$)	Área média ^a \pm DP ¹	CV ² %
2,0	53922,6 \pm 494,9	0,92*
15,0	417409,2 \pm 2269,7	0,54*
30,0	871398,2 \pm 7350,8	0,84*

^an=5;

¹Desvio padrão;

²Coefficiente de variação;

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Tabela 7. Precisão inter-dia para quantificação do EREC por CLAE.

Dia	Concentração de EREC ($\mu\text{g/mL}$)	Área média ^a \pm DP ¹	CV ² %
1	2,0	53922,6 \pm 494,9	0,92*
	15,0	417409,2 \pm 2269,7	0,54*
	30,0	871398,2 \pm 7350,8	0,84*
2	2,0	44637,6 \pm 440,4	0,99*
	15,0	416441,2 \pm 2282,9	0,55*
	30,0	851190,6 \pm 35121,9	4,12*

^an=5;

¹Desvio padrão;

²Coefficiente de variação;

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Os resultados obtidos na avaliação da precisão de quantificação do EREC, intra e inter-dia, pelo método de espectrofotometria estão representados na Tabela 8 e Tabela 9, respectivamente.

Tabela 8. Precisão intra-dia para quantificação do EREC por espectrofotometria.

Concentração de EREC ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância média ^a \pm DP ¹	CV ² %
---	--	-------------------

10,0	0,2510 ± 0,0007	0,28*
25,0	0,6716 ± 0,0019	0,29*
40,0	1,2454 ± 0,0009	0,07*

^an=5;¹Desvio padrão;²Coefficiente de variação;

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Tabela 9. Precisão inter-dia para quantificação do EREC por espectrofotometria.

Dia	Concentração de EREC	Absorbância média ^a ±	CV ² %
	(µg/mL)	DP ¹	
1	10,0	0,2510 ± 0,0007	0,28*
	25,0	0,6716 ± 0,0019	0,29*
	40,0	1,2454 ± 0,0009	0,07*
2	10,0	0,4992 ± 0,0008	0,17*
	25,0	1,1932 ± 0,0423	3,55*
	40,0	2,2478 ± 0,0018	0,08*

^an=5;¹Desvio padrão;²Coefficiente de variação;

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Os dados de precisão intra e inter-dia para as duas metodologias de quantificação do EREC bem como os valores de exatidão estão representados na Tabela 10.

Tabela 10. Sumário dos resultados de precisão e exatidão dos métodos avaliados para quantificação do EREC.

Parâmetros de validação	Concentração	UV	HPLC
Precisão intra-dia, n=5 (DPR ¹ %)	Baixa	0,28*	0,91*
	Média	0,29*	0,54*
	Alta	0,07*	0,84*
Precisão inter-dia, n=10 (DPR ¹ %)	Baixa	0,17*	2,61*
	Média	3,55*	0,54*
	Alta	0,08*	4,12*
Exatidão, n=10 (média de recuperação, %) ± DP ²	Baixa	98,59 ± 0,01*	102,71 ± 0,83*
	Média	102,35 ± 2,74*	97,82 ± 1,80*
	Alta	96,46 ± 0,12*	99,52 ± 0,79*

¹Desvio padrão relativo;

²Desvio padrão;

Critério de aceitação: CV%<5% e exatidão na faixa de 95-105% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

1.2.2 Limite de detecção e quantificação

Considerando o sinal de ruído, o LOD e LOQ foram obtidos para os dois métodos e estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação do LOD e LOQ para quantificação do EREC.

Parâmetros de validação	UV	HPLC
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,0	0,5
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,0	1,0

1.3 Discussão

Após análise do espectro de absorção do EREC, o comprimento de onda de 265nm foi selecionado para detecção devido à adequada absorvidade molar e alta seletividade dessa substância nesse comprimento de onda (λ). Estudos anteriormente realizados também definiram este λ como adequado para quantificação desta substância (SANTOS *et al.*, 2003; SAKAMOTO *et al.*, 2005).

O desenvolvimento e validação de uma metodologia de quantificação de lactonas sesquiterpênicas já havia sido mencionados anteriormente devido aos promissores resultados que as mesmas vêm apresentando em estudos pré-clínicos e visando facilitar e otimizar futuros estudos de formulação com esses compostos (GOBBO-NETO *et al.*, 2008).

As análises obtidas tanto por CLAE quanto por espectrofotometria apresentaram especificidade adequada para quantificação do EREC nesse λ . Na avaliação da linearidade observou-se que ambas as metodologias apresentaram um coeficiente de correlação linear dentro do preconizado (ANVISA, 2003), 0,999, e valores de CV inferiores a 5%, demonstrando uma correlação linear entre as concentrações de 1-30 e 5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para CLAE e espectrofotometria, respectivamente. Os resultados obtidos por CLAE estão de acordo com os descritos pela literatura (SAKAMOTO *et al.*, 2005; GOBBO-NETO *et al.*, 2008) em estudos feitos utilizando fluxo de fase móvel gradiente para quantificação de lactonas sesquiterpênicas em extratos de plantas, utilizando-se a detecção por DAD, no entanto, não foram encontradas referências sobre esse tipo de análise por espectrofotometria, nem na presença de nanocápsulas na amostra.

Nas análises de precisão e exatidão ambos os métodos apresentaram valores dentro do recomendado (ANVISA, 2003) sendo, os valores de erro padrão relativo inferiores a 5,0%, e recuperação média (n=6) na faixa de 95-105%, demonstrando assim uma precisão e exatidão adequada dos dois métodos.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se definir como válidos os métodos desenvolvidos. Além disso, observa-se que o método de CLAE apresenta maior sensibilidade para quantificação do EREC, sendo essa quantificação de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor este 5 vezes inferior ao definido por espectrofotometria. Além disso, para quantificação da substância isolada, o

uso do modo isocrático torna esta metodologia prática e rápida. No entanto, o método de espectrofotometria surge como uma alternativa de menor custo para determinação desta substância em situações onde as concentrações do EREC excedem 5µg/mL, sem a presença de interferentes da matriz.

CAPÍTULO 2

Preparação de formulações e caracterização das nanocápsulas contendo eremantolídeo C

2 PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO O EREMANTOLÍDEO C

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 *Materiais*

Para preparação das nanocápsulas (NC), suspensões e soluções utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram utilizadas as substâncias fosfatidilcolina de soja [~70% fosfatidilcolina, Epikuron 170®, Lucas Meyer (França)]; poloxamer 188 (8400 g/mol, Synperonic PE/F68, ICI Surfactants, Cleveland, UK); Poli-ε-caprolactona [42.500 g/mol Sigma-Aldrich, (Brasil)]; triglicerídeos de cadeia média (Miglyol 810N, Hulls, Alemanha).

Os fármacos utilizados foram: o (1) benznidazol (BZ), (2-nitroimidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), purificado e caracterizado, após purificação, por espectrofotometria e ponto de fusão a partir de comprimidos de Rochagan®, (Roche, Brasil); o (2) Itraconazol (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 a pureza verificada pelo ponto de fusão, e o (3) miconazol base (MCZ), 1-[2,4-Dicloro-β-(2,4-diclorobenziloxi)fenil]imidazol, foi preparado a partir do nitrato de miconazol adquirido da (Sigma Aldrich, EUA) segundo método descrito por Spósito (SPÓSITO, 2008), a pureza foi verificada pelo ponto de fusão (83-87°C) e (4) o eremantolídeo C (EREC), foi extraído e purificado por Saúde e colaboradores e cedido para as investigações que se seguem.

Para quantificação do EREC nas formulações de nanocápsulas por CLAE foram utilizados acetonitrila, metanol e acetona grau HPLC (TEDIA, EUA) e água ultra-pura obtida no sistema Symplicity System 185 (Millipore USA).

Todas as outras substâncias utilizadas (acetona, N,N-dimetil-acetamida, dimetil-sulfóxido, glicose, metanol, polietilenoglicol 300) adquiridos da VETEC (RJ, Brasil) foram de

grau analítico.

2.1.2 Preparação das nanocápsulas

As NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Descrito de forma sucinta, como representado na Figura 10, 0,6% (p/v) de PCL, 0,75% (p/v) de Epikuron 170, 2,5 % (v/v) de Miglyol 810 e diferentes concentrações do Eremantolídeo C foram dissolvidos em 10mL de acetona com auxílio de um agitador magnético (modelo PC-200, Corning, EUA) a 30°C a 250rpm. A solução obtida foi transferida para a fase externa, aquosa, contendo 0,75% p/v de Pluronic F68 (tensoativo hidrofílico) utilizando-se uma seringa. A mistura foi então mantida durante 10 minutos sob agitação, com auxílio de um agitador magnético, a 500rpm. Finalmente, a suspensão coloidal obtida foi concentrada com auxílio de um rotavapor (Laborota 4000/4001 Heidolph Instruments, Alemanha) até um volume final de 10mL.

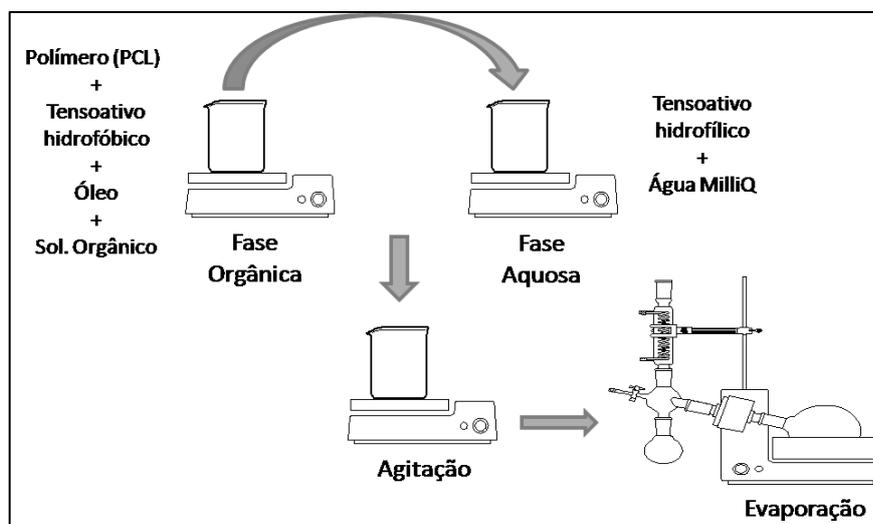


Figura 10. Representação do processo de preparação das nanocápsulas.

2.1.3 Extração, purificação e caracterização do BZ e Itraconazol

O BZ utilizado nos experimentos foi extraído a partir de comprimidos de ROCHAGAN[®] comercializados pelo LAFEPE (Brasil), pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPEIA, 2005). Para extração do BZ, 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. 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 BZ puro foi armazenado ao abrigo da luz. O rendimento da extração foi calculado pela divisão do valor da massa de BZ obtido pelo peso total teórico de BZ contido na quantidade de comprimidos utilizados X 100.

O produto obtido foi purificado e posteriormente 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 ± 2 nm.

O ITZ foi obtido a partir de cápsulas comercializadas no mercado varejista (SPORANOX[®], Jansen-Cilag, Brasil). A extração e purificação a partir dessa forma farmacêutica foram realizadas triturando-se os pellets contidos de 10 cápsulas em gral de porcelana, com adição de 50 mL 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. O produto obtido foi caracterizado quanto a sua pureza pelo ponto de fusão (166.2°C) (CHEMIDPLUS, 2010)

2.1.4 Soluções e suspensões para uso experimental

- **Estudos *in vitro***

Para os estudos *in vitro*, a solução de MCZ foi preparada numa concentração final de 1,15mg/mL. Para isso, 11,5mg de nitrato de miconazol foram dissolvidos, primeiramente, em 1mL de DMSO e acrescidos de solução de glicose 5% até obtenção de um volume final de 10mL. A solução de DMSO foi preparada na concentração final de 1%. A solução de EREC foi preparada numa concentração final de 2mg/mL. Para isso, 4mg de EREC foram dissolvidos, primeiramente em 200µL de DMSO e acrescidos de solução de glicose 5% até obtenção de

um volume final de 2mL. A partir dessa solução, foram obtidas, por diluição com solução de glicose 5%, as soluções de concentração de 100, 300, 500 e 1000 μ g/mL.

- **Estudos *in vivo* – via oral**

A suspensão de EREC foi preparada numa concentração de 5mg/mL para os estudos *in vivo* com tratamento por via oral. Para isso, 50mg de EREC foram, primeiramente, suspensos em metilcelulose (5%) e Tween 80 (0,5%) e acrescidos de glicose até obtenção de um volume final de 10mL. A suspensão de BZ foi preparada numa concentração de 5mg/mL para administração por via oral. Para isso, 50mg de BZ foram, primeiramente, suspensos em metilcelulose (5%) e Tween 80 (0,5%) e acrescidos de glicose até obtenção de um volume final de 10mL. A suspensão de ITZ foi preparada numa concentração de 5mg/mL para tratamento por via oral. Para isso, 50mg de ITZ foram, primeiramente, suspensos em metilcelulose (5%) e Tween 80 (0,5%) e acrescidos de glicose até obtenção de um volume final de 10mL. A suspensão dos excipientes (placebo) utilizados nos estudos foi preparada a fim de garantir a não interferência desses nos resultados. Dessa forma, preparou-se uma suspensão contendo metilcelulose 5% (p/v), Tween 80 0,5% (v/v) e glicose 5% (p/v). Para isso, 5g de metilcelulose foram suspensos primariamente em 0,5mL de Tween 80. Ao final, foi acrescida a solução de glicose 5% a fim de obter um volume final de 100mL.

- **Estudos *in vivo* – via endovenosa**

A solução de EREC foi preparada numa concentração final de 1mg/mL para o tratamento endovenoso. Para isso, 5mg de EREC foram dissolvidos, primeiramente, em 400 μ L de DMA, seguido da adição de 600 μ L de PEG e acrescidos de solução de glicose 5% até obtenção de um volume final de 5mL. As soluções de BZ foram preparadas na concentração de 1 e 2mg/mL. Para preparação da primeira 5mg de BZ foram dissolvidos, primeiramente, em 400 μ L de DMA e 600 μ L de PEG e acrescidos de solução de glicose até obtenção de um volume final de 5mL. Para a segunda formulação, 5mg do fármaco foram dissolvidos em 200 μ L de DMA e 300 μ L de PEG e acrescidos também de glicose 5% até obtenção de um volume final de 2,5mL. A solução de DMA-PEG foi preparada utilizando-se

400µL de DMA, 600µL de PEG e acrescido de solução de glicose 5% até obtenção de um volume final de 15mL.

2.1.5 Análise do tamanho e potencial zeta (ζ) das partículas

O tamanho das NC foi determinado por espectrometria de correlação fotônica (PCS) no equipamento Nanosizer N5 Plus (Beckman Coulter, EUA). Previamente à leitura, 5µL da suspensão de NC foram diluídos em 2mL de água MilliQ à 20°C.

A medida do potencial de superfície das partículas (potencial zeta) foi realizada no equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern, Inglaterra), pertencente à Rede de Nanobiotecnologia da FAPEMIG e localizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela técnica de microeletroforese associada à técnica de anemometria do laser Doppler (ALD). Para tal 20µl de suspensão de nanocápsulas foram diluídos em 4980µL de NaCl 1mM, previamente filtrado em membrana de 0,45µm para eliminação de partículas da solução.

As análises foram realizadas em seis réplicas (n=6). Diante da normalidade dos dados apresentados, a comparação entre os tamanhos das nanopartículas das diferentes formulações foi realizada pelo teste *t-Student*.

2.1.6 Avaliação da porcentagem e da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação de um determinado fármaco é definida pela relação entre a quantidade de fármaco encapsulado e a quantidade total de fármaco utilizado na preparação da formulação. A porcentagem de encapsulação compreende a relação entre a quantidade de fármaco encapsulado e a quantidade total de fármaco realmente presente na formulação final.

Para esse estudo deve ser quantificado: (1) o total de substância presente na suspensão de NC; (2) a quantidade de substância presente na fase externa aquosa (não encapsulada); (3) a quantidade de substância associada às NC (encapsulada); (4) a quantidade total de substância utilizada na preparação da formulação.

Para isso, em um primeiro momento, 125µL da suspensão de NC foram diluídos em balão volumétrico com acetonitrila até obtenção de um volume final de 5mL. A solução resultante foi agitada em vórtex (MS1, IKA, EUA) por 1 minuto. O EREC presente no sobrenadante resultante foi quantificado por CLAE. Dessa forma, quantificou-se a concentração total de EREC presente na suspensão coloidal. Em um segundo momento, a concentração de EREC não encapsulado foi determinada por ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando-se uma microcentrífuga (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Para isso, 400µL da suspensão de NC foram depositados em filtros Microcon (Amicon®, 100.000Da, Millipore, EUA) e centrifugados a 2500rpm durante 30 minutos. Uma amostra de 125µL do ultrafiltrado foi diluída em balão volumétrico com acetonitrila até obtenção de um volume final de 5mL. Essa solução foi agitada em vórtex por 1 minuto e o sobrenadante também foi avaliado por CLAE, quantificando-se assim o EREC não encapsulado.

Todas as análises foram feitas em seis réplicas (n=6, sendo 3 formulações com 2 amostragens de cada) e a quantidade de EREC nanoencapsulado foi determinada pela diferença entre a quantidade de substância total e a quantidade de substância não encapsulada.

A porcentagem de encapsulação foi determinada pela equação:

$$\% \text{ de encapsulação} = \frac{[\text{ }]_{\text{total de EREC}} - [\text{ }]_{\text{não encapsulada}}}{[\text{ }]_{\text{total de EREC na suspensão}}} \times 100$$

A eficiência de encapsulação foi determinada pela equação:

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{[\text{ }]_{\text{EREC encapsulado}}}{[\text{ }]_{\text{EREC total no preparo}}}$$

2.1.7 Determinação da solubilidade do EREC em PBS

A solubilidade do EREC em meio tampão fosfato (PBS) foi determinada num período de 24 horas. Para isso, 1mg de EREC foi precisamente pesado e acrescentado a um tubo

Eppendorf®. A esse tubo foram acrescentados 1mL de PBS e o sistema foi mantido em agitação a 37°C por 24 horas.

