

RENATA TUPINAMBÁ BRANQUINHO

**Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona
sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas
experimental em modelo murino**

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto, 2014

RENATA TUPINAMBÁ BRANQUINHO

**Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona
sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas
experimental em modelo murino**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta de Lana

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa C.F.Mosqueira

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto, 2014

B821f Branquinho, Renata Tupinambá.

Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo murino [manuscrito] / Renata Tupinambá Branquinho - 2014.

166f.: il. color.; graf.; tab.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta de Lana.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Lactonas - Teses. 2. Nanotecnologia - Teses. 3. Tecnologia farmacêutica - Teses. 4. Farmacocinética – Teses. 5. Quimioterapia combinada. I. Lana, Marta de. II. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 620.3:616.937

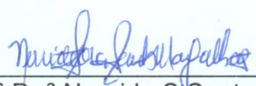


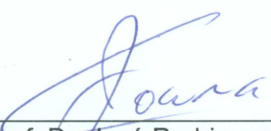
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

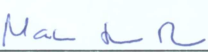
“Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo murino”


Aos vinte e sete dias do mês de maio de 2014, às 8:00h, no Auditório da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Renata Tupinambá Branquinho**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovada a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

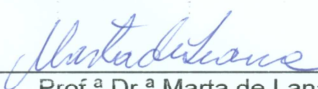
Membros da Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Neréide S Santos Magalhães
Examinadora (UFPE)

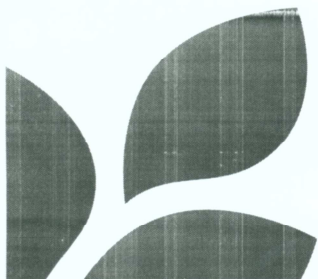

Prof. Dr. José Rodrigues Coura
Examinador (FioCruz)


Prof.ª Dr.ª Maria Terezinha Bahia
Examinadora (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Neila Márcia S Barcelos
Examinadora (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **27/05/2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

COLABORAÇÕES

Este trabalho contou com EFETIVA colaboração com resultados já apresentados.

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

Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia-UFOP

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- CiPHARMA-UFOP

Com resultados não apresentados nesta tese

Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro

Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia-UFOP

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- CiPHARMA-UFOP

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas-CBIOL-UFOP

Dr. Sylvain Richard

Coordenador da equipe 1: Canaux ioniques et homéostasie calcique dans le muscle cardiaque et les muscles vasculaires. Physiologie & médecine expérimentale du Cœur et des Muscles - INSERM -

U1046

Suporte financeiro

FAPEMIG Processo N^o: APQ-00566-11

Rede Toxifar/FAPEMIG

CAPES pró-equipamentos

CAPES/Demanda Social

*"Não há impasse quando se está imbuído de desafio.
Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho."*

Daisaku Ikeda

Dedico este trabalho

A minha amada mãe Isméria Branquinho, pois ela indiretamente me conduziu ao caminho da docência e da pesquisa. Pois foi vendo seus aplaudidos discursos, seus grandiosos júris que emudeciam juízes, promotores e jurados... E foi me ensinando naturalmente, o valor do “papel e da caneta” e que para vencer é preciso lutar; por tudo isto você é minha fonte de inspiração. Quero um dia ser o “gigante” que você é hoje.

Ao meu amigo, grande amor e marido Raphael Dutra obrigada pela paciência, pelo carinho e dedicação. Você sempre respeitou meu trabalho com admiração, isto me deu força para continuar, mesmo diante das inúmeras dificuldades. Acredito que valeu a pena tanta distância, todas as renúncias e minhas ausências nos momentos que deveriam ser exclusivamente seus.

Hoje estamos colhendo, juntos, os frutos de nosso empenho!!!!

Esta vitória é nossa!!!!!!!!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida. Por guiar meus passos e me mostrar que tudo acontece no tempo certo e pela oportunidade de conviver com pessoas muito especiais!

Aos espíritos de luz e ao meu anjo da guarda, pela presença constante.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta tese, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

*De maneira muito especial agradeço aos céus por terem reservado minha querida Marta de Lana orientadora e acima de tudo uma grande amiga. A mestra e orientadora agradeço pelo inexaurível apoio, entusiasmo, cobrança, e, sobretudo paciência durante as dificuldades encontradas no aprendizado e conclusão de cada etapa. A Marta amiga agradeço os valorosos conselhos tão carinhosos, sua sensibilidade em circunstâncias diversas foram confortantes. Mas gostaria de fazer um pedido minha amiga **“Jamais desista de mim, quero estar sempre perto de “gigantes” como você, com razão, mas com alma, sensibilidade e coração”**.*

À Prof^ª. Vanessa Mosqueira, pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades concedidas, pela enorme paciência, pelas horas dedicadas me ensinando a fazer o sempre melhor. Precisei (e precisarei) várias vezes de seu vasto conhecimento. Além disso, agradeço pela minha indicação ao programa CAPES/Cofecub.

À Prof^ª. Dênia Antunes Saúde-Guimarães pela confiança depositada ao abrir as portas do laboratório de plantas medicinais, me dando o privilégio de trabalhar com o que hoje é pelo menos para mim a “bala mágica”.

À Prof^ª. Cláudia Carneiro uma colaboradora efetiva neste trabalho e sempre participando da minha formação profissional quando necessário.

À Prof^ª. Andrea-Grabe pela ajuda em minha inserção no Programa CAPES/Cofecub, sendo possível a realização do meu doutoramento sanduíche no laboratório francês de Physiologie & médecine expérimentale du Cœur et des Muscles - INSERM - U1046- Montpellier, France.

Ao Prof. Sylvain Richard chefe da equipe I do laboratório francês de Physiologie & médecine expérimentale du Cœur et des Muscles - INSERM - U1046- Montpellier, France, onde fiz meu doutorado sanduíche. Agradeço a receptividade, a atenção contínua.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que me transmitiram ensinamentos valorosos e sempre me passaram um grande carinho: Carmen de Paula, Vanja Veloso, Bibo.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelas contribuições na minha formação profissional.

Aos professores do Laboratório de doença de Chagas, André Talvani, Maria Terezinha Bahia por sempre me receberem tão bem e dispostos a ajudar sempre.

As amigas do laboratório de nanotecnologia, Lilian Teixeira e Giani Garcia, Vocês sempre estarão comigo.... com vocês aprendi que a união e o espírito em equipe é fundamental, vocês me ajudaram muito. Obrigada Gi pelo carinho, conforto e segurança que você conseguiu me transmitir quando chegou a Montpellier.

Aos meus grandes amigos do laboratório de doença de Chagas com quem passei a maior parte do tempo. Obrigada pela presteza e disponibilidade nos momentos de troca de experiência, nos questionamentos e na busca de respostas nas etapas experimentais. Obrigada por continuarem meus experimentos, enquanto eu estava do outro lado do mundo, em uma nova etapa de vida (doutorado sanduíche). Trabalhar ao lado de vocês é uma honra: Maykon, Carlos, Matheus, Eleonora, Clara, Ana Paula. E que já não fazem mais parte direta da nossa equipe, mas que tanto me ajudaram: Jaqueline e Marianne.

Aos meus amigos, Pati Capelari quantas conversas...tenha a certeza que você me ajudou a crescer. Rodrigo Moreira obrigado pela sua amizade, pelas trocas de conhecimento, pelo seu carinho constante.

A todos os funcionários da Escola de Farmácia, CBIOL e UFOP.

À Coordenação e funcionários do Programa de Pós-graduação CBIOL e Cipharma

Aos funcionários do Biotério....Obrigada por tornar meus dias de trabalho em momentos tão prazerosos.

Ao meu amado e saudoso pai Renato Branquinho, figura forte que mesmo num plano superior incentivou minha caminhada. Você meu pai foi e será um dos grandes responsáveis por todas minhas vitórias e conquistas, pois me ensinou coisas simples, mas, de valores inestimáveis, que ficarão guardadas para sempre.

Sou muito grata a minha família pelo incentivo recebido ao longo destes anos. Aos meus irmãos, Camila, Flávio e Roberto tenham a certeza que muito do que faço me espelho em vocês. Vocês me ajudaram junto com nossos pais na formação da minha índole e personalidade. Amo vocês!!! Individualmente. Não só porque fazem parte da minha unidade familiar, mas pelo valor que cada um tem.

Aos meus sobrinhos Álvaro, Marina, Nando e Rafaela anseio fazer o melhor na vida e nos estudos para que vocês também se espelhem em mim.

A tia Dade sempre carinhosa, atenciosa e incentivadora do meu crescimento profissional.

A Bi e Baba (*in memoriam*) pessoas muito especiais em minha vida e que faleceram vítimas da terrível doença de Chagas.

Aos meus irmãos de república, pelo apoio, compreensão e ajuda nas horas difíceis.

À Universidade Federal de Ouro Preto, CAPES, CAPES Pró-equipentos, CNPq e TOXIFAR/FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A CAPES/DS, pela concessão da bolsa de pesquisa.

À banca examinadora, pelas contribuições e tempo dedicado à avaliação do trabalho.

RESUMO

A doença de Chagas (DCh) apesar de ser um sério problema de saúde pública na América Latina e cada vez mais constatada em países de outros continentes, ainda permanece negligenciada, pois os fármacos existentes para uso humano são ineficazes e causam graves efeitos colaterais. Os objetivos deste trabalho foram: (i) o desenvolvimento, caracterização e validação de formulações de nanocápsulas (NC) convencionais (PCL NC) e furtivas (PLA-PEG NC) contendo a lactona licnofolida (LIC) obtida de *Lychnophora trichocarpa* e (ii) o estudo de sua eficácia terapêutica em camundongos infectados com cepas de diferentes perfis de resistência/susceptibilidade ao Benzonidazol e Nifurtimox (BZ e NF). O isolamento e caracterização da LIC pura foram previamente descritas por Branquinho *et al.* (2014 a). As NC foram produzidas para melhorar a farmacocinética da LIC, diminuir sua toxicidade, promover sua liberação controlada e melhorar sua eficácia terapêutica. As NC foram produzidas por deposição interfacial de polímero pré-formado nas concentrações de 2,0; 3,0 e 4,0 mg/mL da LIC e NC-branca. Em seguida, as LIC NC foram caracterizadas: o tamanho médio de LIC-PCL NC foi de 175,4-245,2 nm e de LIC-PLA-PEG NC de 105,2-159,2 nm. Para ambas NC e em todas as concentrações, os valores obtidos de índice de polidispersão determinados por espectroscopia de correlação de fótons foram $\leq 0,25$. O potencial zeta determinado por anemometria por laser doppler da LIC-PCL NC foi de -42,7 a -57,1 mV e da LIC-PLA-PEG NC -30,3 a -40,1 mV. A morfologia das formulações foi determinada por microscopia de força atômica. As formulações contendo LIC foram quantificadas e validadas por CLAE-UV, conforme os requisitos estabelecidos pelo ICH, (2005). A porcentagem e eficiência de encapsulação das NC, avaliadas pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, foram de aproximadamente 100% para ambas as formulações, indicando que a LIC encontra-se associada ao núcleo oleoso da NC. Uma elevada estabilidade das formulações de LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC foi observada por um período de até seis meses. Foi desenvolvido pela primeira vez, um método bioanalítico empregando CLAE-UV, precedido de extração por precipitação de proteínas da LIC em NC contidas em amostras plasmáticas de animais tratados. O método foi validado de acordo com as especificações do FDA e ANVISA, mostrando-se adequado para ser aplicado ao monitoramento farmacocinético (PK) em modelo murino. Os principais parâmetros farmacocinéticos (pk) observados no tratamento dos camundongos com as NC foram ASC, $t_{1/2}$, *Cl*, TMR, *ke*. Verificou-se de maneira geral, um prolongamento da circulação plasmática, aumento da ASC e do $t_{1/2}$ e uma redução do *Cl* da formulação LIC-PLA-PEG NC em relação à LIC-PCL NC. Os parâmetros PK da LIC livre apresentaram valores estatisticamente inferiores em relação às formulações NC. Os estudos *in vivo* de eficácia terapêutica foram realizados em camundongos Swiss tratados com LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC e BZ utilizado como fármaco de referência. O efeito de NC-LIC, LIC livre, BZ e controles foram avaliados em animais inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos (fase aguda-FA) ou 500 (fase crônica-FC) com as cepas CL, Y, Colombiana e VL-10 (estas duas últimas 100% resistente ao BZ). O tratamento foi administrado via i.v., 2,0 mg/kg/dia e oral 5,0; 8,0 e 12,0 mg/kg/dia, por 20 dias consecutivos e a eficácia terapêutica avaliada por exame de sangue a fresco, hemocultura, PCR e ELISA. Todos os protocolos revelaram atividade parcial da LIC livre e os melhores resultados terapêuticos com a formulação LIC-PLA-PEG NC em relação à LIC-PCL NC e BZ. Os animais infectados com as cepas CL, Y e Colombiana foram tratados na FA com LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC, 2,0 mg/kg/dia e BZ 50 mg/kg/dia, via i.v. Foi verificado que nos animais infectados com a cepa CL a parasitemia foi subpatente, ocorreu aumento da sobrevida e ainda 100% de cura com ambas as formulações nanoestruturadas e BZ. Em animais infectados com a cepa Y a cura foi de 62,5% com LIC-PCL NC, de 100% com LIC-PLA-PEG NC e de 75% com BZ. Nos animais infectados com a cepa Colombiana houve cura de 62,5% apenas com LIC-PLA-PEG NC, acompanhada de significativa redução da parasitemia e aumento da sobrevida. Nos animais infectados com a cepa Y e tratados na FA com as duas formulações de LIC NC, 5,0 mg/kg/dia e BZ 100 mg/kg/dia, via oral, foi verificado cura de 62,5% dos tratados com LIC-PLA-PEG NC e BZ e de 57,2% nos tratados com LIC-PCL NC. Nos animais infectados com a cepa Y e tratados na FC da infecção com a formulação LIC-PLA-PEG NC administrada por via i.v. e oral foram observados índices de cura de 50% e 55%, respectivamente. Este resultado foi estatisticamente superior ao observado com LIC-PCL NC que curou 33% dos animais por via i.v. e 30% por via oral, enquanto nenhum animal tratado com BZ por via i.v. e oral foi curado. Nos animais infectados com a cepa VL-10 tratados na FC com a formulação LIC-PLA-PEG NC, via oral, foi verificado cura de 87,5% dos tratados com a dose de 12,0 mg/kg/dia e de 43% dos tratados com 8,0 mg/kg/dia, enquanto os animais tratados com BZ não foram curados. Este trabalho demonstrou pioneiramente (i) a eficácia terapêutica da LIC *in vivo* quando livre (ii) em formulações de NC (iii), principalmente quando associada ao polímero PLA-PEG (iv), para o tratamento da DCh experimental tanto na FA (v) quanto na FC (vi) da infecção e com cepas totalmente resistentes ao BZ e NF (vii). A formulação PLA-PEG NC alterou os parâmetros PK da LIC aumentando a sua concentração plasmática-tempo o que por consequência, aumentou sua eficácia evidenciando o grande potencial da LIC para estudos clínicos no tratamento da DCh especialmente quando associada a determinado nanocarreador.