Ao final de 24 horas realizou-se uma ultracentrifugação do tubo a 8.000rpm por 5 minutos, retirou-se 100µL do sobrenadante e diluiu-se volumetricamente com acetonitrila até obtenção de um volume final de 2mL. Essa solução foi vórtexada por 10 minutos e novamente ultracentrifugada a 8.000rpm. O sobrenadante foi quantificado por CLAE. Esse experimento foi realizado em seis réplicas (n=6) e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

2.1.8 Determinação da cinética de liberação *in vitro* do EREC

A avaliação da cinética de liberação *in vitro* do EREC a partir de NC foi realizado de acordo com a técnica de diálise direta descrito por Washington (WASHINGTON, 1989). Para tanto, um total de 450µL da suspensão de NC foram diretamente adicionados a três sacos (n=3) de diálise com poros de 12000-14000Da. Esses sacos foram imersos em 50mL de PBS e foram mantidos em equilíbrio a 37°C. Em intervalos de tempos pré-definidos (0, 5, 15, 30, 60, 180, 360, 720, 1440, 2160, 2880min), alíquotas de 1mL foram retiradas do meio externo e diluídas volumetricamente com acetonitrila até obtenção de um volume final de 2mL. A solução final foi vórtexada por 10 minutos e ultracentrifugada a 8.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi avaliado por CLAE. A concentração de EREC no meio de liberação foi de 9µg/ml que responde a 10% da solubilidade do EREC em PBS a 37°C, para manutenção da condição *sink*. Os experimentos de cinética de liberação foram realizados em banho-maria a 37°C com agitação (Banho Dubnoff mod.144, Fanem, Brasil).

2.1.9 Análise morfológica das nanocápsulas

A avaliação morfológica das nanopartículas foi feita por microscopia de força atômica (MFA).

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 μm , 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, 50 μL 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 de contato intermitente (*tapping mode*). A varredura foi efetuada com velocidade de 1Hz e resolução de 256 x 256 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis). Um mínimo de 06 imagens de cada amostra foi analisado para assegurar reprodutibilidade dos resultados.

A comparação entre os tamanhos obtidos pelas técnicas de PCS e AFM para as nanopartículas foi realizada pelo teste *t-Student*, uma vez que os dados respeitavam os critérios de normalidade. Para isso foram considerados intervalos de confiança de 95% e diferença estatística quando $p < 0,05$.

2.2 Resultados

2.2.1 Análise da pureza do BZ, Itraconazol e Miconazol

O BZ e ITZ foram obtidos na sua forma pura. O rendimento da extração do BZ foi de $82,0 \pm 3,0\%$. A pureza foi confirmada pelo espectro de absorção a 316nm e pelo ponto de fusão determinado do cristal purificado a $188.5-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, estando de acordo com as propriedades físico-químicas descritas na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2005). A pureza do ITZ foi verificada pelo ponto de fusão (166°C) que estava de acordo com a literatura (CHEMIDPLUS, 2010). O miconazol base também teve sua pureza caracterizada pelo ponto de fusão (85°C), também estando de acordo com estudos realizados anteriormente (SPÓSITO, 2008).

2.2.2 Análise do tamanho e potencial zeta (ζ) das partículas

O tamanho e potencial zeta das nanocápsulas contendo diferentes concentrações de EREC foram determinados e representados na Tabela 12.

Tabela 12. Análise do tamanho e potencial zeta de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de EREC.

Concentração de EREC (mg.mL ⁻¹)	Potencial zeta ¹ \pm DP ² (mV)	Tamanho médio \pm DP ² (nm)	I.P. ³
0,0	$-50,1 \pm 1,9$	$171,4 \pm 0,80^*$	$0,127 \pm 0,022$
1,0	$-60,6 \pm 5,9^*$	$194,63 \pm 2,83^*$	$0,122 \pm 0,030$

¹ Largura do pico igual a 1,6 em todas as amostras.

² DP= desvio padrão.

I.P.= Índice de polidispersão.

*Indica diferença significativa ($p < 0,05$).

A análise estatística foi realizada através do teste *t-Student* entre as diferentes formulações.

O tamanho das diferentes formulações de NC produzidas foi significativamente ($P < 0,05$) afetado pela concentração de EREC presente nas amostras. A formulação contendo EREC na concentração de 1mg/mL apresentou um aumento ($P < 0,05$) do tamanho médio em

relação aos valores obtidos para NC brancas. Ambas as formulações contendo 0 e 1mg/mL de EREC mostraram-se monodispersas, considerando-se o índice de polidispersão menor que 0,3.

Os valores de potencial zeta das formulações mostram que tanto as NC brancas quanto as NC contendo EREC possuem carga negativa, sendo a última significativamente maior em relação à primeira.

2.2.3 Avaliação da porcentagem e eficiência de encapsulação

A porcentagem de encapsulação das NC contendo EREC foi determinada e os resultados mostram índices de encapsulamento de $82,59 \pm 2,40\%$ (n=6). Além disso, o resultado que avalia o processo de obtenção das NC (eficiência de encapsulação) apresentou um valor de $84,22 \pm 11,85\%$ (n=6).

2.2.4 Avaliação da solubilidade do EREC em PBS

A solubilidade do EREC em meio PBS foi determinada por CLAE. Dessa forma, após 24 horas de incubação a 37°C sob agitação pudemos verificar que a solubilidade do EREC em PBS é de $84,91 \pm 1,45\mu\text{g/mL}$.

2.2.5 Determinação da cinética de liberação do EREC

Os resultados referentes ao estudo de cinética de liberação estão representados na Figura 11.

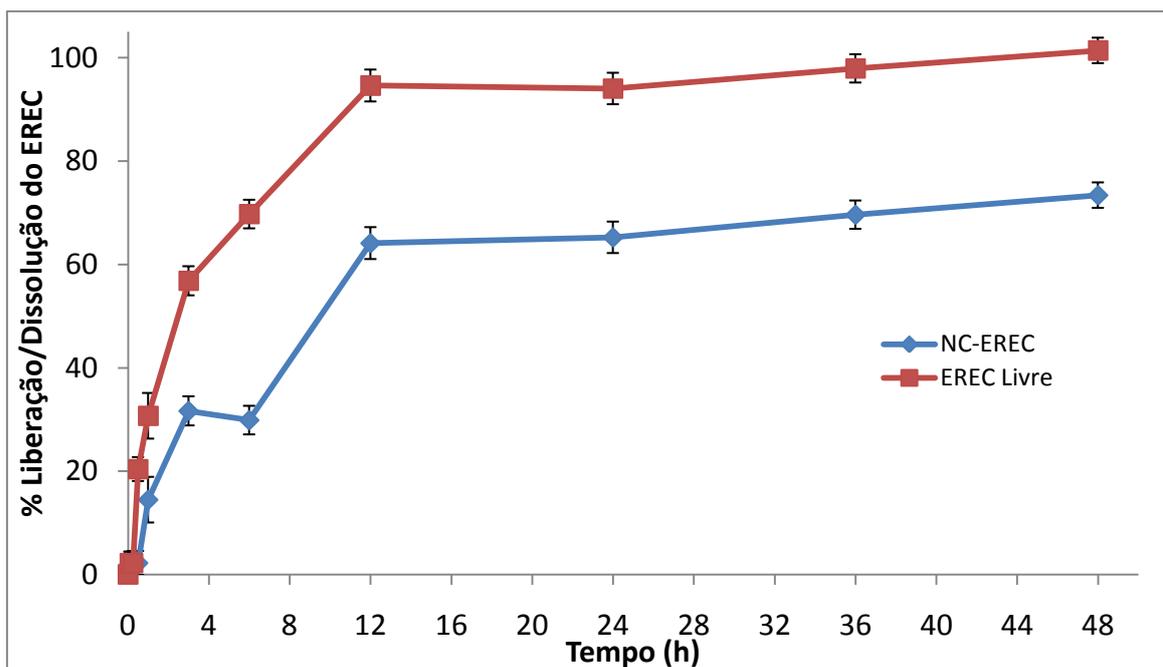


Figura 11. Perfil de dissolução/liberação *in vitro*, a 37°C, de EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 1mg/mL em meio PBS em condição sink (10% da solubilidade máxima do EREC no meio).

EREC = eremantolídeo C

NC-EREC = nanocápsulas contendo EREC

Observa-se que ambas as formulações de EREC demonstraram um perfil semelhante, com um efeito “burst” no tempo de 0-12 horas. Mais de 93% da substância foi dissolvida em 12h, tempo no qual apenas 65% de EREC foram liberados da formulação de NC. A partir desse tempo ocorre uma dissolução/liberação lenta em ambos os casos, até o tempo de 48h com a dissolução completa do EREC livre e uma quantidade inferior a 75% de liberação do EREC a partir das NC. A Tabela 13 descreve as equações obtidas com a modelização da cinética de dissolução do EREC e para a liberação do EREC a partir das NC.

Tabela 13. Modelização da dissolução e liberação do EREC.

Dissolução/Liberação	Até 12 horas		Após 12 horas	
	Equação	R^2	Equação	R^2
Dissolução do EREC	$y=17,669x^{0,8571}$	0,9601	$y=0,2021x+90,931$	0,8472
Liberação do EREC	$y=9,712x^{0,6205}$	0,9472	$y=0,2686x+60,041$	0,9536

y= porcentagem de dissolução/liberação;
x= tempo.

2.2.6 Análise morfológica das nanocápsulas

As imagens obtidas por MFA da formulação de NC nas diferentes concentrações de EREC (0 ou 1mg/mL), Figura 12, demonstram a presença de estruturas nanométricas esféricas depositadas sobre as camadas da mica recém clivada.

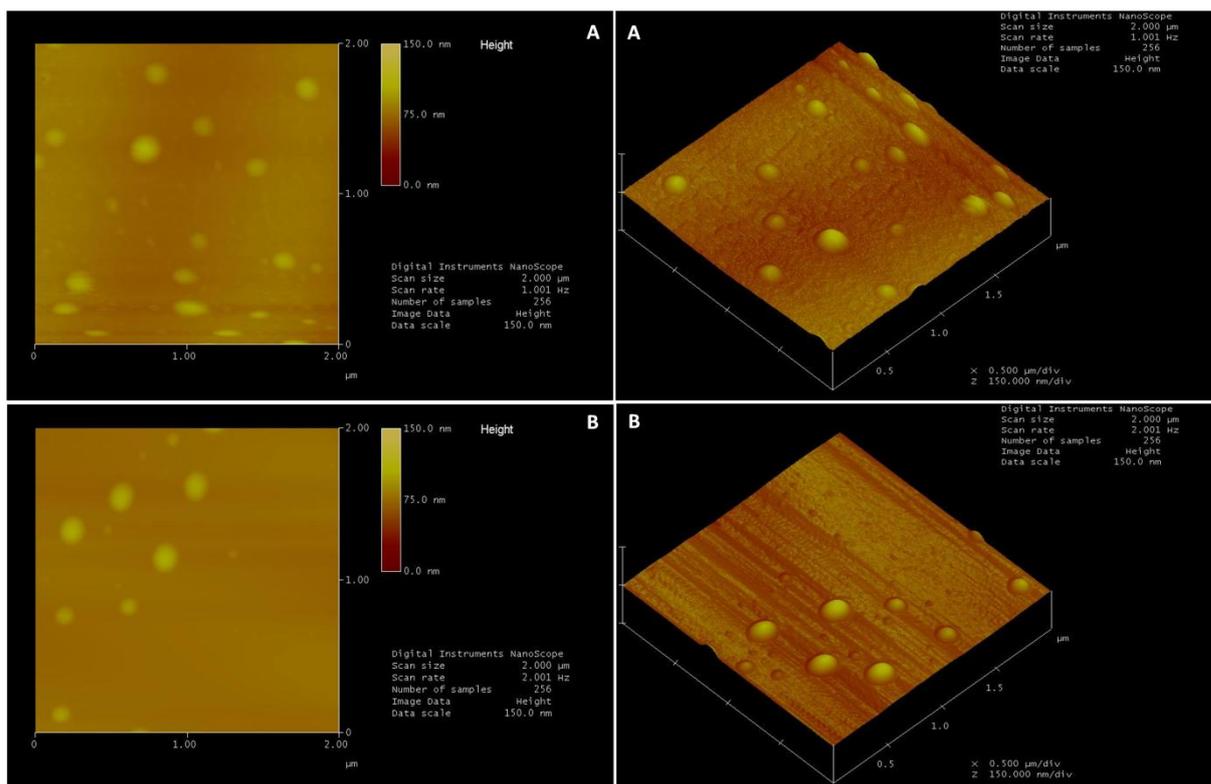


Figura 12. Imagens das nanocápsulas obtidas por MFA. (A) Nanocápsulas brancas; (B) Nanocápsulas contendo EREC. Área de 2,0µm x 2,0µm.

A análise de tamanho das NC por esta técnica revelou nanocápsulas brancas de $143,23 \pm 16,47\text{nm}$ e NC contendo EREC de $163,76 \pm 26,27\text{nm}$ de diâmetro.

A avaliação da presença de achatamento das nanocápsulas sobre a mica foi determinada pela relação diâmetro/altura das nanopartículas pela técnica de MFA, Figura 13, na qual foi possível observar uma relação de 7,1 para as diferentes formulações analisadas.

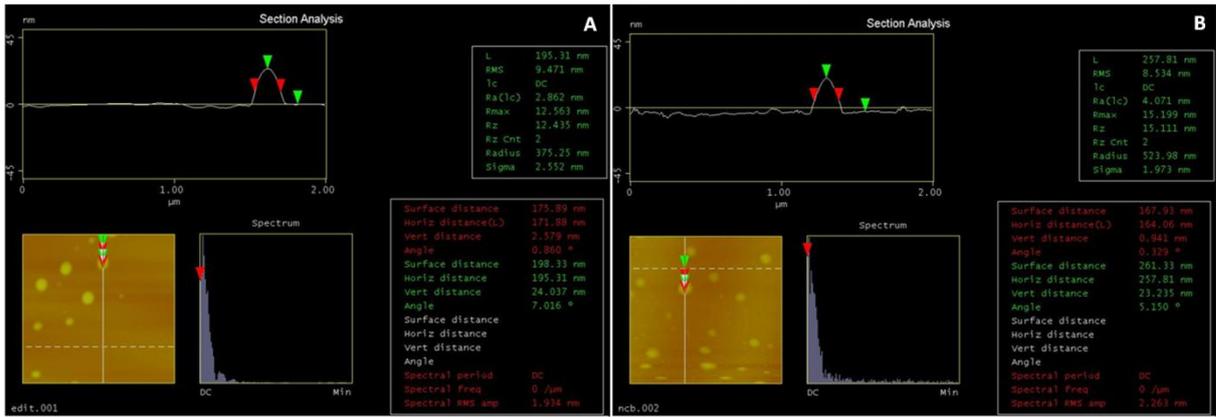


Figura 13. Avaliação da relação diâmetro/altura das nanocápsulas brancas e nanocápsulas contendo EREC. (A) Nanocápsulas brancas; (B) Nanocápsulas contendo EREC.

2.3 Discussão

Observa-se um aumento ($P < 0,05$) no tamanho das NC quando a concentração de EREC na formulação aumenta de 0 para 1mg/mL. Estudos realizados anteriormente descrevem resultados similares a esse (ABOUBAKAR *et al.*, 1999; MOSQUEIRA *et al.*, 2004; MOSQUEIRA *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2007). Esse aumento é uma indicação inicial de que o EREC encontra-se associado às NC, e que sua provável encapsulação no núcleo oleoso determina um aumento do volume hidrodinâmico das NC finais. O índice de polidispersão obtido por PCS revela homogeneidade entre os diâmetros das partículas presentes na amostra.

O aumento do potencial zeta com o aumento da concentração de EREC na formulação indica a modificação de cargas na superfície das NC relativas à adsorção da substância encapsulada na interface das NC com o meio externo. O mesmo efeito sobre o potencial zeta foi observado anteriormente com a encapsulação de outra molécula ativa contra *T. cruzi*, o albaconazol (BARROS, 2007).

O valor alto obtido na porcentagem de encapsulação do EREC nas NC reforça a hipótese de que o EREC encontra-se associado às NC, no núcleo e/ou na superfície. O resultado da solubilidade em PBS confirma a baixa solubilidade do EREC em meio aquoso, o que reforça a possibilidade de associação com os componentes oleosos das NC. Outros autores também observaram efeitos similares com fármacos de baixa solubilidade aquosa, como o diclofenaco, indometacina, entre outros (AMMOURY *et al.*, 1991; GUTERRES *et al.*, 1995; BARICHELLO *et al.*, 1999; LEGRAND *et al.*, 1999; BARRATT, 2000). Estudos realizados com halofantrino demonstram uma porcentagem de encapsulação para esse fármaco, que apresenta $\log P = 8,5$ (HUMBERSTONE *et al.*, 1996), superior a 95% (MOSQUEIRA *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2007), demonstrando assim que o valor do coeficiente octanol/água ($\log P$) pode ser um parâmetro útil na identificação de fármacos com potencial para uma encapsulação eficiente em NC poliméricas.

O perfil de liberação apresentado para o EREC demonstra o efeito de prolongamento da liberação produzido pelas NC se comparado ao perfil de dissolução da substância livre, estando de acordo com o descrito na literatura para sistemas vetorizados (LEGRAND *et al.*, 1999; COUVREUR *et al.*, 2002; HOARAU *et al.*, 2004; DE ASSIS *et al.*, 2008). O efeito “burst”

na formulação de NC se dá pela presença de substância não encapsulada e ainda pela adsorção de moléculas na superfície das NC, evidenciada pelas medidas de potencial zeta. Já a liberação lenta e incompleta de 12-48 horas demonstra a presença também de EREC associado ao núcleo oleoso das NC e a capacidade deste em reter essa substância, demonstrando que a liberação de fármaco das nanocápsulas se faz por partição óleo/água, estando de acordo com resultados apresentados na literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOSQUEIRA *et al.*, 2006).