ABSTRACT

Chagas disease (DCh) is a serious public health problem in Latin America and has been frequently diagnosed in several countries of other Continents still remains neglected since the drugs existent for human use are ineffective and cause serious side effects. The objectives of this work were: (i) the development, characterization and validation of nanocapsules formulations (NC) conventional (PCL NC) and stealth (PLA-PEG NC) containing lactone lychnopholide (LYC) obtained from *Lychnophora trichocarpha* and (ii) evaluate the therapeutic efficacy of the LYC in mice infected with strains of different profiles of resistance/susceptibility to benznidazole (BZ) and nifurtimox (NF). The isolation and characterization of pure LYC was described by Branquinho *et al.* (2014). The NC were produced to improve the pharmacokinetics of LYC, to reduce its toxicity and to promote controlled releasing in order to improve its therapeutic activity. The NC were produced by interfacial deposition of the preformed polymer at concentrations of 2.0; 3.0 and 4.0 mg/mL of LYC and NC-unloaded. Following, NC were characterized. The size of LYC-PCL NC was of 175.4-245.2 nm and of LYC-PLA-PEG NC was 105.2-159.2 nm and the values of size polydispersion determined by photon correlation spectroscopy of both NC in all concentrations were ≤ 0.25 . The zeta potential was -42.7 mV to -57.1 for LYC-PCL NC and -30.3 to -40.1 mV for LYC-PLA-PEG NC determined by laser doppler anemometry. The morphology was evaluated by size measurement using atomic force microscopy. NC were quantified and validated by CLAE-UV, according the established by ICH (2005). The percentage of encapsulation efficacy of the NC evaluated by the technique of ultrafiltration/ultracentrifugation were of approximately of 100% for both formulations, which confirms the LYC affinity to the oil core of the NC. A high stability of the formulations LYC-PCL NC and LYC-PLA-PEG NC was observed for a period of six months. A bioanalytical method using HPLC-UV preceded of extraction by protein precipitation of LYC NC present in plasma of treated Swiss mice was developed for the first time. This method was validated according to the specifications of FDA and ANVISA and was suitable for its application in pre-clinical pharmacokinetic (PK) monitoring in murine model. The main PK parameters observed in the treatment of mice with NC were ASC, $t_{1/2}$, *Cl*, TMR, *ke*. It was observed a prolongation of LYC NC circulation in the plasma, increased ASC and $t_{1/2}$ and reduction of the *Cl* of the formulation LYC-PLA-PEG NC in relation to LYC-PCL NC. The PK parameters of free LYC showed statistically lower values when compared to the nanostructured formulations. The *in vivo* studies of therapeutic efficacy were done in Swiss mice treated with LYC-PCL NC, LYC-PLA-PEG NC, and BZ used as reference drug. The effect of LYC NC, LYC free, BZ and controls were studied in animals inoculated with 10.000 trypanomastigotes (acute phase-AP) or 500 trypanomastigotes (chronic phase-CF) of strains CL, Y, Colombian and VL-10 (the 2 last, 100% resistant to BZ). The treatment was administered i.v., 2.0 mg/kg/day and oral, 5.0, 8.0 and 12.0 mg /kg /day, for 20 consecutive days. The therapeutic efficacy was evaluated by fresh blood examination, hemoculture, PCR and ELISA. All protocols showed partial activity of free LYC and better results with LYC-PLA-PEG NC in relation to LYC-PCL NC and BZ. The animals infected with the strains CL, Y, Colombian were treated in the AP with the formulations LYC-PCL NC and LYC-PLA-PEG NC, 2.0 mg/kg/day, and BZ 50 mg/kg/day, i.v. route. It was verified that in mice infected with the CL strain subpatent parasitemia, increasing (100%) of the survival and 100% of parasitological cure in animals treated with both NC formulations and BZ. In animals with the Y strain the index of cure was 62.5% with LYC-PCL NC, 100% with LYC-PLA-PEG NC and 75% with BZ. In mice infected with the Colombian strain the cure occurred only in 62.5% of the animals treated also with LYC-PLA-PEG NC, associated to significant reduction of the parasitemia and increasing of the survival. In animals infected with the strain Y and treated in the AP with the two formulations of LYC NC, 5.0 mg/kg/day and BZ 100 mg /kg/day, oral route, it was obtained 62.5% of cure in animals treated with LYC-PLA-PEG NC and BZ, and 57.2% in those treated with LYC-PCL NC. In animals infected with the Y strain treated in the CF with the formulation LYC-PLA-PEG NC administered by i.v. and oral, index of cure of 50% and 55%, respectively, were observed. These index of cure were statistically higher than the obtained with the formulation LYC-PCL NC, i.v. and oral, that cured 33% of the treated by i.v. route and 30% of treated by oral route, while no animals treated with BZ, by oral and i.v. routes, were cured. In animals infected with VL-10 strain (resistant to BZ and NF) treated in the CP of infection with the formulation LYC-PLA-PEG NC, oral route, 87.5% were cured, at dose of 12.0 mg/kg day, and 43% at dose of 8.0 mg/kg/day, while the animals treated with BZ were not cured. This study is pioneer in several aspects: the demonstration of the therapeutic efficacy of LYC *in vivo* (i), when free (ii) and in NC formulations (iii), mainly when associated with the PLA-PEG polymer (iv), in the treatment of experimental Chagas disease, in both, acute (v) and chronic phases of the infection (vi) with *T. cruzi* strains totally resistant to BZ and NF (vii). The formulation PLA-PEG NC changed the PK parameters of the LYC, increasing its plasma concentration-time, which consequently increasing of its therapeutic efficacy, and showing the great potential of this natural substance for clinical studies in the treatment of Chagas disease, especially when associated to determined nanocarrier.

SUMÁRIO

1.0 Revisão Bibliográfica	3
1.1 A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2 Tratamento da doença de Chagas	6
1.3 Importância da pesquisa de produtos naturais na descoberta de novas substâncias para o tratamento de doenças tropicais	10
1.4 Nanocarreadores e suas aplicações biológicas.....	14
1.4.1 Abordagens nanotecnológicas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4.2 Justificativa do emprego dos nanocarreadores (nanocápsulas) no encapsulamento da licnofolida para aplicação no tratamento da doença de Chagas	18
1.4.3 Nanocápsulas	20
2.0 Justificativa geral do trabalho	28
3.0 Objetivo Geral.....	30
3.1 Objetivos Específicos	30
4.0 Metodologias.....	32
<i>Parte I: Obtenção da licnofolida, preparação de nanocápsulas e caracterização físico-química das nanocápsulas com licnofolida.</i>	32
4.1 Metodologia de obtenção das formulações de nanocápsulas	32
4.1.1 Preparações das nanocápsulas.....	32
4.2 Caracterização Físico-Químicas das nanocápsulas	34
4.2.1 Determinação do diâmetro e índice de polidispersão	34
4.2.2 Potencial Zeta (ζ).....	34
4.2.3 Porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação	35
4.2.4 Estudo da estabilidade física	36
4.2.5 Avaliação morfológica das nanocápsulas.....	36
4.3 Validação de metodologia analítica para quantificação da licnofolida nas nanocápsulas poliméricas.....	37
4.4 Análise estatística	37

<i>Parte II: Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo</i>	37
4.5 Validação bioanalítica da licnofolida em plasma por CLAE-UV.....	37
4.5.1 Substância e reagentes.....	37
4.5.2 Equipamentos e Condição cromatográfica.....	38
4.5.3 Padrões de calibração.....	38
4.5.5 Preparo dos padrões de calibração.....	39
4.5.6 Preparo dos padrões de controle de qualidade.....	40
4.5.7 Validação do método para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.....	40
4.5.7.1 Especificidade.....	41
4.5.7.2 Recuperação.....	41
4.5.7.3 Limite de detecção (LD) e quantificação inferior (LQI).....	42
4.5.7.4 Linearidade.....	42
4.5.7.5 Precisão.....	43
4.5.7.6 Exatidão.....	43
4.5.7.7 Estabilidade.....	44
4.5.7.8 Estabilidade de curta duração.....	44
4.5.7.9 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.....	44
4.5.7.10 Estabilidade pós-processamento.....	44
4.5.7.11 Estabilidade das soluções padrão.....	45
<i>Parte III: Estudo farmacocinético da licnofolida administrada a camundongos tratados com diferentes formulações de nanocápsulas</i>	45
4.6 Animais.....	45
4.6.1 Esquema de tratamento, coleta, processamento e armazenamento das amostras de plasma.....	45
4.6.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos.....	47
4.6.3 Análise estatística.....	48
<i>Parte IV: Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com licnofolida modelo murino</i>	49
4.7 Estudos da eficácia da licnofolida <i>in vivo</i>	49

4.7.1 Cepas de <i>T.cruzi</i>	49
4.7.2 Animais	49
4.7.3 Substâncias Ativas	49
4.7.3.1 Extração, purificação, caracterização e preparação das soluções de benzonidazol para administração por intravenosa.	49
4.7.3.2 Preparo da suspensão benzonidazol para administração por via oral	50
4.7.3.3 Preparo das soluções da licnofolida livre.....	50
4.7.4 Infecções dos animais e protocolo de tratamento de fase aguda	50
4.7.5 Infecções dos animais e protocolo de tratamento de fase crônica	53
4.7.6 Confirmação da infecção	57
4.7.6.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)	57
4.7.6.2 Ação do tratamento com as diferentes formulações	57
4.7.6.3 Parasitemia (PAR)	57
4.7.6.4 Sobrevida	58
4.7.7 Outros testes empregados no controle de cura.....	58
4.7.7.1 Avaliações Parasitológicas.....	58
4.7.7.1.2 Hemocultura (HC)	58
4.7.7.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	58
4.7.7.2 Avaliação sorológica	59
4.7.7.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	59
4.7.8 Critério de cura	59
4.8 Análise estatística	60
5.0 Resultados.....	62
<i>Parte I: Obtenção da licnofolida, preparação de nanocápsulas com licnofolida e caracterização físico-química das nanocápsulas com licnofolida</i>	<i>62</i>
5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas: Tamanho e índice de polidispersão	62
5.2 Validação de metodologia analítica para quantificação da licnofolida nas nanocápsulas poliméricas.....	64