A modelização realizada a partir dos dados de dissolução e liberação do EREC indica que até o tempo de 12 horas a cinética de dissolução/liberação segue a lei de potência, indicando um modelo que não segue o transporte/difusão de Fick. Esse modelo é chamado de não fickiano ou transporte anômalo, sendo que $0,5 < n < 1$ para a equação:

$$\frac{Mt}{M_{inf}} = at^n$$

Sendo, Mt/M_{inf} = porcentagem de dissolvida/liberada;
 a = constante que incorpora a geometria e estrutura do sistema.
 t = tempo (horas)

Equações como estas são frequentemente descritas para sistemas poliméricos de liberação modificada (COSTA *et al.*, 2001).

No entanto, após 12 horas, o perfil de dissolução liberação segue um modelo de cinética de ordem zero, Tabela 13, para fármacos pouco solúveis em meio aquoso, permitindo uma liberação lenta e prolongada do EREC no caso das NC.

As imagens produzidas por MFA foram de alta definição e forneceram uma visão tridimensional como descrito anteriormente (NEVES *et al.*, 1998). As análises de MFA demonstraram partículas com distribuição de tamanho uniforme e esféricas. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as partículas com ou sem EREC, demonstrando, dessa forma, que a presença da substância não leva a uma modificação na morfologia das partículas. A comparação entre os resultados obtidos pela técnica de PCS e MFA demonstrou partículas de tamanhos iguais ($P > 0,05$). Foi observado um achatamento das NC com relação ao diâmetro e a altura na superfície da mica, assim como descrito na literatura (DE ASSIS *et al.*, 2008). A relação diâmetro/altura obtido para as NC está de acordo com a hipótese de que as NC se achatam na superfície da mica (LEITE *et al.*, 2005) devido a sua flexibilidade e

presença de núcleo fluido em seu interior. Essa propriedade de achatamento das NC torna-se importante, pois é necessária a transposição de barreiras celulares, como as do endotélio, (LEITE *et al.*, 2005) para que alvos específicos sejam atingidos no organismo, especialmente no caso de tecidos infectados pelo *T. cruzi*.

CAPÍTULO 3

Validação da metodologia do MTT para *screening* de novos fármacos e de novas formulações nanoestruturadas

3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DO MTT PARA *SCREENING* DE NOVOS FÁRMACOS E DE NOVAS FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 *Materiais*

Para preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas nos testes *in vitro* foram utilizadas as substâncias MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma Aldrich, EUA), PMS, metassulfato de phenazina (Sigma Aldrich, EUA), SDS, dodecil sulfato de sódio (VETEC, Brasil), DMF, dimetilformamida (TEDIA, Brasil), infusão de fígado, NaCl, KCl, Na₂PO₄.7H₂O, triptose, hemina, glicose, soro fetal bovino e estreptomicina.

A água utilizada foi purificada no aparelho Symplicity® System 185 (Millipore, EUA).

3.1.2 *Preparação do meio “Liver Infusion Tryptose” (LIT)*

O meio de cultura utilizado para cultivo das formas epimastigotas do parasito foi o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT), idealizado por Yager e popularizado em estudos *in vitro* por Camargo (CAMARGO, 1964). Para preparação do meio de cultura foram utilizados 0,5% (p/v) de infuso de fígado, 0,4% (p/v) de NaCl, 0,04% (p/v) de KCl, 1,5% (p/v) de Na₂PO₄.7H₂O, 0,5% (p/v) de triptose, 0,3% de hemina, 0,4% (p/v) de glicose, 10% (v/v) de soro fetal bovino e 0,006% (p/v) de estreptomicina. Assim, 2,5g de infuso de fígado foram solubilizados em água MilliQ até obtenção de um volume de 25mL. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e denominada solução A. Em uma segunda etapa, 2g de NaCl, 0,2g de KCl, 7,54g de Na₂PO₄.7H₂O e 2,5g de triptose também foram solubilizados em água e acrescidos de 1,5mL de hemina. A esta solução foi adicionada água MilliQ até obtenção de um volume final de 125mL. O pH da solução foi corrigida até o valor de 7,2 com HCl 0,01M. Ao final, a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e denominada

solução B. Já na terceira etapa, 2g de glicose foram solubilizados em água até obtenção de um volume final de 5mL. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e denominada solução C. Por fim, procedeu-se a preparação do meio LIT propriamente dito, diante da mistura das soluções A, B e C acrescidas de 50mL de soro fetal bovino, 0,03g de estreptomicina e água MilliQ até obtenção de um volume final de 500mL. O meio foi armazenado à temperatura ambiente em garrafas de 250mL estéreis. Esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar para garantia de esterilidade do meio de cultura.

O meio produzido foi armazenado durante uma semana e verificado ao término desse período, por microscopia óptica, quanto ao crescimento de fungos e bactérias, sendo então aprovado para utilização.

3.1.3 Preparo das soluções para o teste do MTT

As soluções para o teste do MTT foram preparadas como descrito por Muelas-Serrano (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000). A solução de MTT-PMS foi preparada numa concentração de 2,5mg de MTT/mL e 0,22mg de PMS/mL. Para isso, 25mg de MTT foram solubilizados em solução salina 0,85% até obtenção de um volume final de 5mL. Uma segunda solução contendo 2,2mg de PMS foi preparada até obtenção de um volume final de 5mL. Ao final, a solução de PMS foi adicionada à solução de MTT obtendo assim a solução MTT-PMS num volume final de 10mL. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,22µm, em capela de fluxo laminar, para garantir a ausência de microrganismos.

A solução de SDS foi preparada a 10% (p/v). Para isso, 10g de SDS foram solubilizados em 50mL de DMF e acrescidos de água MilliQ até obtenção de um volume final de 100mL. A solução obtida foi filtrada em filtro de papel a fim de retirar qualquer precipitado. Ao final, o pH da solução foi ajustado para 4,7 com HCL 0,01M e filtrada em membrana de 0,22µm, em capela de fluxo laminar, para garantir a ausência de microrganismos.

3.1.4 Determinação da cinética de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* in vitro

A cinética de crescimento das formas epimastigotas da cepa Y do parasito foi determinada a fim de definir a fase de crescimento exponencial, para que essa fosse utilizada nos experimentos que seriam realizados. Para essa determinação utilizou-se a metodologia descrita por De Maio e Urbina (DE MAIO *et al.*, 1984) em que $2,0 \times 10^6$ epimastigotas/mL foram incubados em tubos *Falcon* de 15mL, estéreis, num volume total de 3,0mL de meio de cultura a 28°C. Em intervalos de 24 horas, durante 15 dias, a densidade de parasitos no meio de cultura foi determinada por contagem microscopia com auxílio da câmara de Neubauer.

O experimento foi realizado em quatro réplicas (n=4) e ao final a densidade celular entre os 15 dias foram comparadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), uma vez que se observou normalidade dos dados analisados.

3.1.5 Padronização da metodologia do MTT

A metodologia do MTT foi reproduzida em nosso laboratório como descrita por Muelas-Serrano (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000). Foram incubados em placas de 24 poços os parasitos em quatro concentrações diferentes, sendo 0,5, 2,0, 3,0 e $6,0 \times 10^6$ epimastigotas/mL.

Para isso, 1mL de meio de cultura contendo os parasitos na concentração definida foi adicionada a cada poço. Além disso, foram avaliados poços controle contendo apenas meio LIT ou solução salina 0,85% e traçada uma curva de calibração contendo as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 8,0 e $10,0 \times 10^6$ epimastigotas/mL. Ao final do plaqueamento realizou-se a lavagem das placas e centrifugação a 2500rpm, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e, a cada poço, foi adicionado 1mL de solução salina 0,85%. Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes consecutivas, com o objetivo de eliminar a turbidez do meio adquirida com a adição de nanopartículas. Ao final da terceira lavagem foram adicionados apenas 900µL de solução salina. A cada poço foram adicionados 100µL da solução MTT-PMS previamente preparada. As placas foram incubadas em agitação a 1500rpm, à temperatura ambiente por 75 minutos. Ao final desse tempo foi adicionado a cada poço 1mL da solução de SDS e uma nova incubação foi feita, sendo dessa

vez a 37°C por 30 minutos. Por fim, foi realizada a leitura das placas a 570nm. O experimento foi realizado em quatro réplicas e ao final, por apresentar normalidade nos dados e igualdade das variâncias, as densidades celulares foram comparadas pelo teste de análise de variância (ANOVA).

3.1.6 Validação da metodologia do MTT

A validação da metodologia do MTT se deu em comparação à metodologia de avaliação de drogas *in vitro* utilizando contagem microscópica por câmara de Neubauer (DE MAIO *et al.*, 1984).

Para isso, foi avaliada a especificidade do método, a linearidade, precisão, exatidão e ainda uma comparação estatística entre os valores determinados por contagem através da câmara de Neubauer e os valores obtidos através do método do MTT. Os grupos avaliados foram controle não tratado, tratado com nanocápsulas brancas, tratado com DMSO (até 1,0% do volume final da cultura), tratado com miconazol (MCZ) na concentração de 1,15mg/mL, grupos contendo parasitos nas concentrações de 0,5, 2,0 e 6,0x10⁶ epimastigotas/mL e grupo contendo apenas meio LIT sem parasito. A curva de calibração foi construída com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 8,0 e 10,0x10⁶ epimastigotas/mL.

Assim, os grupos não-tratado, tratado com nanocápsulas brancas, tratado com DMSO e tratado com MCZ foram inicialmente plaqueados com 900µL do meio de cultura contendo 2x10⁶ epimastigotas/mL previamente determinado por contagem em câmara de Neubauer. A cada grupo tratado foram adicionados 100µL da substância a ser testada. A incubação da placa foi realizada a 28°C durante 96 horas. Ao final desse tempo os demais grupos foram plaqueados, juntamente com a curva de calibração e foram avaliados, juntamente com os grupos testes pela metodologia do MTT previamente padronizada.

A especificidade do método foi avaliada por comparação da absorbância obtida na concentração 0,5 epimastigotas/mL em relação ao grupo contendo apenas meio LIT. A linearidade do método foi avaliada pela curva de calibração obtida. A precisão e exatidão foram determinadas a partir das concentrações de 0,5, 2,0 e 6,0 epimastigotas/mL. Por fim, a similaridade entre as metodologia da câmara de Neubauer e MTT foi realizada através da

comparação estatística entre os grupos controle não-tratado, tratado com nanocápsulas brancas, tratado com DMSO e tratado com MCZ.

Cada grupo foi avaliado em quatro réplicas e ao final as densidades celulares determinadas entre as técnicas foram comparadas pelo teste *t-Student*, uma vez que se observou normalidade dos dados analisados.

3.2 Resultados

3.2.1 Determinação da cinética de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* in vitro

A cinética de crescimento das formas epimastigotas do parasito foi determinada e está representada na Figura 14.

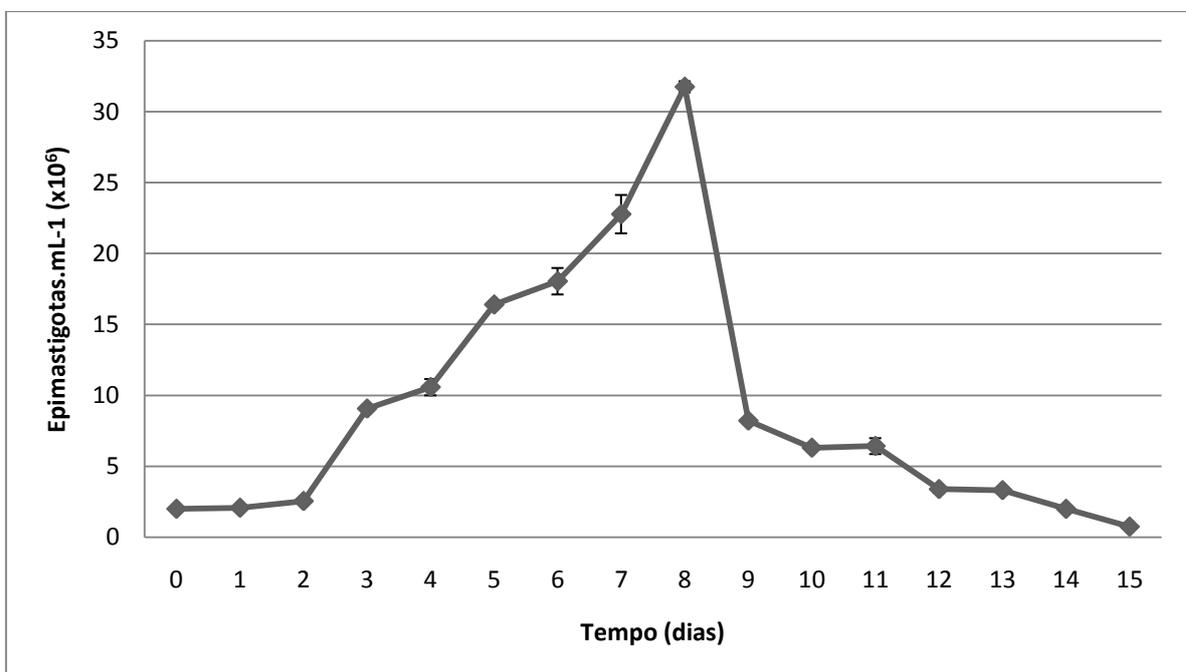


Figura 14. Cinética de crescimento das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* in vitro.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey entre os diferentes tempos.

Ocorreu um lento crescimento dos parasitos nos dois primeiros dias, entretanto, a partir desse até o oitavo dia ocorreu um crescimento exponencial dos mesmos. A partir do oitavo dia, iniciou-se uma fase de decaimento da curva, voltando, no décimo quinto dia, a densidade celular igual ao inicial ($P > 0,05$). Além disso, entre o nono e o décimo segundo dia foi observada no meio de cultura, além das formas epimastigotas, a presença de formas tripomastigotas.

3.2.2 Padronização e validação da metodologia do MTT

A padronização e validação da metodologia do MTT foi feita segundo a literatura para avaliação de drogas *in vitro* contra o *T. cruzi* (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000). A curva de calibração para avaliação da linearidade foi construída nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 8,0 e 10,0x10⁶ epimastigotas/mL e está representada na Tabela 14 e na Figura 15.

Tabela 14. Linearidade metodologia do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Concentração de <i>T. cruzi</i> (epimastigotas/mL)	Absorbância média (570nm) ^a ± DP ¹	CV ² %
0,5x10 ⁶	0,031±0,001	3,72*
1,0x10 ⁶	0,061±0,0015	2,42*
2,0x10 ⁶	0,121±0,001	1,1*
4,0x10 ⁶	0,253±0,001	0,59*
8,0x10 ⁶	0,516±0,003	0,67*
10,0x10 ⁶	0,632±0,002	0,34*

^an=4;

¹Desvio padrão;

²Coefficiente de variação.

Critério de aceitação: CV%<5% (ANVISA, 2003). * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

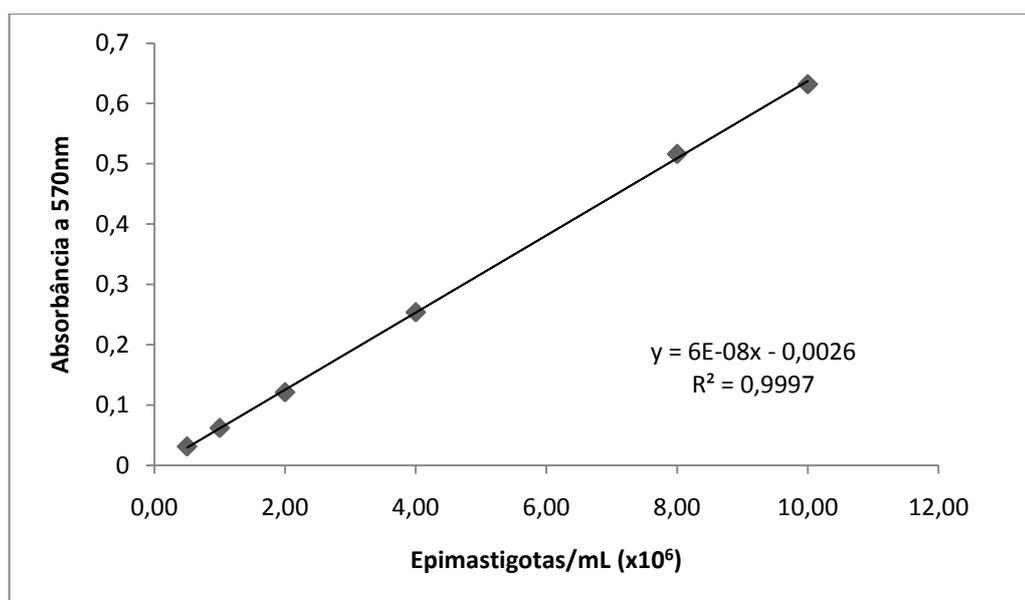


Figura 15. Curva de calibração para padronização e validação da metodologia do MTT.

Após análise da precisão, exatidão e coeficiente de correlação da curva de calibração,

pode-se afirmar que existe uma linearidade da metodologia do MTT entre os valores de $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ epimastigotas/mL.

A especificidade do método foi avaliada levando-se em consideração o limite de quantificação do método, isto é, o menor valor capaz de ser quantificado em nossa curva de calibração. Dessa forma, a especificidade do método foi avaliada em relação à concentração de $0,5 \times 10^6$ epimastigotas/mL comparativamente a grupos contendo apenas meio LIT ou solução salina 0,85%. Os resultados obtidos em relação à especificidade do método estão representados na Tabela 15.

Tabela 15. Especificidade da metodologia de do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Amostra	Epimastigotas.mL ⁻¹	Absorbância ± DP ¹
Solução salina	0,0	0,000
Meio LIT	0,0	0,000
Meio LIT	$0,5 \times 10^6$	$0,031 \pm 0,001^*$

¹DP= desvio padrão.

Critério de aceitação da especificidade: absorbância dos grupos controle <15% em relação ao limite de quantificação. * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

A precisão e exatidão da metodologia foram avaliadas utilizando-se as concentrações de $0,5$, $3,0$ e $6,0 \times 10^6$ epimastigotas/mL. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Precisão e exatidão da metodologia do MTT. Avaliação feita com as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Concentração teórica (epimastigotas.mL ⁻¹)	Absorbância ± DP ¹	Concentração real (epimastigotas.mL ⁻¹)	Precisão (%)	Exatidão (%)
$0,5 \times 10^6$	$0,030 \pm 0,0006$	492206,00	1,903*	102,85*
$3,0 \times 10^6$	$0,186 \pm 0,0014$	977604,58	0,760*	98,26*
$6,0 \times 10^6$	$0,369 \pm 0,0030$	2094021,31	0,809*	96,88*

¹DP= desvio padrão.

Critério de aceitação: absorbância dos precisão <5,0%, exatidão 95-105%. * indica valores dentro dos critérios de aceitação.

Por fim, foi feita comparação entre a técnica de avaliação de drogas utilizando câmara de Neubauer e a metodologia do MTT. Os resultados são apresentados na Figura 16.

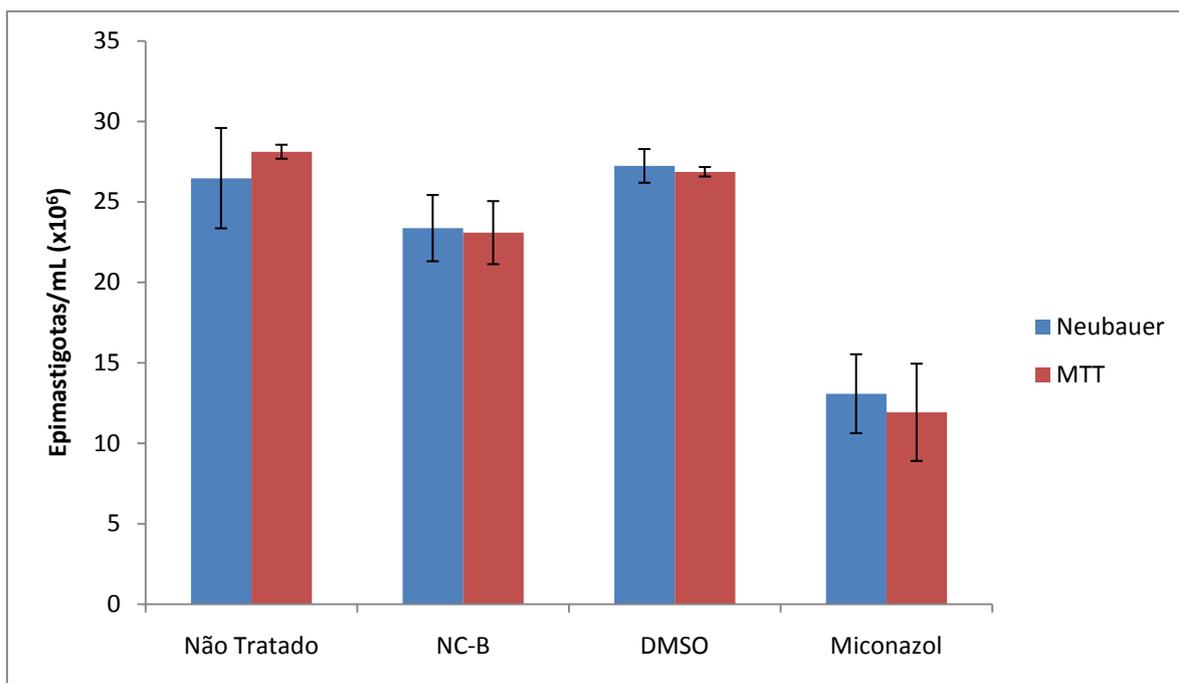


Figura 16. Comparação entre metodologia da câmara de Neubauer e MTT.

A análise estatística foi realizada através do teste *t-Student* entre os grupos analisados pela metodologia utilizando câmara de Neubauer e MTT. * indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). NC-B = nanocápsulas brancas.

3.3 Discussão

A cinética de crescimento das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* demonstrou um perfil exponencial estando de acordo com estudos feitos em trabalhos anteriores (LARRALDE *et al.*, 1988; URBINA *et al.*, 1990; URBINA *et al.*, 1991; URBINA *et al.*, 2000). A queda no número de parasitos a partir do 8º dia está relacionado a morte dos parasitos, provavelmente, devido ao esgotamento do meio e de nutrientes essenciais para o metabolismo e crescimento dos mesmos.

Essa hipótese de esgotamento do meio de cultura ganha reforço com o achado de formas tripomastigotas metacíclicas a partir do 9º dia. Estudos anteriores demonstram que o estresse nutricional causado pela baixa concentração de glicose no meio é um fator importante de indução da diferenciação das epimastigotas (FIGUEIREDO *et al.*, 2000; DE LIMA *et al.*, 2007). Assim, determinou-se o período de 0 a 96 horas para avaliação da atividade do EREC pois, dessa forma, com estudo da atividade ocorrendo ainda numa fase inicial de crescimento na qual o meio de cultura apresenta todos os nutrientes disponíveis ao parasito, consegue-se inibir ao máximo esses fenômenos por esgotamento do meio.

A padronização e validação da metodologia do MTT para avaliação de fármacos nanoestruturados contra o *T. cruzi in vitro* apresentou concordância com estudos anteriormente descritos na literatura (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000). Diante dos resultados pode-se afirmar que a metodologia é específica na quantificação de amostras contendo o parasito mesmo em presença de meio LIT ou solução salina 0,85%. Além disso, por apresentar valores de coeficiente de variação inferiores a 5% e erro padrão relativo entre 95-105%, podemos considerar a metodologia validada.

Não foi detectada diferença significativa entre os valores obtidos pela metodologia do MTT e por câmara de Neubauer.

Dessa forma, como descrito anteriormente (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000), a metodologia do MTT é uma alternativa para *screening in vitro* de novos compostos, incluindo nanoestruturas poliméricas, de alta precisão e exatidão de análise. Nesse método desenvolvido para interferentes turvos como as nanocápsulas, a turbidez é eliminada pelas lavagens e centrifugações, possibilitando o seu uso para *screening* de fármacos pouco

solúveis, extratos de plantas, e formulações farmacêuticas na forma de suspensões grosseiras e coloidais. Além disso, possibilita avaliação de diversos compostos em apenas 96 horas, sem um trabalho exaustivo, como ocorre pela utilização da câmara de Neubauer. Esse método pode ser também empregado para *screening* de novos compostos ativos contra outros protozoários da família Trypanosomatidae.

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade do eremantolídeo C *in vitro* e *in vivo*

4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EREMANOLÍDEO C *IN VITRO* E NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Avaliação da atividade do Eremantolídeo C *in vitro*

A avaliação da atividade do Eremantolídeo C (EREC) *in vitro* se deu tanto na forma livre quanto na forma nanoencapsulada (NC). As concentrações avaliadas foram de 10, 30, 50, 100 e 200µg/mL. Para esse estudo seguiu-se a metodologia do MTT previamente padronizada e validada em nosso laboratório.

Para isso, foram utilizadas placas contendo 24 poços. A cada poço foi adicionado 900µL da cultura contendo 2×10^6 epimastigotas, previamente determinada por contagem microscópica através da câmara de Neubauer. A cada poço foi adicionado 100µL da concentração da substância a ser testada (EREC). Dessa forma, ao final, iniciou-se a cultura com 2×10^6 epimastigotas/mL.

Além das amostras teste, foram utilizados como grupos controle: (1) não tratado (culturas contendo 2×10^6 epimastigotas/mL); (2) 100µL de NC brancas; (3) 100µL de DMSO. Ao controle (1), foi adicionado 100µL de solução salina 0,85% a fim de obter o volume final de 1mL sem adição de meio ou glicose, que poderia servir como nutriente aos parasitos.

A densidade celular foi então determinada pela absorbância obtida entre amostras teste e a absorbância obtida na curva de calibração construída com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 8,0 e $10,0 \times 10^6$ epimastigotas/mL. O crescimento celular de epimastigotas foi calculado pela equação:

$$\text{Crescimento celular} = \left(\frac{\text{Densidade celular final} \times 96 \text{ horas}}{\text{Densidade celular inicial}} \right) - 1$$

A porcentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = 100 - \left[\left(\frac{\text{crescimento grupo tratado}}{\text{crescimento em não tratado}} \right) \times 100 \right]$$

Cada amostra foi avaliada em três réplicas (n=3) e ao final dos experimentos, por apresentarem normalidade e igualdade das variâncias, os dados foram comparados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Dunnet* para comparação dos grupos tratados em relação ao controle não tratado.

4.1.2 Avaliação da atividade do Eremantolídeo C in vivo

4.1.2.1 Animais experimentais

Para os experimentos foram utilizados 90 camundongos Swiss fêmeas com aproximadamente 30 dias de vida e pesando em torno de 18-20g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais sendo, cada grupo, com um total de 06 camundongos:

Via oral:

- controle não tratado;
- tratado com NC-branca;
- tratado com placebo;
- tratado com Bz 500mg/Kg;
- tratado com ITZ 500mg/Kg;
- tratado com EREC livre 500mg/Kg;
- tratado com EREC nanoencapsulado 500mg/Kg.

Via endovenosa:

- controle não tratado;
- tratado com NC-branca;

- tratado com placebo;
- tratado com Bz 15mg/Kg;
- tratado com Bz 20mg/Kg;
- tratado com Bz 25mg/Kg;
- tratado com Bz 50mg/Kg;
- tratado com EREC livre 10mg/Kg;
- tratado com EREC nanoencapsulado 10mg/Kg.

Após infecção e durante os experimentos os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum* e em ciclos de claro/escuro de 12 horas no prédio do Biotério Central. Todos os experimentos seguiram as normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFOP.

4.1.2.2 Inoculação dos animais

Os animais foram inoculados com a cepa Y de *T. cruzi* por via intraperitoneal com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos por animal. Os parasitos foram provenientes de passagens sucessivas em camundongos.

4.1.2.3 Substâncias e drogas utilizadas

O BZ, ITZ e EREC foram utilizados na sua forma livre, e ainda, este último na forma nanoestruturada para o estudo de eficácia anti-*T. cruzi* em modelo murino. As formulações utilizadas para tratamento endovenoso foram isotonizadas com glicose 5% p/v antes do tratamento.

4.1.2.4 Tratamento por via oral

Cada grupo experimental foi composto de 06 animais. Os experimentos foram acompanhados de um grupo controle não tratado, grupo controle tratado com placebo, grupo controle tratado com NC não carregadas de fármacos (brancas). Os animais foram tratados por gavagem. O volume administrado aos animais tratados foi 0,3mL. Quando necessário, os animais receberam mais de uma fração de droga em intervalos de 10 minutos. Além dos animais pertencentes aos grupos controles, foram avaliados animais tratados com BZ, ITZ, EREC livre e EREC nanoencapsulado, em dose única de 500mg/Kg no quarto dia após a infecção.

4.1.3 Tratamento por via endovenosa

Cada grupo experimental foi composto de 06 animais. Os experimentos foram acompanhados de: (1) grupo controle não tratado, (2) grupo tratado com placebo (DMA-PEG), (3) grupo tratado com nanocápsulas não carregadas de fármacos (brancas). Os animais foram tratados por via endovenosa. O volume administrado aos animais tratados foi de no máximo 0,25mL. Quando necessário, os animais receberam mais de uma fração de droga em intervalos de 30 minutos. Além dos grupos controles, foram avaliados grupos tratados com BZ, EREC livre e EREC nanoencapsulado. O tratamento dos animais foi realizado diariamente durante 10 dias, iniciando um dia após a infecção com doses de 10mg/Kg/dia a cada 24 horas.

4.1.3.1 Avaliação dos animais

Os animais infectados foram avaliados diariamente para a determinação da parasitemia e da sobrevivência. A parasitemia foi avaliada por exame de sangue a fresco, coletado pela veia da cauda (5 μ L de sangue), sendo o número de parasitos determinado por microscopia ótica através da avaliação de 50 campos aleatórios em uma lamínula de 22x22cm segundo a técnica descrita por Brener (BRENER, 1962). Os resultados foram coletados e utilizados para se traçar a curva de parasitemia e sobrevivência. As curvas de parasitemia dos animais foram comparadas pela área sob a curva (AUC) pelo teste não-

paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. A sobrevivência dos animais foi determinada pelo teste de Kaplan-Maier e comparadas pelo teste de long-rank.

4.2 Resultados

4.2.1 Avaliação da atividade do Eremantolídeo C *in vitro*

As densidades celulares obtidas experimentalmente encontram-se representadas nas Figura 17.

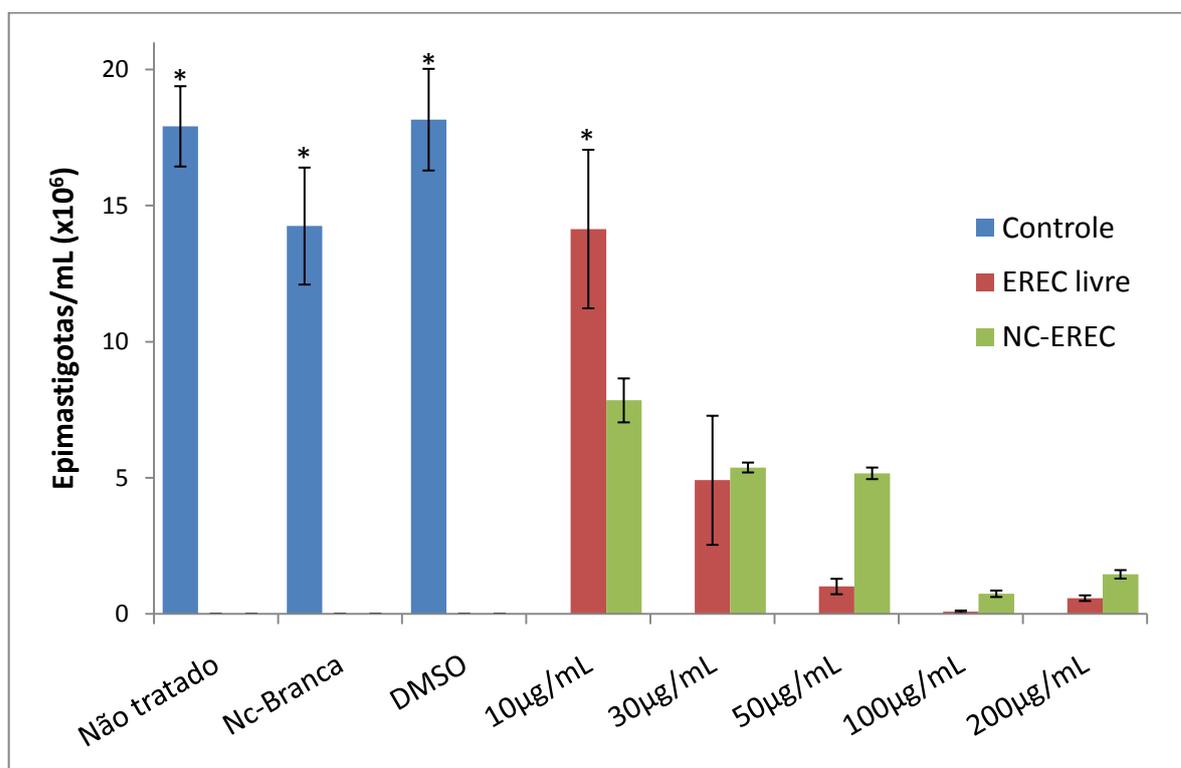


Figura 17. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* do Eremantolídeo C, livre ou nanoencapsulado, utilizando as formas epimastigotas da cepa Y.

A análise estatística entre os grupos foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett para comparação dos grupos tratados em relação ao grupo controle. * não existe diferença significativa ($P > 0,05$) se comparado ao grupo controle não tratado.

Ao final do experimento, apenas os grupos tratados com NC branca, DMSO e EREC livre na concentração de 10µg/mL não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) na densidade celular quando comparados com o grupo controle não tratado.

Uma menor densidade celular ($P < 0,05$) foi demonstrada para as concentrações 50, 100 e 200µg/mL em relação a concentração de 10 e 30µg/mL. Entretanto, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos tratados com EREC livre nas concentrações de 50, 100 e

200 µg/mL.

Não houve diferença na densidade celular ($P>0,05$) nos grupos tratados com NC contendo EREC na concentração de 10, 30 e 50 µg/mL e ainda entre os grupos tratados com 100 e 200 µg/mL. Entretanto, estas concentrações apresentaram atividade significativamente maior ($P<0,05$) do que aquelas.

Os resultados da comparação entre EREC livre e nanoencapsulado estão apresentados na Figura 18.