5.2.1 Aplicação da metodologia analítica: Porcentagem de encapsulação e Eficiência de encapsulação da licnofolida.....	66
5.3. Estudo da estabilidade física (tamanho e teor) das nanocápsulas contendo licnofolida em função do tempo	66
5.3.1 Fotomicrografias das nanocápsulas com licnofolida	69
<i>Parte II: Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.....</i>	<i>70</i>
5.4 Desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação da licnofolida	70
5.4.1 Condições cromatográficas	70
5.4.2 Purificação das amostras de plasma de camundongos para quantificação da licnofolida	70
5.4.3 Validação do método para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.....	71
5.4.3.1 Especificidade	71
5.4.3.2 Recuperação	71
5.4.3.3 Linearidade.....	72
5.4.3.4 Precisão	73
5.4.3.5 Exatidão	73
5.4.3.6 Limite de quantificação e limite de detecção da licnofolida no plasma	74
5.4.3.7 Estabilidade da licnofolida	74
5.4.3.7.1 Estabilidade de curta duração da licnofolida.....	74
5.4.3.7.2 Estabilidade da licnofolida em ciclos de congelamento e descongelamento	75
5.4.3.7.3 Estabilidade pós-processamento da licnofolida.....	76
5.4.3.7.4. Estabilidade de longa duração da licnofolida.....	76
<i>Parte III: Estudo farmacocinético da licnofolida administrada a camundongos tratados com diferentes formulações de nanocápsulas.....</i>	<i>77</i>
5.5 Quantificação da licnofolida nas amostras de plasma de camundongos	77
<i>Parte IV: Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com licnofolida livre ou encapsulada em camundongos infectados</i>	<i>80</i>
5.6 Estudos da eficácia da licnofolida em diferentes formulações <i>in vivo</i>	80

5.6.1 Curva de parasitemia e sobrevida de animais infectados pelas cepas CL, Y e Colombiana tratados na fase aguda por via intravenosa.....	80
5.6.2 Curva de parasitemia e sobrevida de animais infectados pelas cepas Y na fase aguda e tratados por via oral	86
5.6.3 Eficácia terapêutica fase aguda	88
5.6.3.1 Tratamento por via intravenosa	88
5.6.3.2 Eficácia terapêutica da licnofolida em nanocápsulas por via oral	89
5.6.4 Eficácia terapêutica da licnofolida em nanocápsulas na fase crônica.....	90
6.0 Discussão	95
7.0 Conclusões.....	113
8.0 Perspectivas do trabalho	117
9.0 Referências Bibliográficas.....	119
10.0 Anexos	143

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas químicas do benzonidazol (BZ) e do nifurtimox (NF).6
- Figura 2:** Mecanismo esquemático geral para ação anti-*Trypanosoma cruzi* de lactonas sesquiterpênicas (Saeidnia *et al.*, 2013). 13
- Figura 3:** Estrutura química da licnofolida 14
- Figura 4:** Representação esquemática da estratégia terapêutica de emprego da nanocápsulas para carregamento de fármacos anti-*T. cruzi*. 19
- Figura 5:** Representação esquemática de diferentes tipos de nanocápsulas: A) Nanocápsula convencional com fármaco dissolvido no núcleo oleoso. B) Fármaco adsorvido à parede polimérica. C) Nanocápsula estabilizada estericamente por cadeias poliméricas hidrofílicas que reduzem o reconhecimento pelo sistema imune (furtivas).21
- Figura 6:** Representação esquemática de possíveis rotas para a captação de nanosistemas. (1) pinocitose (endocitose) via receptor, (2) transporte transcelular, (3) transporte paracelular, (4) captação via células M. A largura das setas representa a contribuição de cada processo para a absorção dos nanocarreadores (Adaptado de Paplied *et al.*, 2011). 25
- Figura 7:** Delineamento experimental do estudo farmacocinético da LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC e solução da licnofolida em camundongos *Swiss*, na dose única de 12-13,3 mg/kg por via intravenosa.46
- Figura 8:** Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via intravenosa em camundongos *Swiss* fêmeas inoculados com as cepas CL, Y e Colombiana de *Trypanosoma cruzi* tratados com LIC-PCL NC (nanocápsula de PCL contendo licnofolida), LIC-PLA-PEG NC (nanocápsula de PLA-PEG contendo licnofolida) na dose de 2,0 mg/kg/dia, BZ em solução (Benzonidazol-controle positivo) na dose 50 mg/kg/dia. 51
- Figura 9:** Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos, *Swiss* fêmeas, inoculados a com cepa de Y de *Trypanosoma cruzi*. Tratamentos realizados: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 5,0 mg/kg/dia, BZ em suspensão na dose de 100 mg/kg/dia. 52
- Figura 10:** Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas em camundongos, *Swiss* fêmeas, inoculados a com cepa de Y de *Trypanosoma cruzi*: A) Tratamento pela via i.v.- os animais foram tratados com: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 2,0 mg/kg/dia, BZ em solução na dose

50,0 mg/kg/dia. B) Tratamento pela via oral - os animais foram tratados com: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 5,0 mg/kg/dia; BZ em suspensão na dose 100,0 mg/kg/dia. 54

Figura 11: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos, Swiss fêmeas, inoculados a com cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi*. Tratamentos realizados: LIC-PLA-PEG NC nas doses de 8,0 e 12,0 mg/kg/dia; BZ em suspensão na dose de 100 mg/kg/dia. 55

Figura 12: Imagens de microscopia de força atômica: (A e D) de altura, (B e E) de fase e de (C e F) de amplitude das formulações LIC-PCL NC (imagens superiores) e da LIC-PLA-PEG NC (imagens inferiores) mostrando nanoestruturas esféricas. 64

Figura 13: Perfil cromatográfico das nanocápsulas de PCL (-----) e PLA-PEG (—) e licnofolida após dissolução em acetonitrila. 65

Figura 14: A) Estabilidade em relação ao tamanho de nanocápsulas de licnofolida (LIC-PCL NC). B) Estabilidade em relação à porcentagem de encapsulação das nanocápsulas de licnofolida (LIC-PCL NC) após seis meses de armazenamento a 4°C. 67

Figura 15: A) Estabilidade em relação ao tamanho de nanocápsulas de licnofolida (LIC-PLA-PEG NC). B) Estabilidade em relação à porcentagem de encapsulação das nanocápsulas de licnofolida (LIC-PLA-PEG NC) após seis meses de armazenamento a 4°C. 68

Figura 16: Fotomicrografia de nanocápsulas (a) LIC-PLA-PEG NC e (b) LIC-PCL NC. 69

Figura 17: Cromatograma da licnofolida e PI (itraconazol) nas concentrações de 10,0 µg/mL e 2,5 µg/mL no comprimento de onda de 267 nm em detector ultravioleta, empregando como fase móvel acetonitrila:água na proporção 70:30 (v/v), fluxo de 1,0 mL/min., e temperatura de 30°C. 70

Figura 18: Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostras de plasma branco (linha cinza claro - 2 amostras) e plasma hemolisado (cinza escuro) obtidos de animais sadios sem a administração da LIC, comparado ao perfil cromatográfico do PA: LIC na concentração de 10 µg/mL e do seu PI: ITZ na concentração de 2,5 µg/mL, nas condições cromatográficas desenvolvidas para quantificação. 71

Figura 19: Curva de calibração do método analítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo por cromatografia líquido de alta eficiência utilizando acetonitrila:água na proporção de 70:30 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 30°C. 73

Figura 20: Perfil plasmático da licnofolida em escala semilogarítmica nas diferentes formulações, solução intravenosa de LIC livre e nanocápsulas de PCL e de PLA-PEG após administração

intravenosa, na dose única de 12-13,3 mg/kg em camundongos Swiss (média \pm erro padrão, $n = 6$).	79
Figura 21: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa CL de <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia); LIC livre 2,0 mg/kg/dia por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa.	81
Figura 22: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa.	83
Figura 23: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa.	85
Figura 24: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados com BZ (benzonidazol) 100 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via oral e controle INT: infectado não tratado. dpi: dias pós-infecção.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes tipos de nanocarreadores e aplicações.....	15
Tabela 2: Fármacos anti-tripanicida associados a sistemas vetorizados testados <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	17
Tabela 3: Composição de nanocápsulas de PCL (poli-ε-caprolactona).....	33
Tabela 4: Composição de nanocápsulas de PLA-PEG	33
Tabela 5: Testes de recuperação da licnofolida em plasma de camundongo.....	39
Tabela 6: Preparo das amostras de plasma padrão utilizadas na curva de calibração da quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.	40
Tabela 7: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade	40
Tabela 8: Características físico-químicas de formulações de nanocápsulas de PCL e PLA-PEG contendo licnofolida nas concentrações de 2-4 mg/mL.....	62
Tabela 9: Precisão e Exatidão da licnofolida determinadas por método analítico.	65
Tabela 10: Avaliação da porcentagem e eficiência de encapsulação de formulações de nanocápsulas de PCL e PLA-PEG contendo licnofolida nas concentrações de 2-4 mg/mL.	66
Tabela 11: Testes de recuperação da licnofolida em plasma de camundongo.	72
Tabela 12: Recuperação média (n=6) do procedimento de purificação das amostras de plasma de controle de qualidade adicionadas da licnofolida (PA) e itraconazol (PI).....	72
Tabela 13: Precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método analítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.....	74
Tabela 14: Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma (n=6), analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.	75
Tabela 15: Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma de camundongo (n=6) mantidas à temperatura de -20°C e submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.	75

- Tabela 16:** Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma de camundongo (n=6) mantidas à temperatura de 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.. 76
- Tabela 17:** Estabilidade da LIC em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a - 20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. 76
- Tabela 18:** Parâmetros farmacocinéticos após administração intravenosa (*bolus*) da licnofolida (12-13,3 mg/kg) em diferentes formulações..... 77
- Tabela 19:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com diferentes cepas de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0 mg/kg/dia, usando diferentes formulações durante a fase aguda da infecção..... 88
- Tabela 20:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepas Y de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via oral na dose de 5,0mg/kg/dia, durante a fase aguda da infecção..... 90
- Tabela 21:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa Y de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia, via oral na dose de 5,0 mg/kg/dia, durante a fase crônica da infecção. 90
- Tabela 22:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PLA-PEG e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa VL-10 de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via oral nas doses de: 8,0 mg/kg/dia e de 12,0 mg/kg/dia, durante a fase crônica da infecção. 91
- Tabela 23:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com diferentes cepas de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia e via oral na dose de 5,0 mg/kg/dia, durante a fase aguda infecção. 92
- Tabela 24:** Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa Y e VL-10 de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia e via oral nas doses de 5,0 mg/kg/dia, 8,0 mg/kg/dia e 12 mg/kg/dia, durante a fase crônica da infecção..... 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN=acetonitrila

ALD=anemometria do laser dopler

ANOVA=análise de variância

ANVISA=agência nacional de vigilância sanitária

ASC_{0-720} = área sob a curva até 720 minutos

$ASC_{0-\infty}$ =área sob a curva extrapolada ao infinito

$ASMC_{0-720}$ = área sob a curva no primeiro momento até 720 minutos

$ASMC_{0-\infty}$ = área sob a curva no primeiro momento extrapolada

BZ=Benzonidazol

CCA=Centro de Ciência Animal

CETEC=Centro Tecnológico de Minas Gerais

Cl=clearance ou depuração

CLAE=Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjos diidos

$C_{média}$ =concentração média determinada

COBEA=Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CQA=Controle de Qualidade Concentração Alta

CQB=Controle de Qualidade Concentração Baixo

CQM=Controle de Qualidade Concentração Médio

$C_{teórica}$ = concentração teórica ou nominal

CV(%)= coeficiente de variação em porcentagem

d.p.i=dia pós-infecção

d.p.t= dia pós tratamento

DCh= doença de Chagas

DMA:PEG= dimetilacetamida: polietilenoglicol

DMA= N,N-dimetilacetamida

DNDi= Iniciativa de drogas para doenças negligenciadas

DP= desvio padrão

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas

ECF = espectroscopia de correlação de fótons

EDTA= Ácido etilenodietildinitrotetracético

ELISA=Enzyme Linked-Immuno-sorbent Assay

ESF= exame de sangue a fresco

FDA= Food and Drug Administration

Guanidina-HCl=Cloridrato de guanidina

HC=Hemocultura

i.p= via intraperitoneal

IP= índice de polidispersão

i.v.=via intravenosa ou endovenosa

IBE= inibidor da biossíntese de ergosterol

IC=inclinação da curva de calibração

IgG= Imunglobulina G total (gamaglobulina)

INPI=Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil)

INT=controle infectado não tratado

ITZ = itraconazol

L. trichocarpha= *Lychnophora trichocarpha*

LD= Limites de detecção

LIC= licnofolida

LogP= log do coeficiente de partição octanol/água

LQ = limite de quantificação

LQI= Limite de quantificação inferior

LS= lactonas sesquiterpênicas

MeOH= metanol

MFA= microscopia de força atômica

TMR=tempo de residência médio no plasma

NC= nanocápsulas

NC-Br=nanocápsula branca

NF= nifurtimox

NP=nanopartícula

PA=padrão analítico

PAR=parasitemia

PBS= salina tamponada com fosfato

PCL= poli-ε-caprolactona

PCR= Reação em cadeia da polimerase

PEG= polietilenoglicol

PI=padrão interno

PLA= ácido poli (*D, L-lático*)

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

PMP= pico máximo de parasitemia

PPP= período pré-patente

POZ=posaconazol

R% = porcentagem de recuperação

r^2 = coeficiente de correlação

RMN¹³C= ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN¹H= ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1

rpm = rotações por minuto

RSD= desvio padrão relativo

S = média dos valores de inclinação obtidos das mesmas cinco curvas de calibração.

SFM = sistema fagocítico mononuclear

SLIC = soluções de LIC

T. cruzi = *Trypanosoma cruzi*

$t_{1/2}$ =tempo de meia-vida de eliminação

TGI = trato gastrointestinal

TS=tripomastigota sanguíneo,

TTm= tratamento

UV= ultravioleta

V_d= volume de distribuição

α = desvio padrão do intercepto com o eixo Y observado para cinco curvas de calibração

ζ = potencial zeta

ke =constante de eliminação

1.0 Revisão Bibliográfica

1.1 A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

Doenças tropicais negligenciadas, tendo como exemplo a doença de Chagas, afetam aproximadamente um bilhão de indivíduos que vivem em áreas muito pobres, sendo em seu conjunto uma das principais causas de impedimento para avanço socioeconômico em muitos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, além de causar alta morbidade e mortalidade (Richard & Werbovetz, 2010; WHO/Trends, 2012).

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (DCh), descoberta em 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909), é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Decorridos mais de 100 anos da sua descoberta, a doença ainda é epidemiologicamente relevante e considerada a sexta doença mais negligenciável do mundo (Lamas *et al.*, 2006; Hotez *et al.*, 2006). Atualmente, existem aproximadamente 7-8 milhões de pessoas infectadas em todo mundo (WHO, 2013), sendo três milhões destas somente no Brasil. A DCh é responsável ainda pela ocorrência de mais de 10.000 mortes por ano e mais de 25 milhões de pessoas estão em área de risco (WHO/Trends, 2012). Um dos motivos do risco das pessoas se infectarem é a existência de grande quantidade de reservatórios, sendo a infecção por *T. cruzi* relatada em mais de 150 espécies de animais domésticos, rurais e selvagens (Rassi *et al.*, 2010, Coura, 2013). Além disso, esta endemia é considerada um sério problema de saúde pública em 21 países em desenvolvimento na América Latina, compreendendo a faixa que se estende a partir do sul dos Estados Unidos até a Argentina meridional (Dias, 2006; Coura & Borges, 2012, WHO, 2013). Na atualidade, a DCh também representa um novo desafio mundial devido a sua expansão para países não endêmicos, como os Estados Unidos, Canadá, Japão, França e Espanha e Austrália como resultado da migração de indivíduos infectados (Coura & Borges-Pereira, 2010, Coura & Viñas, 2010, Coura, 2013). Além disso, um estudo realizado por Reisenmm *et al.* (2010) mostrou que 41% dos insetos triatomíneos presentes na área peridomiciliar de Tucson, no Arizona (EUA) estão infectados com *T. cruzi*, ilustrando o potencial risco de transmissão vetorial na América do Norte onde diversos casos autóctones já foram descritos. Uma preocupação também crescente tem sido os números de casos de cães infectados do Texas, Tennessee, Louisiana, Oklahoma, Georgia, Carolina e Virginia, demonstrando que existe um ciclo de transmissão ativo nesses animais (Parker & Sethi, 2011). Constata-se assim, que a DCh, é um problema de saúde pública de ampla abrangência.

De um modo geral, a trajetória da enzootia chagásica primitiva à antrozoose foi resultante da ação antrópica, que fez com que os vetores fossem deslocados de seus ecótopos silvestres pelo esgotamento ou limitações de suas fontes alimentares originais (Silveira, 2002; Coura, 2013). Por sua vez, os vetores passaram a colonizar as habitações humanas devido às más condições

socioeconômicas, principalmente das populações rurais das regiões endêmicas (Gurlter *et al.*, 2008). Significantes avanços no controle da transmissão vetorial e transfusional do *T.cruzi* têm sido alcançados em algumas partes do Continente, particularmente devido à iniciativa do Cone Sul que levou a interrupção da transmissão vetorial e por transfusão sanguínea no Uruguai, Chile e Brasil nos últimos anos, e da significativa redução da prevalência (Schofield *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007, Coura & Dias, 2009). Entretanto, são muitos os desafios para atingir um controle total ou a eliminação da doença devido a sua peculiar epidemiologia, caracterizada pela diversidade de situações de risco: grande número de vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de infecção e diferentes estoques do parasito que circulam no ambiente domiciliar, peridomiciliar e silvestre (Rassi *et al.*, 2010). O desigual progresso dos programas de controle vetorial e transfusional em outras partes da América Latina e do Continente, as limitações dos métodos de diagnóstico, os resultados muitas vezes insatisfatórios para o tratamento específico e sintomático dos indivíduos infectados, a inexistência de medidas profiláticas em países não endêmicos e de esquemas terapêuticos mais eficientes (menos tóxicos, de baixo custo e mais efetivos), e a falta de um entendimento mais completo da fisiopatologia e da evolução da doença crônica, são outros problemas a serem contornados (Coura & Castro, 2002; Dias, 2007 b; Dias *et al.*, 2008; Reinthinger *et al.* 2009; Coura, 2013).

O principal mecanismo de transmissão da DCh nos mamíferos se dá por insetos vetores ou triatomíneos da família Reduviidae e ocorre por contaminação com tripomastigotas metacíclicos presentes nas suas fezes ou urina eliminados durante ou após o repasto sanguíneo. A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre quando as fezes contendo tripomastigotas metacíclicos contaminam mucosas, conjuntivas e/ou superfícies lesadas. Estas formas evolutivas ao penetrarem no hospedeiro invadem os fagócitos mononucleares sendo capazes de escapar de seus mecanismos de destruição e se transformarem em amastigotas no citoplasma destas células, aproximadamente 35 horas depois da infecção. Após a multiplicação, no citoplasma das células hospedeiras, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas. Posteriormente, estes são liberados por ruptura celular e alcançam o sistema circulatório passando então a ser denominados tripomastigotas sanguíneos, potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada (Dias, 1934; Brener, 1973; Zeledon 1974; Garcia & Azambuja 1991, 1996; Gonzalez *et al.*, 1998; de Souza, 2002, Lana & Machado, 2010) ou para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo, completando assim o ciclo evolutivo do parasito. No homem, além do contágio com excretas de triatomíneos infectados, a transmissão do *T.cruzi*, pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita (Brener & Gazzinelli, 1997; Coura, 2009, Coura & Dias, 2009) e, mais recentemente, transmissão por alimentos contaminados com as formas tripomastigotas do parasito e por acidente laboratorial (Dias, 2006; Rassi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010).

A infecção pelo *T. cruzi* determina no homem quadros clínicos com características muito variadas (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010; WHO/Trends, 2012). Após a infecção e um subsequente período de incubação, tem-se o início da fase aguda da DCh. Na ausência de tratamento específico, seus sintomas podem persistir por um período de dois a quatro meses, com taxa de mortalidade variando de 2-8%, principalmente em crianças. Essa fase da doença é muitas vezes imperceptível ou oligossintomática na grande maioria dos casos, com manifestações clínicas diversas tais como: febre, edema, mialgia, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca e sintomas neurológicos (Coura & Castro, 2002, Coura & Borges-Pereira, 2010). Na fase aguda podem ocorrer ainda os fenômenos de porta de entrada inicial do parasito, tais como o edema palpebral (sinal de Romana) e subcutâneo (chagoma de inoculação), que auxiliam muito na suspeita clínica da DCh (Romana, 1935; Prata, 2001; Coura & Dias, 2009). Com a instalação da resposta imune do hospedeiro, as manifestações da fase aguda regredem e instala-se gradativamente a fase crônica na qual a parasitemia e o parasitismo são escassos, o que persiste por toda a vida indivíduo. A fase crônica pode ser subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A forma indeterminada é definida como um estado no qual o indivíduo apresenta-se assintomático, mas com sorologia positiva, xenodiagnóstico e/ou hemocultura e PCR positivos ou não, dano cardíaco discreto causado pela persistente inflamação, que não reflete em alterações no ECG convencional, e exames radiológicos do tórax e abdômen normais. A forma indeterminada dura cerca de 10 a 20 anos, ou mesmo pelo resto da vida do paciente (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010). Cerca 30 a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas sintomáticas da DCh crônica. A forma cardíaca que ocorre em cerca de 30% dos casos é caracterizada por sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e alterações eletrocardiográficas de gravidade variável. Ela é responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da doença pela ocorrência frequente do fenômeno de morte súbita (Prata, 2001; Rassi *et al.* 2010). A forma digestiva (10% dos casos) é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais do esôfago e do cólon. Pacientes com a forma mista apresentam sintomatologia cardíaca e digestiva associadas (Prata, 2001; Rassi *et al.* 2010).

Os fatores envolvidos na patogênese da DCh ainda não são completamente conhecidos e durante muitos anos os estudos referentes à eficácia do tratamento medicamentoso frente ao parasito foram deixados em segundo plano, sendo a autoimunidade considerada o principal mecanismo responsável pelo desencadeamento das lesões que acometem os indivíduos infectados (Cunha-Neto, 1995). Até meados da década de 90, o tratamento etiológico era indicado principalmente aos casos agudos (The National Health Foundation of Brazil, 1996). Entretanto, com as crescentes evidências obtidas após o surgimento de métodos mais sensíveis tais como a imunohistoquímica e a PCR (reação da polimerase em cadeia) de que a existência do parasito representa

um fator importante na origem da lesão, e conseqüentemente na subsequente evolução da doença (Higuchi *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Tarleton, 2003; Nitz *et al.*, 2004), e que o tratamento pode atuar benéficamente no prognóstico e evolução clínica da doença, mesmo nos casos não curados (Andrade *et al.*, 1991; Viotti *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1994; Fragata-filho *et al.*, 1995; Suasnábar *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2005; Viotti *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2006; Lana *et al.*, 2009; Machado-de-Assis *et al.*, 2012), o grupo de especialistas em quimioterapia da DCh passou a recomendá-lo a todo paciente soropositivo (exceto para aqueles que apresentam formas clínicas avançadas), em ambas as fases de infecção, com o objetivo de erradicá-la, evitar o agravamento das lesões e interromper ou diminuir a transmissão do parasito (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

1.2 Tratamento da doença de Chagas

Apesar de esforços agregados a partir de diferentes iniciativas governamentais (Iniciativas de países do Cone Sul) e não governamentais (ex. Médicos Sem Fronteiras-MSF) que resultaram no declínio acentuado de novos casos agudos, a DCh ainda apresenta muitos desafios inclusive à inexistência de terapias profiláticas e de esquemas terapêuticos efetivos especialmente para pacientes crônicos tardios (Coura & Castro, 2002; Dias, 2007 a). Como todas as doenças negligenciadas, o desenvolvimento e a produção de fármacos para o tratamento da DCh não é de interesse das indústrias farmacêuticas, principalmente, devido à falta de potencial mercado nos países afetados, e conseqüentemente de retorno financeiro incompatível com os elevados custos de investimentos necessários ao desenvolvimento de novos fármacos (Buckner & Navabi, 2010).

O atual tratamento da DCh é baseado em dois compostos nitro heterocíclicos (caracterizados por um grupo nitro ligado a um anel aromático): benzonidazol (BZ) e o nifurtimox (NF) (**Figura 1**).

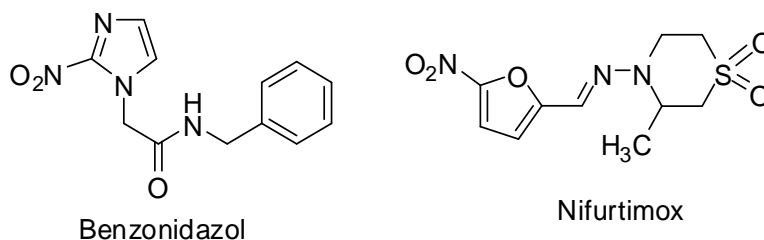


Figura 1: Estruturas químicas do benzonidazol (BZ) e do nifurtimox (NF).

Ambos foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70, sendo que o NF teve sua produção descontinuada na década de 80, tendo sido recentemente reintroduzido na clínica e distribuído pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010). Estes compostos (NF e BZ) são

parcialmente efetivos e apresentam severos efeitos colaterais (Coura & Castro, 2002). Ambos os fármacos requerem longo período de tratamento que geram frequentemente seu abandono ou interrupção pelo paciente (Coura & Castro, 2002).