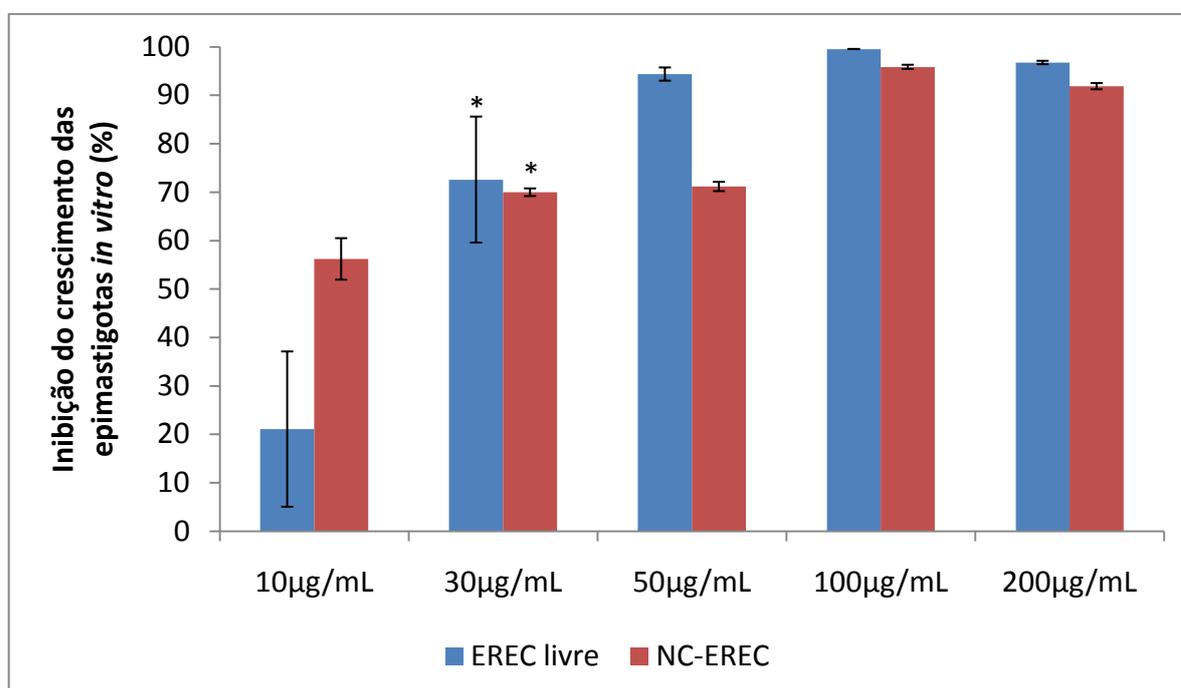


Figura 18. Comparação entre a inibição do crescimento das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* in vitro quando tratadas com diferentes concentrações de Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado.

A análise estatística foi realizada através do teste *t-Student*, entre as diferentes formas farmacêuticas na mesma concentração. * não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$).

Não foi observada diferença significativa ($P<0,05$) na inibição do crescimento das epimastigotas nas formulações de 30 µg/mL. Na concentração de 10 µg/mL observa-se uma maior atividade ($P<0,05$) do EREC nanoencapsulado se comparado à substância livre. Por outro lado, nas concentrações de 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹ pode-se observar uma maior atividade ($P<0,05$) da substância livre em relação à substância nanoencapsulada.

4.2.2 Avaliação da atividade do Eremantolídeo C in vivo

4.2.2.1 Avaliação do tratamento por via oral

A curva de parasitemia e sobrevivência dos animais tratados por via oral com 500mg/kg de EREC livre ou nanoencapsulado em dose única e com as demais drogas (BZ e ITZ) estão representados na Figura 19 e Figura 20, respectivamente.

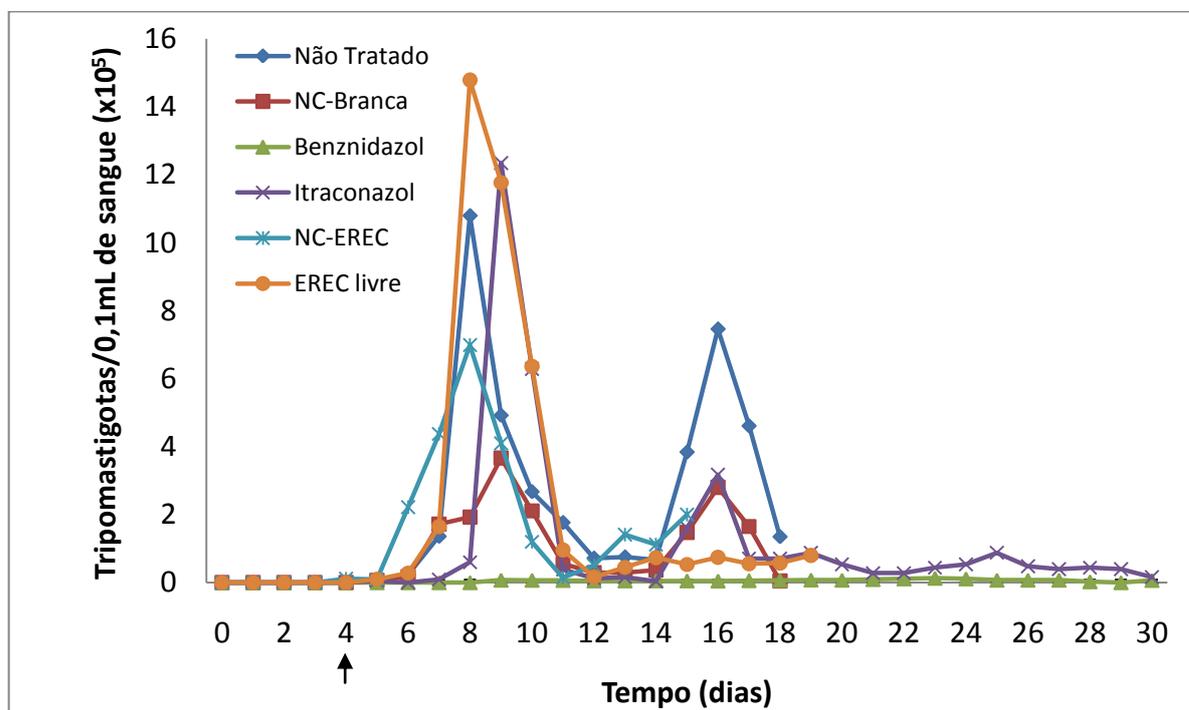


Figura 19. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral com 500mg/Kg de BZ, ITR, EREC livre ou nanoencapsulado.

NC=nanocápsulas;

EREC=Eremantolídeo C;

O dia do tratamento está indicado por ↑.

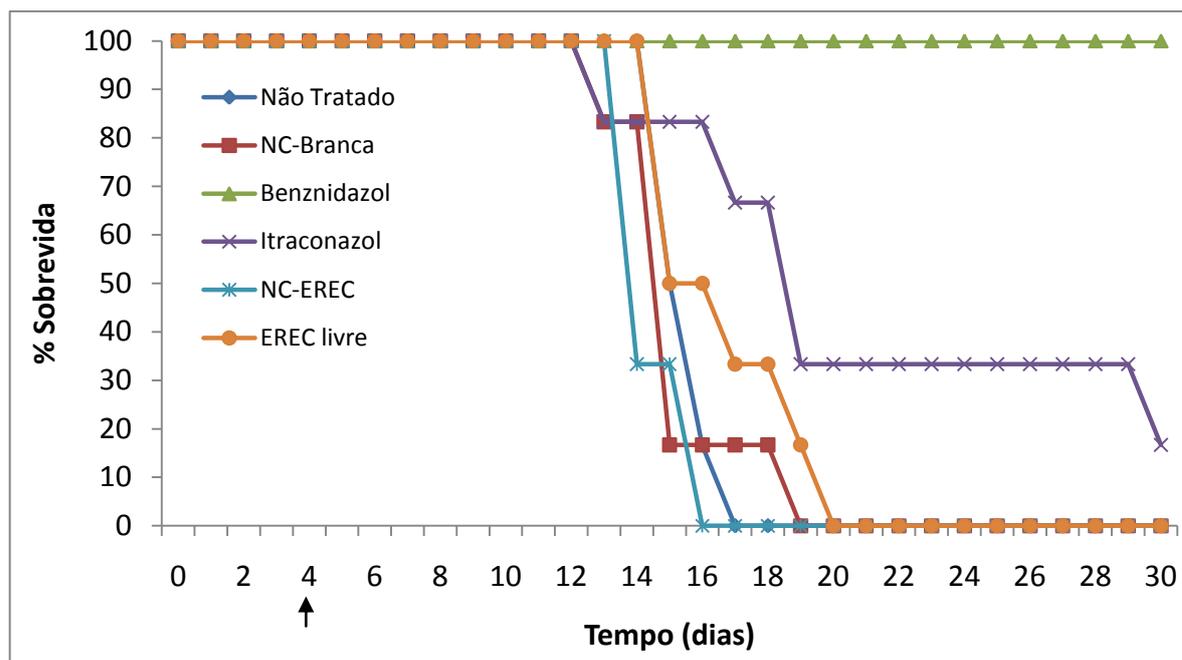


Figura 20. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral com 500mg/Kg de BZ, ITR, EREC livre ou nanoencapsulado.

NC=nanoencapsulas;

EREC=Eremantolídeo C;

O dia do tratamento está indicado por ↑.

Os resultados obtidos por análise da AUC no gráfico de parasitemia demonstram que apenas o BZ apresentou uma redução dos níveis de parasitemia ($P < 0,05$) se comparado ao grupo controle não tratado (Tabela 17). Além disso, somente o grupo tratado com BZ apresentou valor máximo de parasitemia significativamente diferente ($P < 0,05$) do grupo não tratado.

Tabela 17. Dados dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com $500 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BZ, itraconazol, EREC livre ou nanoencapsulado.

Grupo	Durante o tratamento			
	AUC ³	Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima
Não Tratado	$3.215.000 \pm 1.470.000$	0/6	$1.284.000 \pm 673.954$	8
NC-Branca	$1.187.000 \pm 312.596$	0/6	366.667 ± 256.283	9
BZ	$148.333 \pm 39.868^*$	0/6	$13.000 \pm 11.009^*$	23
Itraconazol	$2.591.000 \pm 1.317.000$	0/6	$1.234.667 \pm 681.564$	9
EREC livre	$3.801.000 \pm 1.231.000$	0/6	$1.478.667 \pm 986.740$	8

NC-EREC	2.144.000 ± 1.069.000	0/6	699.333 ± 810.888	9
---------	-----------------------	-----	-------------------	---

¹Avaliada durante 30 dias após o tratamento;

²DP = desvio padrão;

³AUC= área sob a curva, com análise estatística realizada pelo teste de Kolmogorv Smirnov.

Análise estatística da parasitemia máxima realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis devido à ausência de normalidade dos dados e igualdade das variâncias. * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

Na Tabela 18 observa-se que apenas os grupos dos animais tratados com BZ e ITR apresentaram um tempo médio de sobrevivência superior (P<0,05) ao grupo dos animais não tratados. Observa-se ainda que o tempo de sobrevivência dos animais tratados com BZ foi maior (P<0,05) do que dos animais tratados com ITZ.

Tabela 18. Dados da sobrevivência dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* e tratados com $500 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BZ, itraconazol, EREC livre ou nanoencapsulado por via oral em dose única.

	Grupo	Sobrevivência	TMS ¹ (dias)
Controles	Não tratado	0/6	15
	NC-Branca	0/6	11
Testes	BZ*	6/6	>30
	Itraconazol*	1/6	17
	EREC Livre	0/6	11
	NC-EREC	0/6	11

¹TMS= tempo médio de sobrevivência;

Análise estatística foi realizada pelo teste de long rank (Mantel-Cox). * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

4.2.2.2 Avaliação do tratamento utilizando BZ via endovenosa

A curva de parasitemia e sobrevivência dos animais tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e $50 \text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, por 10 dias, está representada na Figura 21 e Figura 22, respectivamente.

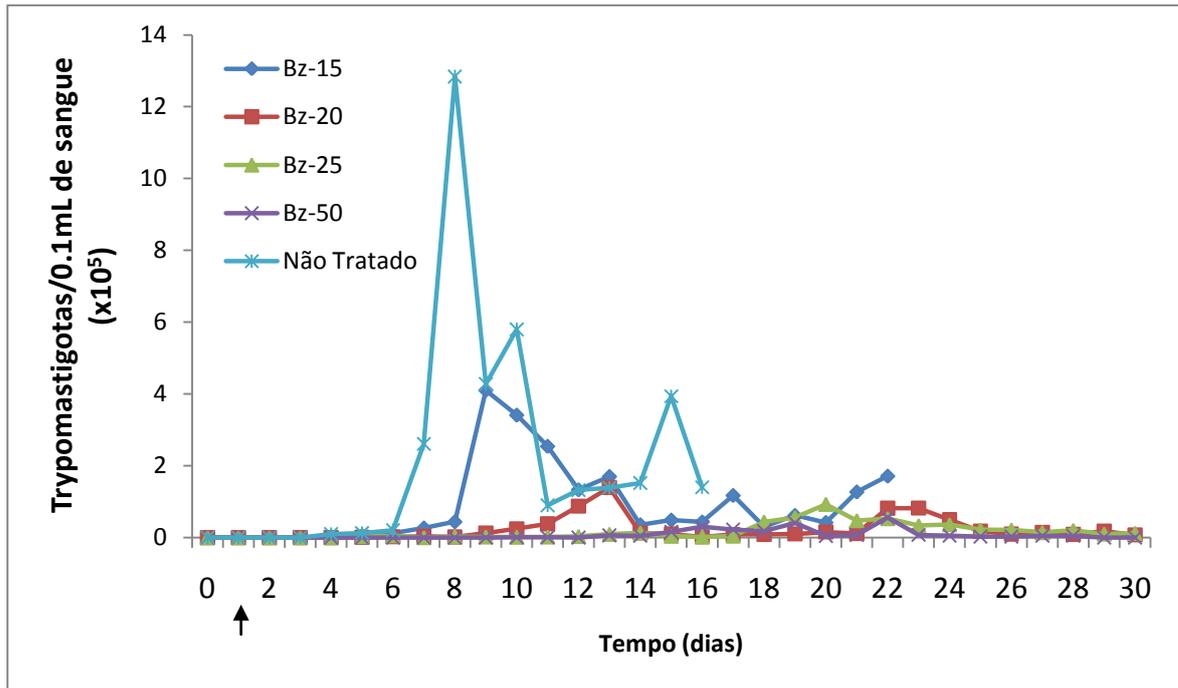


Figura 21. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com diferentes concentrações de BZ por 10 dias.

BZ= benznidazol;

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

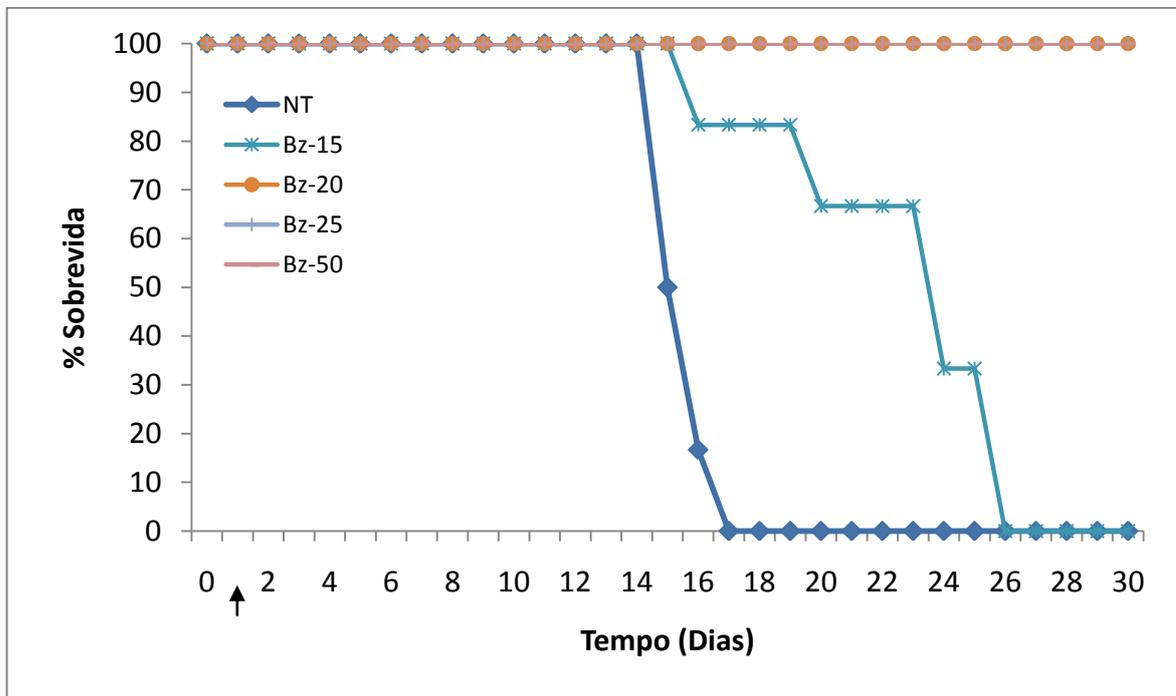


Figura 22. Curva de sobrevida de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com diferentes concentrações de BZ por 10 dias.

BZ= benznidazol.

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

Os resultados obtidos por análise da AUC, Tabela 19, demonstram que todas as concentrações de BZ utilizadas no tratamento promoveram uma redução ($P < 0,05$) dos níveis de parasitemia se comparados ao grupo controle não tratado. Observa-se também que não existe uma diferença ($P > 0,05$) entre os grupos tratados com BZ nas concentrações de 20,0 e 25,0mg/kg/dia.

Tabela 19. Dados dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com BZ, por via endovenosa durante 10 dias, em diferentes concentrações. O tratamento foi iniciado no 1º dia após a infecção.

Grupo	Durante o tratamento			
	AUC ³	Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima
Não Tratado	3.215.000 ± 1.470.000	0/6	1.284.000 ± 673.954	8
BZ-15mg.kg ⁻¹	2.173.000 ± 1.024.000*	0/6	428.000 ± 548.715	25
BZ-20mg.kg ⁻¹	671.333 ± 323.124*	3/6	139.333 ± 133.349	13
BZ-25mg.kg ⁻¹	507.500 ± 175.044*	1/6	92.667 ± 55.291	20
BZ-50mg.kg ⁻¹	233.000 ± 223.756*	5/6	56.000 ± 125.501	21

¹Avaliada durante 30 dias após início do tratamento;

²DP = desvio padrão;

³AUC= área sob a curva, com análise estatística realizada pelo teste de Kolmogorv-Smirnov.