Diversos trabalhos têm demonstrado que os resultados obtidos com ambos os fármacos (NF e BZ) variam de acordo com a fase da doença, o período do tratamento, a dose e origem geográfica do paciente. Este último fator pode estar associado à diferença na susceptibilidade a drogas entre as linhagens do parasito, presentes nas regiões estudadas (Andrade *et al.*, 1985; Filardi & Brener, 1987; Andrade *et al.*, 1992; Toledo *et al.*, 1997; Coura & castro, 2002). Desta forma, a genética e a biologia do parasito, o uso de diferentes regimes terapêuticos e também o critério de cura empregado (Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002; Toledo *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2012) são importantes fatores que estão associados com as discrepâncias observadas em relação aos resultados do tratamento específico da doença de Chagas.

Em geral, os resultados do tratamento são melhores quanto mais precocemente à doença é diagnosticada e o tratamento iniciado. Resultados satisfatórios têm sido obtidos na fase aguda, em infecção recente crônica, infecção congênita e acidentes de laboratório (Coura & Castro, 2002). As razões para a marcada diferença na eficácia antiparasitária dos compostos NF e BZ nas fases agudas e crônicas da doença não são bem determinados (Cançado, 2002). Entretanto, podem estar relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis destes compostos como a meia-vida relativamente curta (Urbina & Docampo, 2003; Romero & Morilla, 2010). Estes fatores podem dificultar a sua ação na fase crônica da doença quando os parasitos estão confinados profundamente nos tecidos onde sofrem lenta replicação (Urbina, 2009; Urbina, 2010; Buckner, 2008). Além disso, verificar de maneira eficiente a cura parasitológica em indivíduos tratados durante a fase crônica, quando os níveis de parasito circulantes podem ser extremamente baixos, permanece um desafio (Bahia *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008).

Os mecanismos de ação destes compostos ainda são pouco conhecidos. O mecanismo de ação do NF envolve redução do grupo nitro em radicais nitro aniônicos instáveis que produzem metabólitos altamente reativos e tóxicos, como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (Docampo, 1990; Maya *et al.*, 2007). O BZ também age causando estresse redutivo que envolve reações covalentes de macromoléculas, originadas pela nitro-redução de radicais intermediários e vários componentes celulares como RNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (Docampo, 1990; Maya *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2011). É fato recente, que o BZ e o NF atuam como pró-drogas e devem sofrer ativação mediada por enzimas (nitroreduases mitocondriais) do parasita que geram radicais livres citotóxicos para o mesmo (Irigoin *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2008). Em *T. cruzi* sugere-se que essas enzimas atuem como NADH: ubiquinona oxidoreduases na mitocôndria desses parasitas (Hall *et al.*, 2012).

A alta reatividade dos metabólitos formados por meio do mecanismo de ação de NF e BZ faz com que estes possam atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro (humano). Esta baixa especificidade de ação em vias bioquímicas definidas do parasito contribui para os efeitos tóxicos observados durante o tratamento dos pacientes.

Os efeitos adversos mais comuns para o NF são perda de peso, sonolência, além de algumas manifestações digestivas, tais como náuseas, vômitos e cólicas intestinais (Coura & Castro, 2002; Castro *et al.* 2006). Já os efeitos adversos mais frequentes para o BZ, podem ser agrupados em três categorias: (1) manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, (2) depressão da medula óssea, incluindo neuropatia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; e (3) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (Castro *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2009).

Considerando a hipótese da persistência do parasito nas lesões durante a fase crônica da DCh, supõe-se que a administração de fármacos possa diminuir a carga parasitaria em tecidos infectados e, dessa forma, reduzir a gravidade dos processos inflamatórios associados com as formas clínicas crônicas da tripanossomíase americana (Urbina & Docampo, 2003). Porém, os baixos índices de cura detectados em indivíduos tratados durante a fase crônica, associados aos efeitos adversos apresentados pelos compostos nitro uranos e nitroimidazólicos (Urbina e Docampo, 2003), e ainda à existência de populações do *T. cruzi* naturalmente resistentes ao BZ e ao NF, tornam imprescindível a descoberta de novos fármacos tripanocidas (Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006, Soeiro & Castro, 2009).

Avanços no conhecimento das vias metabólicas do *T. cruzi* têm permitindo identificar alvos racionais para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seguros para o tratamento da DCh. Esses estudos têm revelado diferenças no metabolismo do parasito e das células de mamíferos que podem constituir alvos racionais para o desenvolvimento de novos fármacos. Existem os inibidores da cisteíno-protease cruzipaina: tiocarbazina (Du *et al.*, 2002); inibidor da enzima farnesilpirofosfato sintase envolvida na síntese de esteróis e polisoprenóides do *T. cruzi*: pamidronato e risedronato (Urbina *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001, Garzoni *et al.*, 2004); inibidores dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo reductivo: fenotiazinas como clomipramina e thiordidazina, nitrofuranos, nitroimidazóis e nafitilquinonas (Rivarola *et al.*, 2002; D'Silva *et al.*, 2002; Lo Presti *et al.*, 2004; Bahia *et al.*, 2012; Fauro *et al.*, 2013). Inibidor da interação de enzimas/fatores/proteínas ao DNA e/ou inibidores diretamente da transcrição (Soeiro & Castro, 2009): arilimidamidas (Pacheco *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2012); inibidor da cadeia de transporte de elétrons (Ferreira *et al.*, 1986; Maya *et al.*, 2001); inibidores da hipoxantina-guaninafosforibosil transferase: pamidronato e risedronato (Freyman *et al.*, 2000; Montalvetti *et al.*, 2001; Garzoni *et al.*, 2004) e alopurinol (Ávila *et al.*, 1984; Rassi *et al.*, 2007).

Aparentemente, os inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) são os candidatos mais promissores para tratamentos *in vitro* e *in vivo* (Urbina, 2009). A atividade anti- *T.cruzi* de quatro classes de IBE foram testadas em experimentos *in vitro* ou *in vivo*: inibidor de esqualeno sintase, inibidor de esqualeno epoxidase, inibidor de óxidoesqualeno ciclase e inibidor de C14 α - demetilase (CPY51). O que diferencia essas classes de compostos é o ponto de inibição da via de síntese de ergosterol (Guedes *et al.* 2006, Buckner & Urbina, 2012). Dentre os IBE os triazólicos foram nos últimos anos, os candidatos mais indicados para triagens clínicas em humanos (Clayton, 2010; Urbina, 2010), principalmente o posaconazol e o E1224 (pró-fármaco do ravuconazol) devido as suas características farmacocinéticas favoráveis e à capacidade de induzir a cura em camundongos infectados com cepas resistentes ao BZ e NF (Molina *et al.*, 2000; Buckner & Urbina, 2012 a). Eles foram avaliados recentemente em ensaios clínicos de fase II no tratamento de indivíduos assintomáticos na fase crônica da DCh. Entretanto, os resultados clínicos evidenciaram que apesar do posaconazol e E1224 apresentarem perfil favorável de segurança e toxicidade, falhou em induzir cura parasitológica em cerca de 90% dos pacientes tratados (Israel Molina, International Congress of Tropical Medicine, Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene November 2013). Esses estudos mostraram a necessidade de busca de novos fármacos e/ou protocolos de tratamento mais eficazes para os pacientes.

Apesar da potente atividade dos IBE contra o *T.cruzi* em animais experimentalmente infectados e da ausência de resistência cruzada com as drogas usadas correntemente, a resposta é extremamente variável entre diferentes cepas do parasito nos modelos murino e canino (Guedes *et al.* 2004; Toledo *et al.* 2003; Molina *et al.* 2000; Diniz *et al.*, 2010, 2013). Além disso, mesmo que alguns compostos como o posaconazol e o E1224 (pró-droga do ravuconazol) já estejam em estudo clínico, o alto custo e a complexidade de produção são ainda fatores limitantes na utilização desses compostos no tratamento humano (Urbina, 2009, Clayton, 2010) de uma doença que acomete principalmente pessoas de baixo poder aquisitivo.

Apesar desse grande número de compostos testados que apresentaram atividade anti-*T. cruzi* “*in vitro*” e “*in vivo*”, até o momento, somente quatro fármacos foram submetidos aos ensaios clínicos, incluindo o cetoconazol, o itraconazol, o alopurinol e o posaconazol. De um modo geral os resultados das triagens clínicas obtidas com estes fármacos foram contraditórios. No Brasil, cetoconazol, o itraconazol, o alopurinol não foram capazes de erradicar a infecção em animais e humanos ou de impedir a progressão da doença (Lauria-Pires *et al.*, 1988; Brener *et al.*, 1993). Por outro lado, no Chile, considerável redução na positividade dos testes parasitológicos e regressão ou prevenção das alterações eletrocardiográficas foram observadas após tratamento com esses fármacos (Apt *et al.*, 1998; Apt *et al.*, 2003).

Em meio a um cenário complexo, os principais desafios na farmacoterapia da DCh são: (i) a redução da frequência de administração de fármacos para melhorar a conformidade e aderência, (ii) o uso de regimes de administração dos fármacos mais adequados para prevenir efeitos adversos; (iii) diagnóstico mais precisos e exatos (Romero & Morilla, 2010). Entretanto, novas abordagens e metodologias tem sido buscadas como uso de combinações de fármacos (da Silva *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2013), e revisões recentes citam alguns exemplos (Espuelas *et al.*, 2012), bem como o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas dos fármacos já utilizados ou novos candidatos ao tratamento da DCh.

1.3 Importância da pesquisa de produtos naturais na descoberta de novas substâncias para o tratamento de doenças tropicais

Produtos naturais com propriedades terapêuticas são utilizados desde o início da história da civilização humana e, durante muito tempo, foram o principal recurso terapêutico empregado na prevenção, tratamento e cura de distúrbios e disfunções em homens e animais (Veiga *et al.*, 2005). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Segundo no período de 1981 a 2010, foram registradas 1184 novas substâncias químicas, sendo que 70% são de origem natural (Newman *et al.*, 2003; Newman & Gragg, 2007; Newman & Gragg, 2012). A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas nas quais se constatou que 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo originam-se de plantas, sendo 121 compostos ativos já de uso comum (Valli *et al.*, 2012). De 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos a partir de protótipos de fonte natural (Rates 2001; Raskin, *et al.*, 2002; Valli *et al.*, 2012).

Em 2006, o Ministério da Saúde publicou o texto *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos*. Esse leva em conta a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) que sugere a adoção das práticas tradicionais aponta a urgente necessidade de implantação de uma política nacional que contemple diretrizes e ações voltadas à inserção das Plantas Mediciniais e da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) e de regulamentação sanitária específica para o setor de produção pública de preparações fitoterápicas, o que proporcionarão a uniformização dos padrões de produção e fornecimento de plantas medicinais e fitoterápicos assegurando, assim, a qualidade nos serviços e insumos disponíveis aos usuários do SUS (Ministério da Saúde, 2006).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação são fundamentais, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica, como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro & Fraga, 1999; Barreiro & Bolzani, 2009). Nos últimos vinte anos, o número de informações sobre plantas medicinais no Brasil cresceu apenas 8% anualmente. Isso mostra que em um país tão rico em diversidade biológica as pesquisas com plantas medicinais deveriam ser mais incentivadas (Mariz *et al.*, 2006).

As doenças tropicais desafiam as pesquisas científicas, pois os medicamentos existentes não possuem ainda uma boa eficácia. As tripanossomíases são doenças de grande importância no Brasil e no mundo, como é o caso da DCh e das leishmanioses tegumentar e visceral. Dessa forma a DCh e as leishmanioses são importantes enfermidades a serem combatidas (Alviano *et al.*, 2012). Estudos realizados em vários países incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia, relatam que muitas espécies vegetais possuem atividade sobre *T. cruzi* (Abe *et al.*, 2002; Luize *et al.*, 2005) e várias revisões sobre o tema valem ser citadas (Saúde-Guimarães & Faria, 2007; Maya *et al.* 2007; Izumi *et al.*, 2011, Uchiyama, 2009). Nesse sentido as plantas se apresentam como uma das direções promissoras na busca de novos fármacos mais eficazes na prevenção e tratamento da doença de Chagas (Saúde-Guimarães & Faria, 2007).