Análise estatística da parasitemia máxima realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis devido à ausência de normalidade dos dados e igualdade das variâncias. * indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle não tratado.

Todos os animais tratados com BZ apresentaram um tempo médio de sobrevivência superior ($P < 0,05$) ao grupo não tratado. No entanto, o grupo tratado com BZ na concentração de 15mg/Kg apresentou, assim como o não tratado, 100% de mortalidade dos animais.

Tabela 20. Dados da sobrevivência dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados, por via endovenosa durante 10 dias, com BZ em diferentes concentrações. O tratamento foi iniciado no 1º dia após a infecção.

Grupo	Sobrevida	TMS ¹ (dias)
Não tratado	0/6	15,5
BZ-15mg.kg ⁻¹	0/6	24*
BZ-20mg.kg ⁻¹	6/6	>30*

BZ-25mg.kg ⁻¹	6/6	>30*
BZ-50mg.kg ⁻¹	6/6	>30*

¹TMS= tempo médio de sobrevida;

Análise estatística foi realizada pelo teste de long rank (Mantel-Cox). * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle não tratado.

4.2.3 Avaliação do tratamento utilizando o EREC via endovenosa

A curva de parasitemia e sobrevida dos animais tratados por via endovenosa com EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10,mg/kg/dia e dos controles, durante 10 dias, estão representadas na Figura 23 e Figura 24, respectivamente.

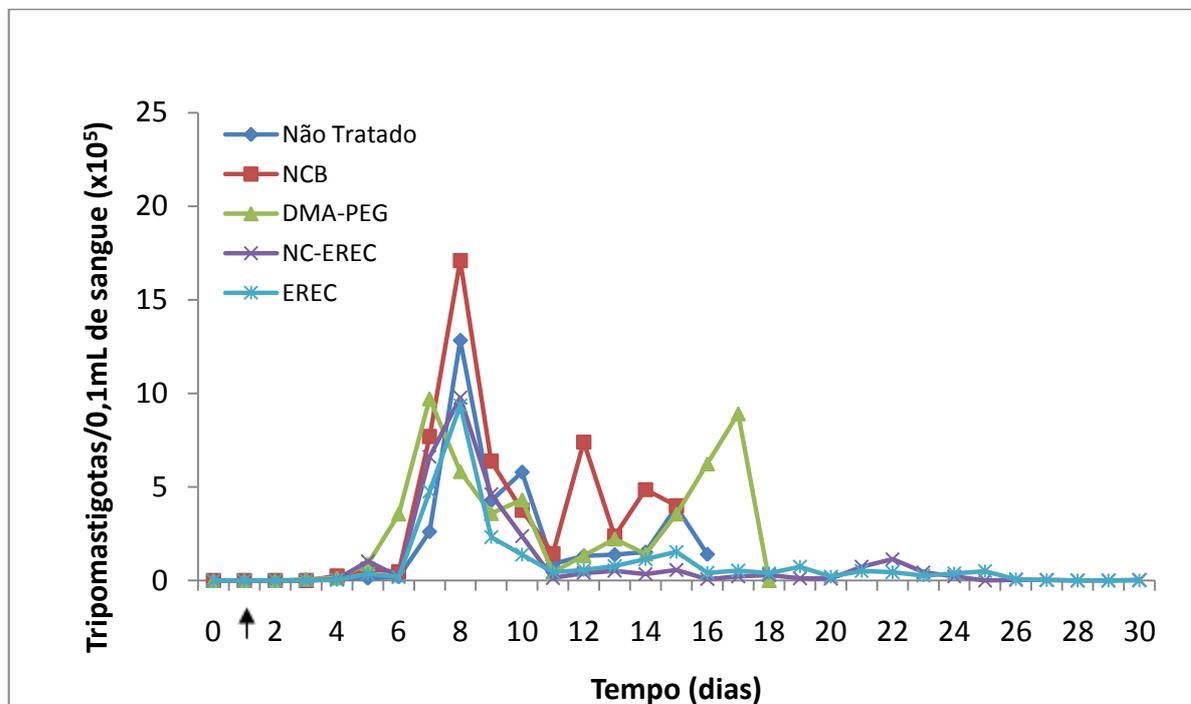


Figura 23. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com Eremantolídeo c livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

EREC=Eremantolídeo C;

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

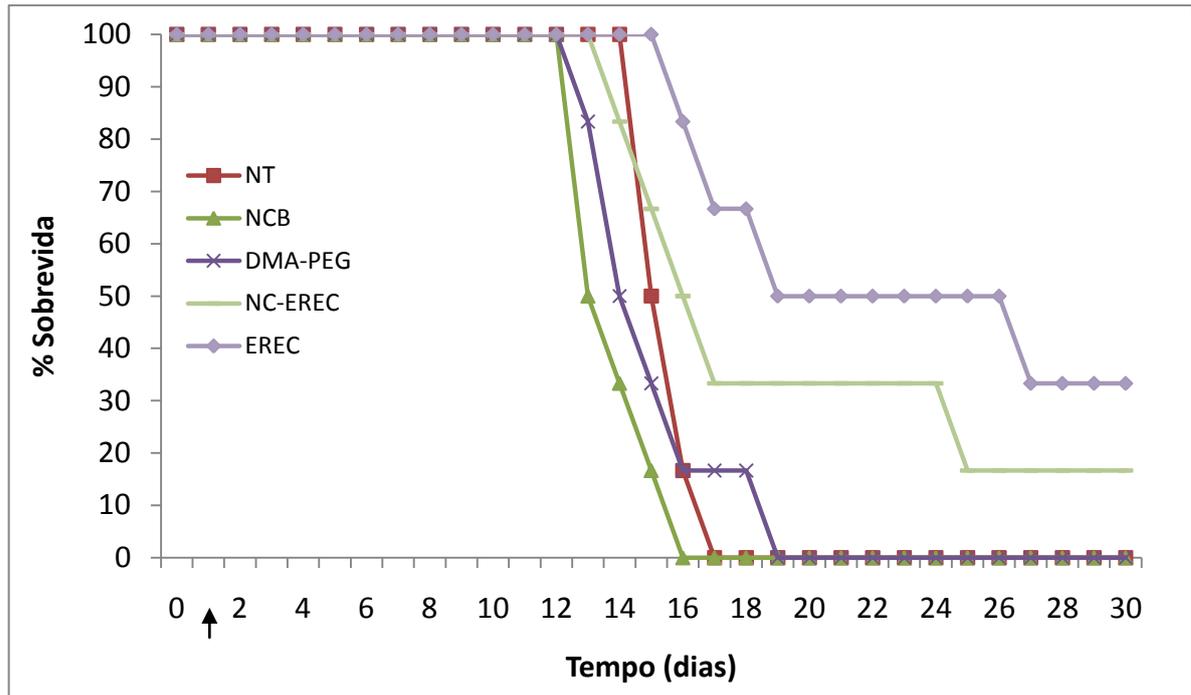


Figura 24. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

EREC=Eremantolídeo C.;

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

Os resultados obtidos por análise da AUC, Tabela 21, demonstram que EREC livre e nanoencapsulado reduziram ($P < 0,05$) os níveis de parasitemia se comparado ao grupo controle não tratado. Observa-se ainda que não existe diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controles (não tratado, NC branca e DMA-PEG). Além disso, observa-se que não existe diferença ($P > 0,05$) entre dos níveis de parasitemia dos grupos tratados com EREC livre ou nanoencapsulado.

Tabela 21. Dados dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos por via endovenosa.

Grupo	Durante o tratamento			
	AUC ³	Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima
Não Tratado	3.215.000 ± 1.470.000	0/6	1.284.000 ± 673.954	8
NC-Branca	4.447.000 ± 1.680.000	0/6	1.709.000 ± 761.494	8
DMA-PEG	3.328.000 ± 2.341.000	0/6	972.000 ± 676.442	8

NC-EREC	2.747.000 ± 1.410.000*	0/6	977.333 ± 732.979	8
EREC Livre	2.490.000 ± 852.844*	2/6	934.667 ± 356.828	8

¹Avaliada durante 30 dias após início do tratamento;

²DP = desvio padrão;

³AUC= área sob a curva, com análise estatística realizada pelo teste de Kolmogorv-Smirnov.

Análise estatística da parasitemia máxima realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis devido à ausência de normalidade dos dados e igualdade das variâncias. * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle não tratado.

Apenas os animais tratados com EREC livre apresentaram maior tempo médio de sobrevida (P<0,05) quando comparado ao grupo controle não tratado, nanocápsulas brancas e DMA-PEG, sendo, ao final de 30 dias, observado 33,33% de sobrevida dos animais, Tabela 22. Não existe diferença (P>0,05) entre o grupo tratado com EREC nanoencapsulado e os grupos controles (não tratado, NC branca e DMA-PEG).

Tabela 22. Dados de sobrevida dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos por via endovenosa.

Grupo	Sobrevida	TMS ¹ (dias)
Não tratado	0/6	15,5
NC-Branca	0/6	13,5
DMA-PEG	0/6	14,5
NC-EREC	1/6	16,5
EREC Livre	2/6	23*

¹TMS= tempo médio de sobrevida;

Análise estatística foi realizada pelo teste de long-rank (Mantel-Cox). * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle não tratado.

4.2.4 Comparação entre os tratamentos por via endovenosa com BZ e EREC

A Figura 25 e a Figura 26 mostram, respectivamente, a curva de parasitemia e sobrevida obtidas dos animais tratados com BZ na concentração de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e EREC livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia.

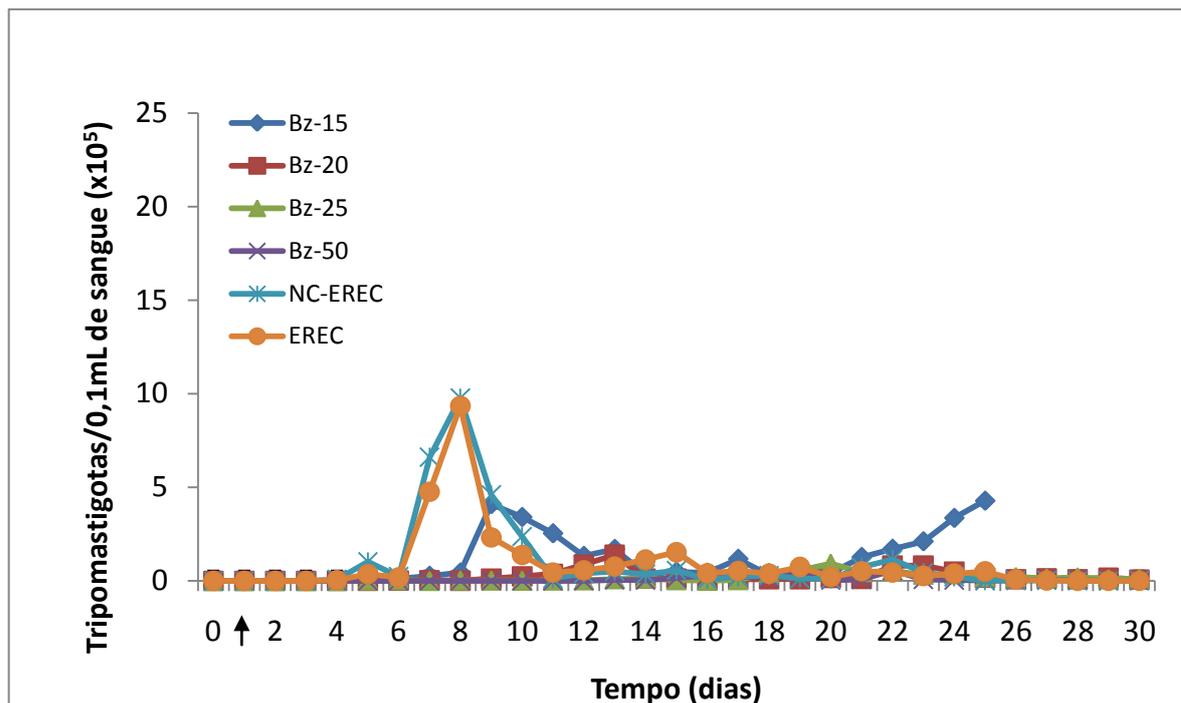


Figura 25. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

BZ=benznidazol;

EREC=Eremantolídeo C;

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

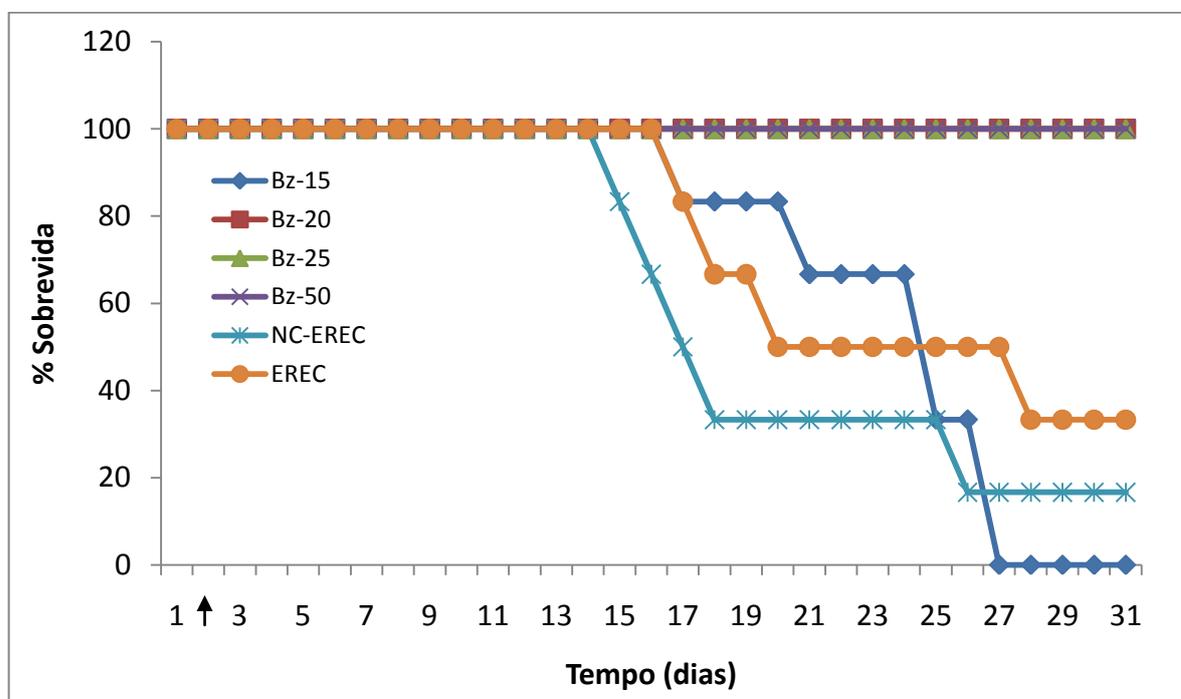


Figura 26. Curva de sobrevida de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

BZ=benznidazol;

EREC=Eremantolídeo C;

O dia do início do tratamento está simbolizado por ↑.

Ao comparar a parasitemia dos grupos tratados com BZ nas diversas concentrações e EREC livre ou nanoencapsulado, Tabela 23, observa-se que não existe diferença ($P>0,05$) entre o grupo tratado com BZ na concentração de 15,0mg/kg/dia e os grupos tratados com EREC livre ou nanoencapsulado. As demais concentrações de BZ avaliadas demonstraram uma maior redução ($P<0,05$) dos níveis de parasitemia em relação aos grupos tratados com EREC. Em relação ao nível máximo de parasitemia, não foi encontrada diferença ($P>0,05$) entre os grupos tratados com as diversas concentrações de BZ e EREC livre ou nanoencapsulado.

Da mesma forma que nos níveis de parasitemia, foi observado que não existe diferença significativa ($P>0,05$) entre a taxa de sobrevivência ao final de 30 dias dos animais dos grupos tratados com BZ na concentração de 15,0mg/Kg/dia e EREC livre, Tabela 24. O grupo tratado com EREC nanoencapsulado foi o que apresentou menor tempo de sobrevivência ($P<0,05$).

Tabela 23. Dados dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

Grupo	Durante o tratamento			
	AUC ³	Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima
BZ-15mg.kg ⁻¹	2.173.000 ± 1.024.000*	0/6	428.000 ± 548.715*	25
BZ-20mg.kg ⁻¹	671.333 ± 323.124	3/6	139.333 ± 133.349*	13
BZ-25mg.kg ⁻¹	507.500 ± 175.044	1/6	92.667 ± 55.291*	20
BZ-50mg.kg ⁻¹	233.000 ± 223.756	5/6	56.000 ± 125.501*	21
NC-EREC	2.747.000 ± 1.410.000*	0/6	977.333 ± 732.979*	8
EREC Livre	2.490.000 ± 852.844*	2/6	934.667 ± 356.828*	8

¹Avaliada durante 30 dias após início do tratamento;

²DP = desvio padrão;

³AUC= área sob a curva, com análise estatística realizada pelo teste de Kolmogorov Smirnov.

Análise estatística da parasitemia máxima realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis devido à ausência de normalidade dos dados e igualdade das variâncias. * indica que não houve diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).

Tabela 24. Dados da sobrevivência dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via endovenosa com BZ nas concentrações de 15, 20, 25 e 50mg/Kg/dia e Eremantolídeo C livre ou nanoencapsulado na concentração de 10mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos.

Grupo	Sobrevida	TMS ¹ (dias)
BZ-15mg.kg ⁻¹	0/6	24*
BZ-20mg.kg ⁻¹	6/6	>30
BZ-25mg.kg ⁻¹	6/6	>30
BZ-50mg.kg ⁻¹	6/6	>30
NC-EREC	1/6	16,5
EREC Livre	2/6	23*

¹TMS= tempo médio de sobrevivência;

Análise estatística foi realizada pelo teste de long-rank (Mantel-Cox). * indica que não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4.2.5 Comparação entre os tratamentos com Eremantolídeo C por via oral e endovenosa

A Figura 27 e Figura 28 mostra, respectivamente, a curva de parasitemia e sobrevivência obtidas dos animais tratados por via oral e endovenosa com EREC livre ou nanoencapsulado.

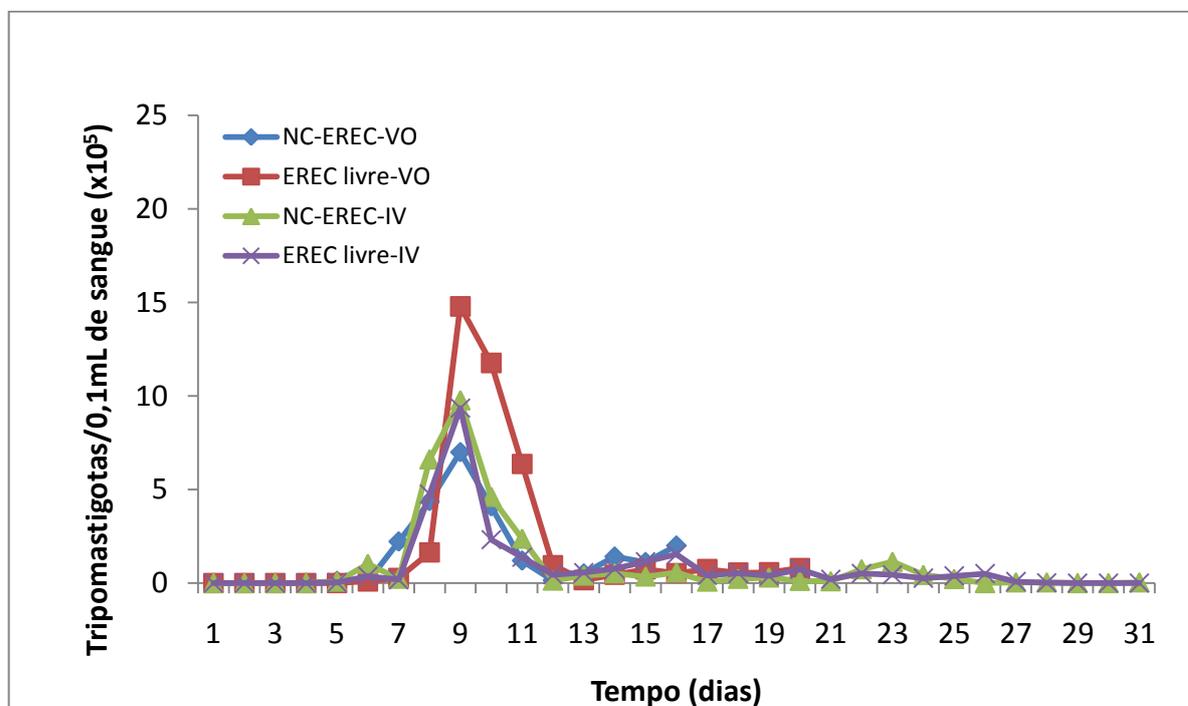


Figura 27. Curva de parasitemia de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa com 10mg/Kg/dia, por 10 dias, com EREC livre ou nanoencapsulado.

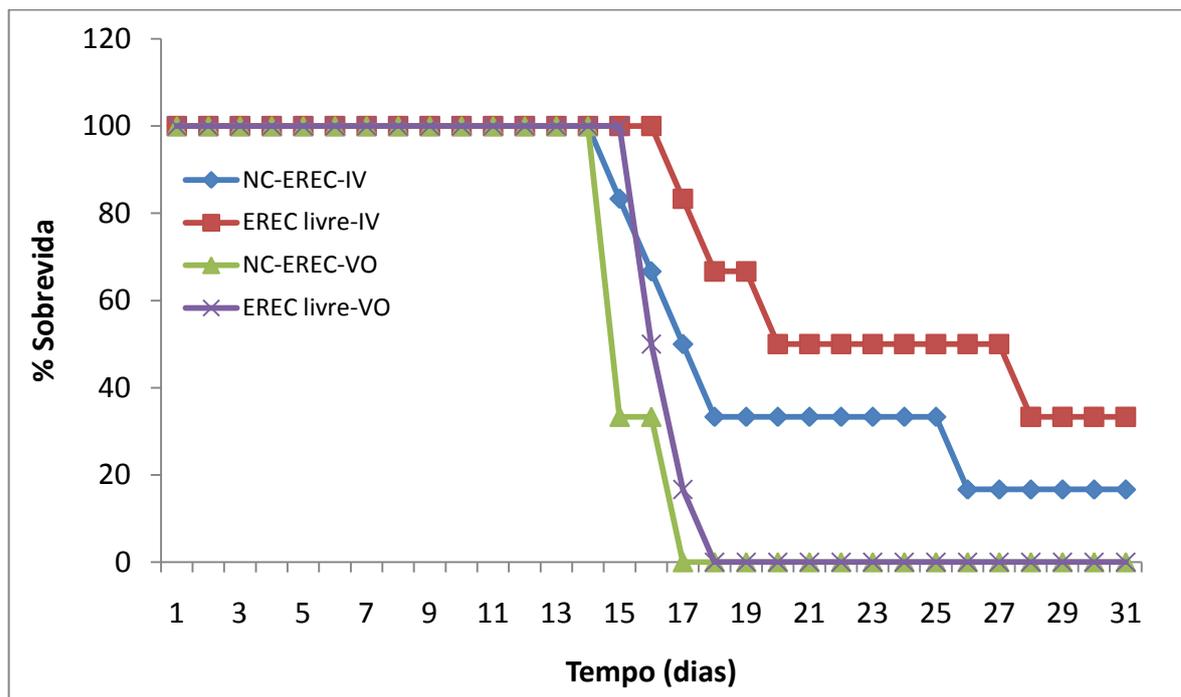


Figura 28. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa com 10mg/Kg/dia, por 10 dias, com EREC livre ou nanoencapsulado.

Pode-se observar na Tabela 25, que os animais tratados com EREC livre ou nanoencapsulado por via endovenosa apresentam uma redução ($P < 0,05$) sobre os níveis de parasitemia quando comparados aos animais tratados por via oral. Observou-se ainda que um aumento ($P < 0,05$) no tempo de sobrevivência daqueles animais em relação a estes, Tabela 26.

Tabela 25. Dados dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa por 10 dias com 10mg/Kg/dia com EREC livre ou nanoencapsulado.

Grupo	Durante o tratamento			
	AUC ³	Nº de camundongos com parasitemia negativa/total ¹	Parasitemia máxima (média ± DP ²) ¹	Dia da parasitemia máxima
EREC livre-VO	3.801.000 ± 1.231.000	0/6	1.478.667 ± 986.740	8
NC-EREC-VO	2.144.000 ± 1.069.000	0/6	699.333 ± 810.888	9
NC-EREC-IV	2.747.000 ± 1.410.000	0/6	977.333 ± 732.979	8

EREC Livre-IV 2.490.000 ± 852.844 2/6 934.667 ± 356.828 8

¹Avaliada durante 30 dias após início do tratamento;

²DP = desvio padrão;

³AUC= área sob a curva, com análise estatística realizada pelo teste de Kolmogorv-Smirnov;

Análise estatística da parasitemia máxima realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis devido à ausência de normalidade dos dados e igualdade das variâncias.

Tabela 26. Dados da sobrevida dos animais infectados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, tratados por via oral, em dose única com 500mg/Kg ou endovenosa por 10 dias com 10mg/Kg/dia com EREC livre ou nanoencapsulado.

Grupo	Sobrevida	TMS ¹ (dias)
EREC Livre-VO	0/6	11
NC-EREC-VO	0/6	11
NC-EREC-IV	1/6	16,5
EREC Livre-IV	2/6	23

¹TMS= tempo médio de sobrevida;

Análise estatística foi realizada pelo teste de long-rank (Mantel-Cox).

4.3 Discussão

Observou-se que o EREC livre e nanoencapsulado apresentam atividade contra a cepa Y de *T. cruzi in vitro*, ratificando os dados apresentados na literatura (CHIARI *et al.*, 1991; CHIARI *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996). No entanto, este estudo mostrou uma resposta do EREC contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* enquanto os trabalhos descritos por Chiari *et al.* mostraram respostas contra as formas tripomastigotas deste parasito em meio sanguíneo. A resposta de atividade inibitória contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* para o EREC livre e nanoencapsulado foi dose dependente entre 10-100µg/mL. Assim, sugere-se que doses *in vivo* de 100µg/mL devam ser atingida nos espaços extracelulares para uma inibição próxima de 100%. Além disso, foi observada uma maior atividade ($P < 0,05$) do EREC livre quando comparado ao nanoencapsulado. Os estudos de dissolução/liberação demonstraram 93% de dissolução da droga livre num final de 12 horas enquanto o a droga nanoencapsulada, ao final de 48 horas, havia liberado apenas 73%. Essa liberação prolongada e reduzida do EREC nanoencapsulado provavelmente foi um fator determinante para essa diferença na atividade, uma vez que, a ausência de uma provável dose efetiva para morte dos parasitos, à partir das NC permitiu que estes, num período inicial, mantivessem seus ciclos de reprodução aumentados em número. Esse dado confirma a eficiente encapsulação do EREC nas NC e sugere que realmente a liberação *in vitro* e *in vivo* foi reduzida e/ou prolongada.

Com os resultados obtidos nos testes *in vitro*, confirmou-se a pertinência da avaliação do EREC *in vivo*, em modelo experimental murino da doença de Chagas. Entretanto, para tal, observa-se que as doses administradas de EREC tanto por via oral quanto por via endovenosa devam ser elevadas para que as concentrações extracelulares possam atingir valores inibitórios.

Nos estudos *in vivo*, a via oral mostrou ser inadequada para administração do EREC livre ou nanoencapsulado. No caso do EREC livre, não foi observada eficácia deste por essa via, o que sugere que a absorção deste no trato gastrintestinal (TGI) seja muito reduzida, ou ocorra degradação no TGI ou mesmo que as doses biodisponíveis/administradas sejam

muito baixas, levando-se em conta os valores encontrados *in vitro*. No entanto, não existem trabalhos na literatura sobre a biodisponibilidade do EREC *in vivo* para uma avaliação comparativa. Portanto, novos estudos precisam ser realizados nesse sentido. Já para o EREC nanoencapsulado, apesar de existirem trabalhos que descrevem a absorção das NC poliméricas através das células M presentes nas placas de Payer (centros linfocitários) presentes no íleo (O'HAGAN, 1996; BORGES *et al.*, 2006), estudos de estabilidade *in vitro* demonstram que muitas nanopartículas poliméricas apresentam degradação no trato gastrointestinal devido a variações nos níveis de pH ou à presença de enzimas e/ou sais biliares (KUENTZ, 2008). Além disso, foi demonstrado anteriormente que a presença da lipase pancreática nos fluidos intestinais promove uma interação desta com a fosfatidilcolina, um componente do núcleo oleoso das NC (ROGER *et al.*, 2009). Assim, com a degradação das NC, o EREC fica exposto diretamente aos fluidos e à mucosa intestinal o que pode aumentar a sua velocidade de degradação ou mesmo dificultar sua absorção (por ser uma substância de baixa solubilidade em água) e, portanto, reduzindo sua biodisponibilidade. Uma alternativa para contornar estes problemas pode ser o acoplamento de moléculas de polietilenoglicol à superfície das NC tornando-as mais estáveis nesses fluidos gastrointestinais como proposto na literatura (TOBIO *et al.*, 2000; SAHU *et al.*, 2008).

Diante dos resultados obtidos *in vitro* e da ineficácia do EREC por via oral, o estudo da eficácia dessa substância por via endovenosa foi realizada. Anteriormente ao teste com EREC realizou-se uma avaliação da atividade do BZ por via endovenosa para utilizar os resultados como parâmetro comparativo, uma vez que inexistia este dado na literatura.

A avaliação do EREC por via endovenosa na concentração de 10mg/kg/dia revelou atividade somente do EREC livre na taxa de sobrevivência dos animais, sendo equivalente ao encontrado para o BZ na concentração de 15mg/Kg. Este resultado sugere que realmente esta substância apresenta atividade sobre o parasito. No entanto, a dose utilizada (10mg/Kg/dia) pode ter sido insuficiente para se atingir resultados satisfatórios (equiparáveis ou superiores ao BZ). O uso das NC visava um maior direcionamento da substância para que se obtivesse uma maior atividade usando pequenas doses, como sugerido pela literatura (LEGRAND *et al.*, 1999). No entanto, o que se observou foi que o EREC nanoencapsulado não apresentou atividade sobre os animais infectados. Novamente o tempo de liberação prolongado e a reduzida liberação do EREC das NC podem ter sido

fatores determinantes para ausência de atividade uma vez que, a dose efetiva para matar os parasitos pode não ter sido atingida. Dados similares foram encontrados nos estudos anteriores, onde doses mais elevadas de albaconazol nanoencapsulado tiveram que ser administradas para que a eficácia terapêutica fosse aumentada, com ganho elevado em termos de redução de toxicidade devido à encapsulação (BARROS, 2007). Outra hipótese baseia-se em estudos que demonstram a opsonização de nanopartículas poliméricas pelo sistema mononuclear fagocitário (SMF) (GAUR *et al.*, 2000; PANAGI *et al.*, 2001; OWENS *et al.*, 2006) e a deposição dessas partículas em células fagocitárias do fígado e do baço. Dessa forma, a retirada dessas nanopartículas da circulação sanguínea pode impedir que o EREC atinja seu alvo, isto é, as formas tripomastigotas do parasito na corrente sanguínea e as formas amastigotas intracelulares em células musculares.

Diante disso, o uso de NC furtivas surge como uma alternativa para “driblar” o SMF e permitir que essas nanopartículas continuem circulantes por mais tempo, como descreve a literatura (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; MOSQUEIRA *et al.*, 2006), a fim de liberar uma maior concentração de EREC na corrente sanguínea para que esse exerça sua atividade sobre o *T. cruzi* ou atinja órgãos infectados pelo parasito.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou o desenvolvimento duas novas técnicas de quantificação do eremantolídeo C em formas farmacêuticas nanoestruturadas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria no ultravioleta, sendo a primeira recomendada para avaliações que requerem sensibilidade de quantificação de até 1µg/mL. Já a técnica de espectrofotometria vem como uma alternativa de menor custo para quantificação do EREC em formas farmacêuticas nanoestruturadas com sensibilidade de quantificação reduzida.

Além disso, o desenvolvimento de NC poliméricas estáveis contendo EREC foi realizado. Os resultados físico-químicos confirmam a retenção do EREC associado às nanocápsulas e os resultados *in vitro* e *in vivo* de atividade corroboram esta hipótese. Assim, foi possível aumentar a dispersão do EREC em água, facilitando sua administração *in vivo* por via oral ou parenteral.

Observou-se que a via oral não foi adequada para administração dessa substância nos animais infectados com o *T. cruzi* e que a administração por via endovenosa levou a uma baixa atividade da substância. Estudos empregando NC por via oral são raros e este estudo, aqui apresentado, permitiu a comparação da eficácia pelas duas vias, o que permite inferir que a biodisponibilidade do EREC pela via oral é baixa e não foi melhorada pela nanoencapsulação.

Dessa forma, uma alternativa seria o desenvolvimento de NC com polímeros de diferentes naturezas a fim de contornar problemas de incompatibilidades da administração por via oral. Além disso, uma alternativa seria o uso de NC poliméricas de liberação rápida visando obter uma dose efetiva sobre o parasito de forma mais rápida sem perder as características de direcionamento e redução de toxicidade.

Por fim, um aumento da concentração de EREC incorporado às nanocápsulas pode contribuir de forma significativa para o aumento da resposta da substância sobre os parasitos, já que *in vitro*, em altas concentrações, conseguiu-se uma inibição de 100% do crescimento do *T. cruzi* tornando essa uma perspectiva para continuação desse trabalho bem como estudos de biodisponibilidade do EREC *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUBAKAR, M.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 183, n. 1, p. 63-6, 1999.

ACD/LABS. Advanced Chemistry Development. 2010.

ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles - Preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 39, p. 173-91, 1993.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; DUBRASQUET, M.; BENITA, S. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm Res*, v. 8, n. 1, p. 101-5, Jan 1991.

ANDRADE, A. L.; MARTELLI, C. M.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; AIRES, A. I.; SOUSSUMI, L. M.; 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, n. 5, p. 594-7, Nov 2004.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FERRIOLLI FILHO, 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, n. 6, p. 624-6, Nov-Dec 1992.

ANVISA, A. N. D. V. S. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.

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, n. 1, p. 23-9, Jan 2003.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E., JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 7, p. 2034-9, Feb 17 2004.

BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 25, n. 4, p. 471-6, Apr 1999.

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

BARRETT, M. P. The trypanosomiasis. *Lancet*, v. 362, p. 1469-80, 2003.

BARROS, C. M. *Desenvolvimento e avaliação biológica de formulações de nanocápsulas para tratamento da doença de Chagas em modelo murino.* (2007). 99 f. (Mestre) - NUPEB,

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007. Acesso: 04/02/2010.

BESTETTI, R. B.; FINZI, L. A.; OLIVEIRA, J. S. Chronic Chagas' heart disease presenting as an impending myocardial infarction: a case favoring the neurogenic pathogenesis concept. *Clin Cardiol*, v. 10, n. 6, p. 368-70, Jun 1987.

BEYRER, C.; VILLAR, J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S.; MILLS, E. J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet*, v. 370, p. 619-27, 2006.