1.3.1 Algumas lactonas sesquiterpênicas com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

O gênero *Lychnophora* é um dos sete gêneros da subtribo *Lychnophorinae* (tribo *Vernoniaceae*, *Asteraceae*) (Bohlmann & Jakupovic, 1990). É distribuído amplamente no Brasil, sendo sua ocorrência desconhecida fora dos limites brasileiros (Bohlmann & Jakupovic, 1990). As espécies são características dos campos rupestris (região de cerrado), ocorrendo principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Bohlmann & Jakupovic, 1990). As *Lychnophoras* são conhecidas na medicina popular como “arnica”, “falsa arnica”, “candeia” ou “arnica da serra” devido ao odor semelhante à arnica europeia (Cerqueira *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 1996). Elas são utilizadas na medicina popular como preparações alcoólicas e hidroalcoólicas, embebidas em álcool ou cachaça, no tratamento de dor, inflamação, contusões e picadas de insetos (Cerqueira *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 1996; Saúde *et al.*, 1998; Lopes, 2001). Estudos fitoquímicos demonstraram que o gênero *Lychnophora* acumula vários metabólitos secundários, dentre eles as lactonas sesquiterpênicas (Bohlmann *et al.*, 1981; Cunha, 1994; Bazon *et al.*, 1997; Borella *et al.*, 1998; Borsato *et al.*, 2000; Graef *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Gobbo-Neto *et al.*, 2008).

As lactonas sesquiterpênicas (LS) presentes neste gênero pertencem as classes furanoeliangolida, goiazensolida, eremantolida, guaianolida e eudesmanolida, sendo o sufixo “olida” usado para indicar a presença do grupo lactona. Esta classe de micromoléculas é considerada marcador químico da família *Asteraceae* de onde a grande maioria das substâncias com

enorme variedade estrutural foi isolada (Seaman, 1982). Um grande número de lactonas sesquiterpênicas e suas origens são descritas em “The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones,” in Herz *et al.* (1979). As lactonas sesquiterpênicas contêm grupos funcionais alquilantes responsáveis por suas principais ações biológicas, bem como por seus efeitos tóxicos tais como α , β -ciclopentenona insaturada (Uchiyama, 2009) e a α -metileno- γ -lactona (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986; Schmidt, 2009) que atuam alquilando nucleófilos biológicos, tais como L-cisteína ou enzimas contendo sulfidrilas por adição do tipo Michael (Schmidt, 1997). O seu mecanismo de ação está provavelmente, associado à inibição de enzimas lisossomais que conduzem por sua vez, à inibição da síntese do DNA e, portanto a multiplicação de microorganismos unicelulares, tais como os protozoários da família Trypanosomatidae (**Figura 2**). Uchiyama (2009) sugeriu que a atividade tripanocida destes compostos foi em grande parte dependente da formação de uma ligação covalente entre a porção γ -lactona e nucleófilos (como o grupo-SH), e que tal grupo é essencial para sobrevivência do *T.cruzi* contra o stress oxidativo (Uchiyama, 2009). Com base na literatura, o elatol (Brenzio *et al.*, 2000), uma LS constituinte de uma alga vermelha *L. dendroidea*, apresentou atividade significativa contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*. Os estudos revelaram que este composto não afetou a função das hemácias, alterando em particular, a via metabólica do *T.cruzi* (dos Santos *et al.*, 2010). Na verdade, a atividade terapêutica de elatol envolve a mitocôndria como o principal alvo, levando a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), e alterando a cadeia transportadora de elétrons, o que influencia negativamente na constituição da membrana celular e integridade do seu DNA resultando finalmente, na morte do parasita (Desoti *et al.*, 2012) (**Figura 2**).

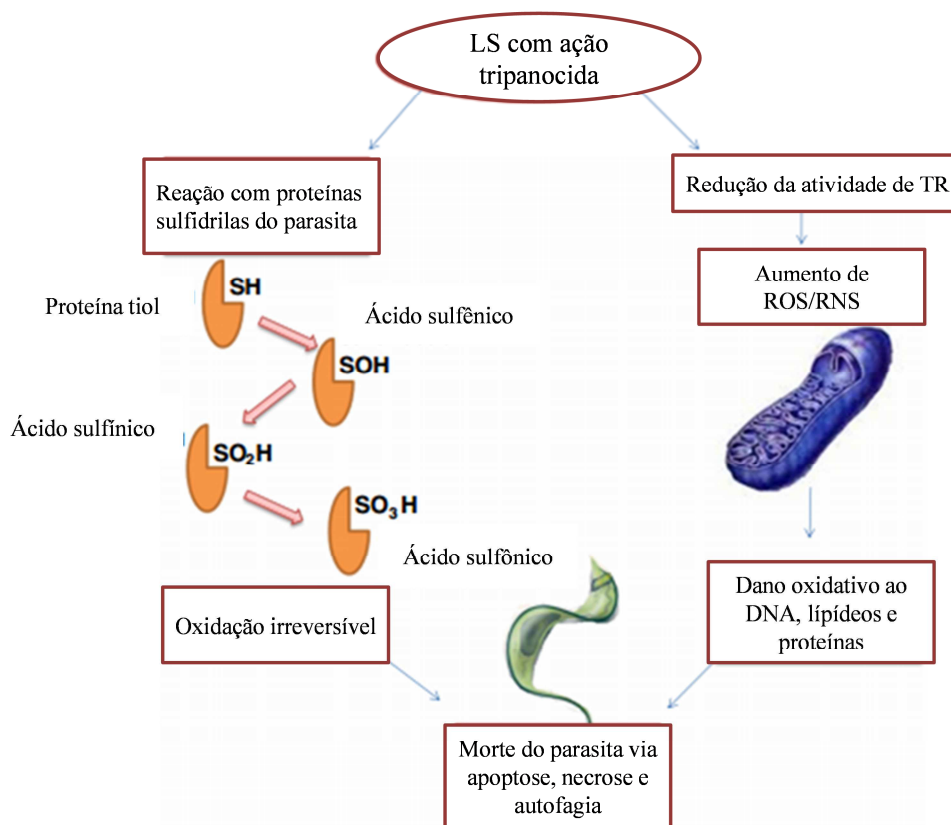


Figura 2: Mecanismo esquemático geral para ação anti-*Trypanosoma cruzi* de lactonas sesquiterpênicas (Saeidnia *et al.*, 2013).

LS= lactona sesquiterpênica, TR= Redução da atividade da tripanitiona (grupo-SH).

A presença de outros grupos funcionais tais como epóxido, hidroxila, cloridrina, e ésteres também podem contribuir para a ação biológica das lactonas sesquiterpênicas. No entanto, outros fatores como a lipofilicidade e a geometria molecular também podem influenciar a atividade das lactonas sesquiterpênicas (Schmidt, 1997) conhecidas por possuírem uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas.

Neste trabalho será dada ênfase, à eficácia terapêutica anti-*T. cruzi* da lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC), que através de resultados, obtidos por Branquinho, (2010), gerou o depósito de **uma patente** no INPI (número: **PI11063025**) também requerida no “World International Patent Office” sob o número PCTBR/2012/000399 passando a receber o nº WO/2013/05989 (Branquinho *et al.*, 2013). Empresas públicas nacionais, FARMANGUINHOS-FIOCRUZ-FAPEMIG manifestaram o interesse por sua potencial exploração futura.

A realização dos testes *in vivo*, para avaliação da eficácia terapêutica em modelo murino experimentalmente infectados por *T. cruzi*, aqui abordados, foi motivada pelos resultados *in vitro* obtidos por Oliveira *et al.* (1996). Neste estudo, a licnofolida, isolada de *L. trichocarpha* inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas sanguíneos na concentração de 150 µg/mL e a eremantolida C, também obtida de *L. trichocarpha* Spreng., lisou 100% dos tripomastigotas na concentração de 3600 µg/mL (Oliveira *et al.*, 1996; Saúde *et al.*, 1998). A licnofolida (LIC) (**Figura 3**) é uma LS

lipofílica, cujo $\log P = 5,03 \pm 0,07$ foi calculado pelo programa ACD/LABS. A LIC pertence à classe dos furanoelíngolidos, por apresentar um grupo furanona em sua estrutura química (Bohlmann & Jakupovic, 1990). Destacam-se suas atividades: anti-*T. cruzi in vitro* (Oliveira *et al.*, 1996; Grael *et al.*, 2005), anti-*T. cruzi in vivo* (Branquinho *et al.*, 2014 b), antibacteriana (Giesbrescht *et al.*, 1990; Saúde, 2002), antitumoral (Lee *et al.*, 1977; Saúde-Guimarães *et al.*, 2014), anti-inflamatória (Ren *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2013) citotóxica (Ren *et al.*, 2012), anti-hipercucêmica e antiartrite gotosa (de Souza *et al.*, 2012).

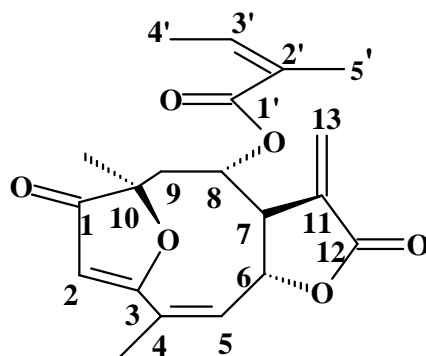


Figura 3: Estrutura química da licnofolida

Tais atividades, bem como seus efeitos tóxicos gerais, foram atribuídos à presença na molécula de três grupos funcionais alquilantes: α -metileno- γ -lactona, α , β -ciclopentenona e grupo éster (angelato). O principal grupo com ação anti-tripanicida se deve a presença do grupo α -metileno- γ -lactona (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986), que alquilam nucleófilos biológicos por adição tipo Michael (Santos, 1989, Picman, 1986).

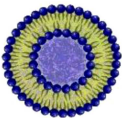
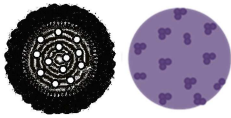
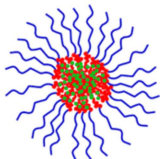
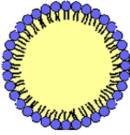


A LIC apresenta potencial anti-carcinogênico e segundo estudo realizado por Saúde *et al.* (1998) esta substância apresentou atividade antiproliferativa a 30 linhagens de células tumorais referentes a sete tipos de câncer, com valores de CI_{100} (concentração que inibe 100% do crescimento celular) entre 0,41 μ M e 2,82 μ M e valores de concentração letal 50 % (CL_{50}) para 30 linhagens de células tumorais humanas entre 0,72 e 10,00 μ M. Segundo Canalle *et al.* (2001) a LIC induziu citotoxicidade em cultura de linfócitos humanos na concentração acima de 0,2 μ g/mL e clastogenicidade nas células de medula óssea de camundongos *Swiss* tratados por via intraperitoneal na dose única de 26,67 mg/kg.

1.4 Nanocarreadores e suas aplicações biológicas

Nos últimos anos, alguns estudos têm demonstrado que uma abordagem eficaz para aperfeiçoar a ação farmacológica dos fármacos é associar a molécula ativa a um sistema de liberação nanoestruturado (Piñon-Segundo *et al.*, 2005) que pode controlar sua liberação e

direcionar sua ação no organismo. Os sistemas nanoestruturados apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000nm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural (Couvreur *et al.*, 2002). Esses nanocarreadores de fármacos são aplicáveis ao tratamento do câncer, doenças parasitárias, entre outras patologias (Mohanraj & Chen, 2006). São exemplos destes tipos de veículos as nanopartículas poliméricas, os dendrímeros, os lipossomas, as nanopartículas magnéticas, as contendo ácidos nucleicos e as nanopartículas virais (Kanwar *et al.*, 2011; Alexis *et al.*, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1:Diferentes tipos de nanocarreadores e aplicações (adaptado de Kanwar *et al.*,2011).

Tipo de carreador	Estrutura	Composição	Perspectivas e usos	Ref.
Lipossomas		Lipídeos anfifílicos, fosfolipídeos naturais e sintéticos	Alteram o perfil farmacocinético de fármacos encapsulados	Rawat <i>et al.</i> (2006)
Nanopartículas poliméricas		Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis	Eles permitem maior controle da liberação do fármaco encapsulado, alteram também a farmacocinética.	Rawat <i>et al.</i> (2008) Mahidhara <i>et al.</i> (2011)
Micelas poliméricas		Polímeros Anfifílicos	São formadas em meio hidrofóbico sendo adequadas para carrear fármacos insolúveis em água devido à composição do núcleo	Torchilin <i>et al.</i> (2003)
Nanopartícula Lipídica sólida		Lipídeos anfifílicos	Podem ser usadas como adjuvantes em vacinas e como agentes para transfecção não-viral	Cevc (2004)
Dendrímeros		Monômeros do tipo AB _n	Podem ser usados como agentes de revestimento e proteção para direcionamento de fármacos para vários sítios	Choi <i>et al.</i> (2005)
Nanopartículas funcionalizadas		Metais inorgânicos, anticorpos, ligantes específicos	São dirigidas para o sítio ativo através de vetorização ativa mediado por um ligante ou dispositivo que reconhece o alvo, ou libera o conteúdo no alvo	Schneider <i>et al.</i> , 2000

Os nanocarreadores representam uma abordagem promissora para obtenção de medicamentos com propriedades semelhantes ao que se considera “ideal” mediante a alteração de parâmetros farmacocinéticos melhorando o tempo de residência do princípio ativo no sangue e reduzindo as

doses empregadas na quimioterapia devido à melhoria da seletividade (Owens & Peppas, 2006). Os lipossomas e as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) são os sistemas nanoestruturados mais estudados (**Tabela 1**). As nanopartículas poliméricas apresentam algumas vantagens em relação aos lipossomas, como a maior estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento, além do controle da liberação do fármaco e a possibilidade de serem administrados por via oral (Barrat, 2000, Soppimath *et al.*, 2001; Schaffazick *et al.*, 2003).

Sistemas nanoparticulados, como lipossomas e nanopartículas poliméricas, têm sido bastante estudados contra infecções intracelulares, pois estes sistemas são capazes de se acumular em tecidos (como o fígado e baço), em células tais como os macrófagos e células de Kupffer e em organelas como os lisossomos e fagolisossomos, locais preferenciais de vários parasitas intracelulares (Couvreur *et al.*, 1991; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Além disso, esses nanossistemas são capazes de liberar o fármaco de forma seletiva em sítios de ação específicos, permitindo algumas vezes a otimização da velocidade de sua liberação, e por consequência, aumentando a biodisponibilidade oral e a solubilização de alguns fármacos para administração parenteral (Rao *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, considerável atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de nanocarreadores como sistema de liberação controlada para encapsulamento de substâncias de origem natural. Idealmente, os nanocarreadores devem preencher dois pré-requisitos. Em primeiro lugar, ele deve liberar a droga com velocidade controlada ao longo do período de tratamento. Em segundo lugar, devem direcionar a substância ativa para o local da ação desejado (seletividade). As formas de dosagem convencionais, incluindo as formas de liberação prolongada são incapazes de satisfazer tais pré-requisitos simultaneamente (Saraf, 2010).

As pesquisas no desenvolvimento de nanocarreadores (ex.: nanopartículas poliméricas, lipossomas, fitossomas, nanoemulsão, dentre outros), contendo ativos isolados de plantas são bastante vantajosos, incluindo aumento da solubilidade, aumento da biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, aumento da atividade farmacológica, melhoria da estabilidade em meios biológicos, liberação sustentada, proteção física e redução da degradação química, entre outras (Saraf, 2010). Assim, a utilização da nanotecnologia para melhoria do perfil de atividade biológica de bioativos de origem natural representa um grande potencial para se aumentar a eficácia terapêutica.

1.4.1 Abordagens nanotecnológicas contra *Trypanosoma cruzi*

Não são raros os casos onde substâncias com potente ação citotóxica são também ativas contra parasitos como o *T. cruzi*, como revisado por Romero & Morilla (2010), provavelmente devido à redução da capacidade de multiplicação do parasito, similarmente ao que ocorre nas células tumorais. Entretanto, certas desvantagens devem ser contornadas antes do uso desta classe de compostos: as baixas concentrações extraídas das fontes naturais. Devido à alta lipofilia a

biodisponibilidade delas é frequentemente baixa, perfis toxicológicos desfavoráveis e a existência de interações não-específicas com grupamentos tióis de enzimas e proteínas vitais (Ghantous *et al.*, 2010).

Deste modo, é importante a associação da licnofolida com sistemas carreadores de fármacos, tecnologicamente delineados para melhorar a sua biodisponibilidade e reduzir as eventuais inativações e reações inespecíficas durante o trajeto até ao alvo biológico.

Na DCh, a utilização de vetores, especialmente nanométricos, vem sendo aos poucos utilizada (Romero & Morilla, 2010) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Fármacos anti-tripanicida associados a sistemas vetorizados testados *in vitro* ou *in vivo*.

Vetor	Fármaco	Resultados	Referência
Lipossomas de fosfatidilcolina		Atividade <i>in vitro</i> contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Tulahuen de <i>T. cruzi</i>	Yoshihara <i>et al.</i> , 1987
Nanoesferas	Alopurinol	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas e amastigota superior à droga livre	González-Martín <i>et al.</i> , 2000
Nanoesfera de PLA-PEG	D0870	Cura de 60%-90% dos animais infectados com as cepas CL e Y com o D0870 na dose de 3mg/kg durante 30 dias consecutivos	Molina <i>et al.</i> , 2001
Nanoesferas de PLA-PEG	Cetoconazol e itraconazol	Não produziu cura parasitológica em animais infectados com cepa Y	Romero & Morilla, 2010
Nanoesferas poli-alquil-cianoacrilato	Nifurtimox	Atividade anti- <i>T. cruzi in vitro</i> superior ao fármaco livre (IC ₅₀ contra formas tripomastigotas e amastigotas 20 e 13 vezes menor que a do fármaco livre, respectivamente)	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
Formulações lipídicas	Anfotericina B	Atividade anti- <i>T. cruzi in vitro</i> contra tripomastigotas e amastigotas	Yardley <i>et al.</i> , 1999
Lipossomas	Benzonidazol	Aumento da captação dos lipossomas pelo fígado. Eficácia anti- <i>T. cruzi in vivo</i> inferior ao fármaco livre.	Morilla <i>et al.</i> , 2004

Dentro dos sistemas nanoparticulados, destacam-se as nanocápsulas utilizadas neste trabalho. Elas apresentam vantagens em relação a outros nanocarreadores que são a elevada eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos onde se emprega uma pequena quantidade de

polímeros biodegradáveis de baixa toxicidade e facilmente eliminados do organismo (Legrand *et al.*, 1999; Barrat, 2000; Couvreur *et al.*, 2002). Outras vantagens das nanocápsulas são o aumento da dispersibilidade de drogas pouco solúveis em água (Deda *et al.*, 2009), a proteção contra a inativação de drogas no trato gastrointestinal (Schaffazick *et al.*, 2003), redução da cardiotoxicidade (Leite *et al.*, 2007) e prolongamento na circulação sanguínea de fármacos administrados por via intravenosa (Mosqueira *et al.*, 2001 a).

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

Em nosso estudo, desenvolveu-se nanocápsulas poliméricas (NC) para encapsular, a LIC, obtida da espécie *L. trichocarpha*, com intuito de melhorar a sua dispersibilidade em meios aquosos e melhorar a absorção e o perfil farmacocinético.

1.4.2 Justificativa do emprego dos nanocarreadores (nanocápsulas) no encapsulamento da licnofolida para aplicação no tratamento da doença de Chagas

O principal desafio da farmacoterapia na DCh é atingir os parasitas intracelulares devido às barreiras físicas que dificultam o acesso do fármaco ao tecido na concentração necessária para atingir o efeito terapêutico desejado (Romero & Morilla, 2010). Na infecção pelo *T. cruzi* a membrana plasmática e o complexo microambiente das células hospedeiras dificultam a entrega maciça e seletiva de quimioterápicos para as formas amastigotas intracelulares (Prokop & Davidson, 2008). Devido à natureza disseminada da doença (parasitas de *T. cruzi* são distribuídos em membranas mucosas, musculatura cardíaca, esquelética e lisa, células gliais e outros locais). O fármaco anti-*T. cruzi* ideal deve exibir um volume de distribuição elevado (Vd) atingindo tecidos com menor fluxo sanguíneo e apresentar um longo tempo de meia-vida plasmático; deverá ser eficaz durante a fase aguda e crônica, inclusive durante a forma indeterminada da doença (Coura & Castro, 2002). BZ e NF possuem um volume de distribuição elevado, mas apresentam baixa permeabilidade nos alvos intracelulares, mesmo em altas concentrações plasmáticas, o que está também relacionado à toxicidade por eles apresentada.

Os nanocarreadores de liberação controlada têm por sua vez a capacidade de penetrar nas células alvo por mecanismos endocíticos diversos. Estas características lhes conferem a capacidade

de superar barreiras intracelulares e entregar fármacos anti-*T.cruzi* no interior da célula. O delineamento efetivo de nanocarreadores de fármacos anti-*T.cruzi* contra diferentes formas de *T.cruzi* deve considerar os diferentes mecanismos de internalização das células hospedeiras (Souza *et al.*, 2009). Além disso, durante a fase crônica da infecção, os pacientes possuem, em sua maioria, formas amastigotas residentes em tecidos muito profundos e de difícil acesso possuindo mecanismos limitados de “uptake”. As nanocápsulas podem atuar como um “cavalo de tróia” carregando uma quantidade maior de fármaco para um alvo mais específico, conforme representado no esquema da **Figura 4**.

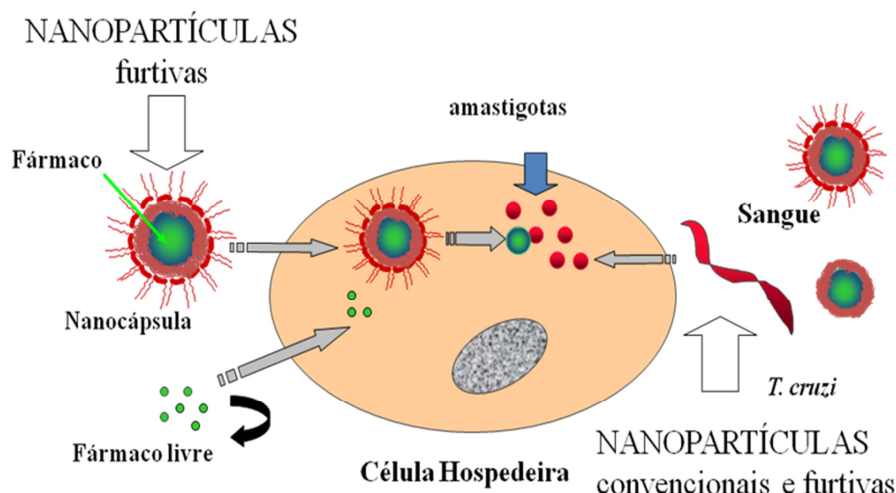


Figura 4: Representação esquemática da estratégia terapêutica de emprego da nanocápsulas para carreamento de fármacos anti-*T. cruzi*. O fármaco livre possui baixa permeabilidade celular devido às suas propriedades físico-químicas; na forma nanoencapsulada o fármaco penetra na célula hospedeira por outras vias de forma a atingir as formas amastigotas do parasita; no sangue os nanocarreadores podem liberar de modo controlado o fármaco que alcança as formas tripomastigotas sanguíneas diretamente. Tudo isto pode ser alcançado com o uso de nanocápsulas furtivas que permanecem por tempo prolongado na circulação sanguínea.

Em uma revisão realizada por Romero & Morilla (2010) e outra mais recente Espuelas *et al.*, (2012) foi feita uma abordagem detalhada sobre a atividade anti-*T.cruzi* de fármacos e/ou substâncias em sistemas nanoestruturados de liberação controlada, que descreve o provável aumento da acessibilidade do fármaco a alvos intracelulares, melhoria da seletividade e a liberação do princípio ativo em alvos intracelulares específicos promovido pelo uso de nanocarreadores.

O acesso dos nanocarreadores irá depender das diferentes fases do ciclo evolutivo do *T.cruzi*:

1) Na fase aguda da DCh, caracterizada por parasitemia patente, a ação dos nanossistemas ocorre de forma direta sobre as formas tripomastigotas sanguíneas, ou seja, devem ser mantidas por mais tempo na corrente sanguínea.

2) Ainda na fase aguda, quando as formas amastigotas encontram-se no interior das células do sistema mononuclear fagocitário (SFM) a acessibilidade dos fármacos em sistemas nanoestruturados também ocorre de forma direta. Assim, nanopartículas contendo fármacos *anti-T. cruzi* são promissoras em atingir estas células infectadas, uma vez que podem penetrar por mecanismos endocitóticos (Rao *et al.*, 2004).

3) Na fase aguda e fase crônica (incluindo a forma indeterminada da fase crônica) quando as formas amastigotas encontram-se em células não-fagocíticas, em locais de vascularização não íntegra (tecidos inflamados) ocorre acessibilidade indireta dos nanocarreadores. Sabe-se que a permeabilidade vascular aumenta durante o processo inflamatório. Nessas situações, as *gap junctions* das células endoteliais estão suficientemente espaçadas para possibilitar o extravasamento de partículas coloidais na faixa de 0,2 μm , fazendo das nanopartículas promissores carreadores de fármacos para o sítio da inflamação (Pereira *et al.*, 2009). Os autores mencionam que devido ao seu tamanho reduzido, os nanocarreadores < 200 nm têm acesso a focos inflamatórios.

4) Na fase crônica, quando as formas amastigotas intracelulares encontram-se localizados em células não-fagocíticas e em tecidos cuja vascularização esteja íntegra, ou seja tecidos não inflamados, a acessibilidade é indireta, e a possibilidade dos nanocarreadores atingir os parasitas intracelulares torna-se mais complexa, pois o fármaco precisa ser liberado em locais próximos para depois difundir para o tecido infectado.