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

BORGES, O.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; ROMEIJN, S. G.; AMIDI, M.; DE SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J Control Release*, v. 114, n. 3, p. 348-58, Sep 12 2006.

BOTTIEAU, E.; CLERINX, J.; COLEBUNDERS, R.; VAN GOMPEL, A. Fever after a stay in the tropics. Part 2: Common imported tropical diseases. *Acta Clin Belg*, v. 57, n. 6, p. 301-8, Nov-Dec 2002.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. *Imprensa Oficial de Minas Gerais*, p. 510-16, 1968.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*, v. 27, p. 347-82, 1973.

BUCKNER, F. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 15149-53, 2003.

BUCKNER, F. S.; GRIFFIN, J. H.; WILSON, A. J.; VAN VOORHIS, W. C. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 4, p. 1210-5, Apr 2001.

CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 12, p. 93-100, May-Jun 1964.

CANALLE, R.; BURIM, R. V.; CALLEGARI LOPES, J. L.; TAKAHASHI, C. S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. *Cancer Detect Prev*, v. 25, n. 1, p. 93-101, 2001.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 44, n. 1, p. 29-37, Jan-Feb 2002.

CASTRO, J. A. Contribution of toxicology to the problem of Chagas' disease (American trypanosomiasis). A year 2000 update. *Biomed Environ Sci*, v. 13, p. 271-9, 2000.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human e Experimental Toxicology*, v. 25, p. 471-9, 2006.

CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 53, p. 83-98, 1993.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHEMIDPLUS. *Itraconazole*. 2010. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>.

CHEN, C. K. *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibitor Derived from a *Mycobacterium tuberculosis* Screen Hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. e372, 2009.

CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MESQUITA, A. A.; TAVARES, K. G. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 85, n. 3, p. 372-4, May-Jun 1991.

CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; PERRY, K. S. P.; SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMAN, J. R.; OLIVEIRA, A. B. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. *Phytother Res*, v. 10, p. 636-8, 1996.

CORRALES, M.; CARDOZO, R.; SEGURA, M. A.; URBINA, J. A.; BASOMBRI, M. A. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 4, p. 1556-60, Apr 2005.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceuticals Science*, v. 13, p. 123-33, 2001.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 4, p. 549-54, Jul 2009.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P.; PETANA, W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 30, n. 139-44, 1997.

COURA, P. O.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst*

Oswaldo Cruz, v. 97, p. 3-24, 2002.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

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

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol*, v. 21, n. 11, p. 508-12, Nov 2005.

DAVILA, D. F.; ROSSELL, O.; DE BELLABARBA, G. A. Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. *Int J Parasitol*, v. 32, n. 1, p. 107-9, Jan 2002.

DE ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole nanocapsules. *Int J Pharm*, v. 349, n. 1-2, p. 152-60, Feb 12 2008.

DE LIMA, A. R.; NAVARRO, M. C.; ARTEAGA, R. Y.; CONTERAS, V. T. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 3, p. 336-42, 2007.

DE MAIO, A.; URBINA, J. A. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: terminal oxidases in exponential and stationary growth phase emipastigotes cultured in vitro. *Acta Cient Venez*, v. 35, n. 2, p. 136-41, 1984.

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. 880-1, 1988.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des*, v. 7, p. 1157-64, 2001.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against Trypanosomatid and Apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets Infect Disord*, v. 1, p. 51-61, 2001.

DOMB, A. J. *Polymeric Site-specific Pharmacotherapy*. New York: John Wiley & Sons Ltda, v. 2, p. 27-46, 1994.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*, v. 188, n. 4, p. 725-34, Aug 17 1998.

FARMACOPEIA, B. Benznidazol *Farmacopéia Brasileira*. São Paulo: Organização Andrei, 2005. p. 271-3.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J Ethnopharmacol* v. 88, p. 241-7, 2003.

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. R1-4, 1989.

FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol*, v. 86, n. 6, p. 1213-18, 2000.

FOURNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E. In vitro activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Phytother Res* v. 8, p. 141-4, 1994.

FURLONG, S. T. Sterols of parasitic protozoa and helminths. *Experimental Parasitology*, v. 68, p. 482-5, 1989.

GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; BAPTISTA, M. M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L.; BRITTO, C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. *Int J Antimicrob Agents*, v. 23, p. 286-90, 2004.

GAUR, U.; SAHOO, S. K.; DE, T. K.; GHOSH, P. C.; MAITRA, A.; GHOSH, P. K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharm*, v. 202, n. 1-2, p. 1-10, Jul 20 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian *Arnica Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 1193-204, 2008.

GONZALEZ-MARTÍN, G.; FIGUEIROA, C.; MERINO, I.; OSUNA, A. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potentially lysosomatropic carrier: preparation and trypanocidal activity. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 49, p. 137-42, 2000.

GONZALEZ-MARTIN, G.; MERINO, I.; RODRIGUES-CABEZAS, M. N.; TORRES, M.; NUÑEZ, R.; OSUNA, A. Characterization and trypanocidal activity of nifurtimox-containing and empty nanoparticles of polyethylcyanoacrylates. *J Pharm Pharmacol* v. 50, p. 29-35, 1998.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, v. 76 p. 73-82, 2005.

GUEDES, P. M. M.; FIETTO, J. L. R.; LANA, M.; BAHIA, M. T. Advances in Chagas' disease chemotherapy. *Bentham Science Publisher*, v. 5, n. 2, p. 175-86, 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, n. 10, p. 1545-7, Oct 1995.

GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*, v. 31, n. 11, p. 673-85, Nov 2009.

HAMOUDEH, M.; FESSI, H. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 300, p. 584-90, 2006.

HOARAU, D.; DELMAS, P.; DAVID, S.; ROUX, E.; LEROUX, J. C. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res*, v. 21, n. 10, p. 1783-9, Oct 2004.

HUCKE, O. The protein farnesyl transferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas' disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 5415-18, 2005.

HUMBERSTONE, A. J.; PORTER, C. J. H.; CHARMAN, W. N. A physicochemical basis for the effect of food the absolute oral bioavailability of halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 5, p. 525-9, 1996.

KAYSER, O.; KILDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural Products as potential antiparasitic drugs. *Parasitol Res*, v. 90, n. Supplement 2, p. S55-S62, 2003.

KONKLE, M. E. Indomethacin amides as a novel molecular scaffold for targeting *Trypanosomacruzi sterol14* alpha-demethylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 2846-53, 2009.

KRAUS, J. M. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas' disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 1639-47, 2009.

KUENTZ, M. Drug absorption modeling as a tool to define the strategy in clinical formulation development. *AAPS Journal*, v. 10, p. 473-9, 2008.

LARRALDE, G.; VIVAS, J.; URBINA, J. A. Concentration and time dependence of the effects of ketoconazole on growth and sterol synthesis by *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes. *Acta Cient Venez*, v. 39, n. 2, p. 140-6, 1988.

LAURIA-PIRES, L.; CASTRO, C. N.; EMANUEL, A.; PRATA, A. Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev Soc Med Trop*, v. 21, p. 79, 1998.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review *STP Pharma Sci* v. 9, n. 9, p. 411-18, 1999.

LEIBY, D. A.; HERRON, R. M., JR.; GARRATTY, G.; HERWALDT, B. L. Trypanosoma cruzi parasitemia in US blood donors with serologic evidence of infection. *J Infect Dis*, v. 198, n. 4, p. 609-13, Aug 15 2008.

LEIBY, D. A.; HERRON, R. M., JR.; READ, E. J.; LENES, B. A.; STUMPF, R. J. Trypanosoma cruzi in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion*, v. 42, n. 5, p. 549-55, May 2002.

LEITE, E. A.; GUIMARÃES, A. G.; GUIMARÃES, H. N.; COELHO, G. L. L. M.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sci*, v. 80, p. 1327-34, 2007.

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

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, v. 163, p. 123-520, 1979.

LEPESHEVA, G. I. Sterol 14 alpha-demethylase as a potential target for anti-trypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chemistry and Biology*, v. 14, p. 1283-93, 2007.

LEROUX, J. C.; ALLEMANN, E.; DE JAEGHERE, F.; DOELKER, E.; GURNY, R. Biodegradable nanoparticles from sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 39, p. 339-50, 1995.

LO PRESTI, M. S.; RIVAROLA, H. W.; BUSTAMANTE, J. M.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in Trypanosoma cruzi infected mice. *Int J Antimicrob Agents*, v. 23, n. 6, p. 634-6, Jun 2004.

LOWE, P. J.; TEMPLE, C. S. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against protease and effect on intestinal absorption in rats. *J Pharm Pharmacol*, v. 45, p. 547-52, 1994.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 6 2007.

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; COHN, N. K.; NELSON, D. J. Anti-trypanosomal effects of allopurinol: conversion in vitro to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by Trypanosoma cruzi *Science*, v. 201, p. 1018-20, 1978.

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; COHN, N. K.; NELSON, D. J.; KLEIN, R. S. Biological action of inosine analogs in *Leishmania* and *Trypanosoma spp.* *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 25, p. 292-5, 1984.

MAYA, J. D.; BOLLE, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPPETO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIÉRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitromidazole and nitrofuran derivatives. *Biochem Pharmacol*, v. 65, p. 999-1006, 2003.

MCKERROW, J. H. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 263-9, 2009.

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, n. 1, p. 137-40, Jul 2000.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activities 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, n. 1, p. 150-5, Jan 2000.

MOLINA, J.; URBINA, J.; GREF, R.; BRENER, Z.; RODRIGUES JUNIOR, J. M. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole D0870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. *J Antimicrob Chemother*, v. 47, n. 1, p. 101-4, Jan 2001.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*, v. 100, n. 8, p. 663-77, Dec 2006.

MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol*, v. 90C, n. 1, p. 1-12, 1988.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEÓN, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benzimidazole as a free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparation *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 218, p. 585-91, 1982.

MORILLA, M. J.; MONTANARI, J.; FRANK, F.; MALCHIODI, E.; CORRAL, R.; PETRAY, P.; ROMERO, E. L. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Control Release*, v. 103, n. 3, p. 599-607, Apr 18 2005.

MORILLA, M. J.; MONTANARI, J. A.; PRIETO, M. J.; LOPEZ, M. O.; PETRAY, P. B.; ROMERO, E. L. Intravenous liposomal benzimidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *Int J Pharm*, v. 278, n. 2, p. 311-8, Jul 8 2004.

MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional

nanocapsules as novel formulations for parenteral delivery of halofantrine. *J Nanosci Nanotechnol*, v. 6, n. 9-10, p. 3193-202, Sep-Oct 2006.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J. L.; VERT, M.; MYSIAKINI, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRATT, G. Biodistribution of novel long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1411-19, 2001.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J.; BARRAT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulation of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 4, p. 1222-28, 2004.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*, v. 86, n. 12, p. 999-1002, Dec 2000.

MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*, v. 116 (Pt 2), p. 165-71, Feb 1998.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v. 44, p. 212-9, 1998.

O'HAGAN, D. T. The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *J Anat*, v. 189 (Pt 3), p. 477-82, Dec 1996.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* Species. *Phytother Res*, v. 10, p. 292-295, 1996.

OWENS, D. E., 3RD; PEPPAS, N. A. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 307, n. 1, p. 93-102, Jan 3 2006.

PANAGI, Z.; BELETSI, A.; EVANGELATOS, G.; LIVANIOU, E.; ITHAKISSIOS, D. S.; AVGOUSTAKIS, K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 221, n. 1-2, p. 143-52, Jun 19 2001.

PATEL, S.; SETHI, A. Imported tropical diseases. *Dermatol Ther*, v. 22, n. 6, p. 538-49, Nov-Dec 2009.

PAULA, D. C. C.; VIDAL, A. T.; GUIMARÃES, H. N.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; GRABE-GUIMARAES, A. Atividade cardiovascular do eremantolídeo C em animais hipertensos. *XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*. v. 1. Ribeirão Preto 2006.

PELLEGRINO, J. [Chagas' disease in Minas Gerais; critical review of literature published in 1951.]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 51, p. 611-68, Dec 1953.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M.; FRANCO, R. M.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*, v. 72, n. 2, p. 441-6, Feb 2009.

PINTO, D. J. C. *XII Reunión Intergubernamental INCO-SUR/Chagas*. Santiago de Chile 2003. p. 129-134.

PINTO, P. L.; TAKAMI, R.; NUNES, E. V.; GUILHERME, C. S.; OLIVEIRA, O. C., JR.; GAMA-RODRIGUES, J.; OKUMURA, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, v. 54, n. 5, p. 141-6, Sep-Oct 1999.

POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 72, p. 228-32, 1978.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*, v. 29, p. 1611-4, 1979.

RAETHER, W.; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, v. 90, p. S19-39, 2003.

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A., JR.; RASSI, G. G.; RASSI, S. G.; IG, D. A. S.; RASSI, A. G. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 76, n. 1, p. 58-61, Jan 2007.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 2, p. 8-21, 2006.

RIBEIRO, A.; SANTOS, L. M. S. T.; ROMANHA, A. J.; VELOSO, D. P.; ZANI, C. L. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J Nat Prod*, v. 60, p. 836-8., 1997.

RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. *Le Progres Medical*, p. 101-282, 1973.

RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; SULIGOY, M.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. Thioridazine treatment modifies the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 93, n. 7, p. 695-702, Oct 1999.

ROBERTS, C. W. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 126, p. 129-42, 2003.

RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002.

ROGER, E.; LAGARCE, F.; BENOIT, J. P. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 379, p. 260-5, 2009.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas' disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009.

ROSENBAUM, M. B.; CHIALE, P. A.; HAEDO, A.; LAZZARI, J. A.; ELIZARI, M. V. Ten years of experience with amiodarone. *Am Heart J*, v. 106, p. 957-64, 1983.

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, n. 3, p. 487-91, Sep 1998.

SAHU, A.; BORA, U.; KASOJU, N.; GOSWAMI, P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater*, v. 4, n. 6, p. 1752-61, Nov 2008.

SAKAMOTO, H. T.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, J. A.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Quantitative HPLC Analysis of Sesquiterpene Lactones and Determination of Chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). *J Braz Chem Soc*, v. 16, n. 6B, p. 1396-401, 2005.

SANTOS, P. A.; TURATI, I. C. C.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P. Quantification of furanoheliangolides by HPLC and GC. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 3, p. 341-5, 2003.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. *Braz J Pharmacognosy*, v. 17, n. 3, p. 455-65, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; RASLAN, D. S.; DE SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpa*. *Fitoterapia*, v. 69, p. 90-1, 1998.

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. 726-37, 2003.

SCHIJMAN, A. G.; ALTCHER, 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, n. 3, p. 441-9, Sep 2003.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, p. 88-100, 2009.

SPÓSITO, P. A. *Nanocápsulas e Nanoemulsões contendo antifúngicos: desenvolvimento farmacotécnico, caracterização e avaliação biológica em modelo de candidíase sistêmica*. (2008). (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

SUCAM, M. Doença de Chagas: Textos de apoio. In: PÚBLICA, S. D. C. D. S. (Ed.). Brasília: Ministério da Saúde, 1989. p. 1-29.

SURYADEVARA, P. K. Structurally simple inhibitors of lanosterol 14 alpha-demethylase are efficacious in a rodent model of acute Chagas' disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 3703-15, 2009.

TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart.(Vernonieae, Asteraceae). *Phytomedicine*, v. 10, p. 490-3., 2003.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*, v. 19, n. 10, p. 447-51, Oct 2003.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. *Postgrad Med J*, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006.

TOBIO, M.; SANCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I. I.; EVORA, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 18, n. 3-4, p. 315-323, Oct 1 2000.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*, p. 2188-194, 2002.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 311-8, 2009.

URBINA, J. A.; CONCEPCION, J. L.; CALDERA, A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; OTOMO, T.; HIYOSHI, H. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 7, p. 2379-87, Jul 2004.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas' disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, v. 19, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, v. 19, n. 11, p. 495-501, Nov 2003.

URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R. Antiproliferative effects and

mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, n. 4, p. 730-5, Apr 1991.

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, n. 9, p. 2498-502, Sep 2000.

URBINA, J. A.; OSORNO, C. E.; ROJAS, A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopycolinic acid: in vitro and in vivo studies. *Arch Biochem Biophys*, v. 282, n. 1, p. 91-9, Oct 1990.

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. 273, n. 5277, p. 969-71, Aug 16 1996.

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, n. 1, p. 27-38, Jan 2003.

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, n. 1, p. 39-48, Jan 2003.

URBINA, J. A.; VIVAS, J.; RAMOS, H.; LARRALDE, G.; AGUILAR, Z.; AVILAN, L. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Mol Biochem Parasitol*, v. 30, n. 2, p. 185-95, Aug 1988.

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, n. 7, p. 1005-11, Oct 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, n. 1, p. 151-62, Jan 1994.

WASHINGTON, C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *Int J Pharm*, v. 51, n. 1, p. 71-4, 1989.

WHO, W. H. O. *Chagas' disease*. 1997.

WHO, W. H. O. *Chagas' Disease*. 2009.

http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/index.html. 21/01/2010.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 11, n. 31, p. 1-24, 2009.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Am J Trop Med Hyg*, v. 61, n. 2, p. 193-7, Aug 1999.

YOSHIHARA, E.; TACHIBANA, H.; NAKAE, T. Trypanocidal activity of the stearylamine-bearing liposome in vitro. *Life Sci*, v. 40, n. 22, p. 2153-9, Jun 1 1987.

YUN, O.; LIMA, M. A.; ELLMAN, T.; CHAMBI, W.; CASTILLO, S.; FLEVAUD, L.; RODDY, P.; PARREÑO, F.; VIÑAS, P. A.; PALMA, P. P. Feasibility, DrugSafety, and Effectiveness of Etiological Treatment Programs for Chagas Disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year Experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, n. 7, p. E-488, 2009.

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](#)