1.4.3 Nanocápsulas

As nanocápsulas (NC) são constituídas de um núcleo, geralmente oleoso, e uma camada externa polimérica com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos em sua interface (Fessi *et al.*, 1989) (**Figura 5**). O principal fator para a escolha do óleo é a solubilidade do fármaco a ser encapsulado no núcleo oleoso. Em geral, fármacos que possuem um valor de coeficiente de partição ($\log P_{oc/a}$) elevado são potenciais substâncias a serem associadas às NC e podem ser administradas por diferentes vias com obtenção de liberação controlada (Mosqueira *et al.*, 2006), como é o caso da LIC, estudada neste trabalho. A nanoencapsulação tornou-se uma estratégia adequada para aumentar a dispersão em escala nanométrica deste composto lipofílico em meio aquoso e biológico (Deda *et al.*, 2009).

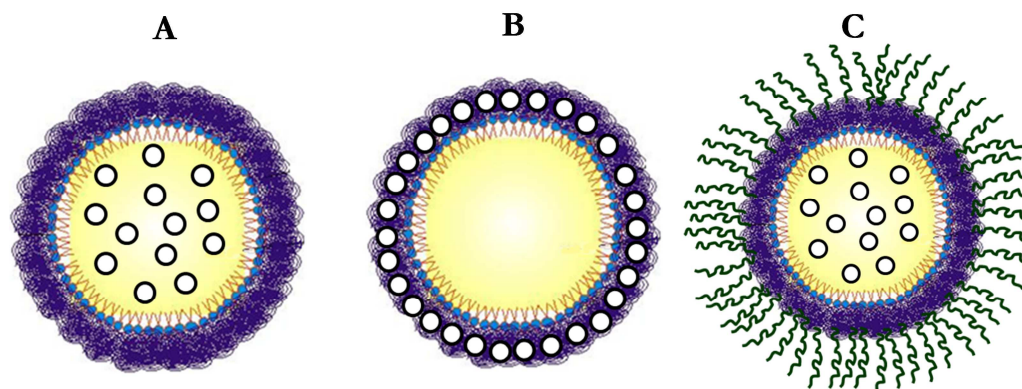


Figura 5: Representação esquemática de diferentes tipos de nanocápsulas: A) Nanocápsula convencional com fármaco dissolvido no núcleo oleoso. B) Fármaco adsorvido à parede polimérica. C) Nanocápsula estabilizada estericamente por cadeias poliméricas hidrofílicas que reduzem o reconhecimento pelo sistema imune (furtivas).

Existem diversos métodos de preparo de nanopartículas descritos na literatura e, dependendo das características físico-químicas do fármaco e do polímero, é possível escolher o melhor método de preparação e o melhor polímero para obter uma encapsulação eficiente do fármaco (Vauthier & Bouchemal, 2009). Os métodos mais comuns são emulsificação e evaporação do solvente, polimerização interfacial do monômero, nanoprecipitação e *salting-out* (Vauthier & Bouchemal, 2009).

A nanoprecipitação, também conhecida como deposição de um polímero pré-formado seguida de evaporação do solvente, é uma técnica simples, reprodutível e facilmente transponível para a produção de nanopartículas em grande escala (Couvreur *et al.*, 2002, Fessi *et al.*, 1989; Legrand *et al.*, 1999, Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Este método consiste basicamente em verter uma solução contendo o fármaco, polímero, óleo e tensoativo hidrofílico dissolvidos num solvente orgânico miscível em água, numa fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico como estabilizante. Imediatamente após a injeção, o solvente orgânico difunde-se na água, dando origem a uma dispersão coloidal de NC. Após a formação das partículas, as suspensões são submetidas à evaporação para remoção do solvente orgânico e concentração até o volume desejado (Fessi *et al.*, 1989).

Após o preparo, o estudo de caracterização das NC é uma importante etapa em seu desenvolvimento, uma vez que as características do polímero como hidrofobia, carga superficial e perfil de biodegradação das substâncias adjuvantes, assim como as características do fármaco associado, tais como seu peso molecular, sua carga e localização nas nanopartículas, seja por adsorção ou incorporação, têm grande influência nos processos de absorção, biodistribuição e eliminação do fármaco veiculado ao nanocarreador (Reis *et al.*, 2006). Os principais fatores que

devem ser avaliados são o tamanho, a carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação do fármaco encapsulado (Hans & Lowman, 2002).

Atualmente, o uso de polímeros para a liberação controlada de agentes terapêuticos já é bem estabelecido (Birnbaum *et al.*, 2000). Os polímeros sintéticos mais utilizados devido a sua completa degradabilidade em meio biológico são os poliésteres alifáticos, como o ácido poliglicólico (PGA), o ácido polilático (PLA), o ácido poli-(*D,L*-lático-co-glicólico) (PLGA) e o poli- ϵ -caprolactona (PCL), PLA-PEG (Sinha *et al.*, 2004).

A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um polímero sintético, hidrofóbico, semicristalino, com baixo ponto de fusão (59-64 °C), temperatura de transição de fase em torno de 60 °C e com excepcional capacidade de se combinar com outras substâncias (Chang *et al.*, 1986). PCL é degradado pela hidrólise das ligações éster em condições fisiológicas e por isso surgiu interesse para sua utilização em sistemas de liberação de fármacos (Kumari *et al.*, 2009; Woodruff & Hutmacher, 2010). A degradação da PCL no organismo humano é lenta se comparada a outros polímeros devido à falta de enzimas apropriadas, o que não significa que este polímero não seja biodegradável (Woodruff & Hutmacher, 2010), pois a degradação acontece em dois estágios: inicialmente, uma degradação hidrolítica não enzimática das ligações éster e posteriormente, quando a PCL já apresenta menor massa molecular, ou seja, uma degradação intracelular. Essa hipótese foi reforçada pela detecção de fragmentos de PCL em fagossomos de macrófagos (Wooward *et al.*, 1985; Woodruff & Hutmacher, 2010).

Poliésteres alifáticos apresentam boa aplicabilidade, entretanto, a rápida captação dessas nanopartículas convencionais, sem modificação de superfície, pelo SFM após a administração intravenosa (i.v.) representa um grande dificuldade no direcionamento efetivo do fármaco para locais específicos do organismo, além do fígado e baço (Moghimi *et al.*, 2001) onde eles vão se localizar após serem fagocitados. Para ser mantida na circulação, a superfície hidrofóbica deve ser modificada a fim de retardar a fagocitose (Avgoustakis *et al.*, 2003; Breunig & Goepferich, 2008; Esmaeili *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2009). Para aumentar o tempo de circulação, as NC podem ser revestidas com moléculas que forneçam uma camada hidrofílica de proteção tais como, polietilenoglicol (PEG) utilizado na constituição das NC furtivas. Trata-se de polímeros hidrofílicos, não-iônicos que apresentam excelente biocompatibilidade. Esse revestimento fornece uma nuvem dinâmica de cadeias hidrofílicas solvatadas e neutras na superfície das NC, que repelem as proteínas plasmáticas (Storm *et al.*, 1995; Tobio *et al.*, 2000; Kumari *et al.*, 2009) evitando o reconhecimento e captura pelas células fagocitárias do sistema imune (Mosqueira *et al.*, 2001 b).

As NC podem ser administradas por via parenteral e também por via oral. Muitos fármacos não são adequados para administração oral devido à baixa solubilidade em meio aquoso, estabilidade química, e/ou biodisponibilidade. O encapsulamento de fármacos em nanopartículas

pode resultar em redução destas limitações, permitindo a liberação orientada e sustentada no TGI e protegendo o fármaco de inativações em meio biológico adverso.

Diante destas possíveis vantagens, os sistemas nanoestruturados podem aumentar a eficácia no tratamento de doenças parasitárias (parasitos intracelulares como o *T. cruzi*), particularmente no caso da doença de Chagas, por possibilitarem a redução da frequência de sua administração, a redução da toxicidade geral e a melhora do perfil farmacocinético de fármacos (Santos-Magalhães & Mosqueira, 2010; Vauthier & Couvreur, 2007; Devalapally *et al.*, 2007), oferecendo várias vantagens para a qualidade de vida dos pacientes e, principalmente, aumentando sua adesão ao tratamento (Romero & Morilla, 2010).

A administração oral é a forma mais utilizada e prontamente desejável para administração de fármacos devido à conveniência e facilidade para o paciente, especialmente quando se utiliza o tratamento de doenças crônicas com esquema terapêutico prolongado (Gamboa & Leong, 2013). Administração oral de fármacos é particularmente atraente ou até mesmo essencial quando o acesso ao sistema de saúde é precário e/ou limitado (Gamboa & Leong, 2013) o que acontece frequentemente em países em desenvolvimento. Embora haja muitos benefícios relativos à administração oral, a formulação de um sistema de liberação controlada oral é difícil devido às condições extremas do trato gastrointestinal (TGI) que incluem a acidez do meio, enzimas, a camada de muco, e as junções do epitélio. Um dos principais obstáculos é o ambiente variável ácido-base do TGI, que inclui o estômago e os intestinos (Gamboa & Leong, 2013). No entanto, muitos fármacos de baixo peso molecular são absorvidos com êxito por via oral, devido à elevada capacidade de absorção do epitélio intestinal humano, pois é composto de vilosidades que aumentam a área da superfície total de absorção para 300-400m² (Schenk & Mueller, 2008). Entretanto, muitos fármacos não são adequados para administração oral devido à fraca solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade.

Após administração oral, a primeira barreira encontrada pelos nanocarreadores é o lúmen do TGI. De fato, a literatura descreve que esses sistemas podem se desestabilizar ou degradar em ambientes apresentando extremos de pH, elevada força iônica ou alto conteúdo de enzimas e proteínas (Prego *et al.*, 2006). Portanto, a nanoestrutura desenvolvida deve ser resistente e estável nessas condições (Francis *et al.*, 2004). Diante disso, a estabilidade desses sistemas de liberação vem sendo amplamente estudada e, em alguns casos, modificações nas formulações têm sido propostas (Tobío *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; Ramachandran *et al.*, 2009). O encapsulamento de fármacos em nanopartículas pode permitir a liberação orientada e sustentada no TGI (Ensign *et al.*, 2012) As vantagens da utilização de nanopartículas incluem: proteção do fármaco a partir de enzimas de degradação, aumento da mucoadesão, e de sua retenção no TGI (Plapied *et al.*, 2011;

Ensign *et al.*, 2012). No caso específico de lactonas sesquiterpênicas o encapsulamento pode proteger a molécula de degradação química em pH elevado (Leclerq *et al.*, 1988).

Diferentes mecanismos são utilizados para o transporte dos nanocarreadores através da barreira intestinal (**Figura 6**). Uma rota possível para a penetração dos nanosistemas é o transporte passivo transcelular, o qual inclui a difusão através das células intestinais (Couvreur *et al.*, 1995; Ensign *et al.*, 2012). Nessa via, a razão de absorção é governada pela lei de Fick, a qual depende, dentre outros fatores, das propriedades físico-químicas do soluto e do gradiente de concentração através das células (Roger *et al.*, 2010). Tal transporte constitui a rota preferencial para substâncias suficientemente lipofílicas e de moderado peso molecular. Dessa forma, em teoria, estruturas supramoleculares como os nanocarreadores não poderiam difundir-se de forma satisfatória (Francis *et al.*, 2004). Frente ao exposto, o transporte ativo através das células parece ser mais adequado para a absorção de nanoestruturas. A esse respeito, deve-se considerar o transporte mediado por células M, bem como pelos enterócitos (Roger *et al.*, 2010; Plapied *et al.*, 2011). As células M são células especializadas da mucosa associada ao tecido linfóide, podendo formar estruturas distintas, tais como as placas de Peyer e são caracterizadas por sua habilidade em transportar antígenos do lúmen intestinal para as células do sistema imune. Assim, devido às suas propriedades absorptivas, a captação de sistemas nanoestruturados por essas células é amplamente descrita na literatura (des Rieux *et al.*, 2006; Damge *et al.*, 2008). De maneira semelhante, o mecanismo de captação dos nanosistemas via enterócitos vem sendo amplamente estudado (des Rieux *et al.*, 2006). Tal captação pode ser alcançada, sobretudo, pelo processo de pinocitose (macropinocitose ou endocitose). A esse respeito, alguns autores atribuem que a pinocitose envolvendo a ligação das nanoestruturas com receptores específicos, pode constituir uma excelente estratégia para o aumento da absorção das mesmas (Adler & Leong, 2010, Plapied *et al.*, 2011).

Por outro lado, no transporte passivo paracelular, há a passagem das partículas através dos espaços intercelulares. Dessa forma, existe uma limitação para a absorção de nanosistemas por essa via, uma vez que o diâmetro dos poros nesses espaços é da ordem de 3 a 10 Å (Roger *et al.*, 2010) e esses representam menos de 1% da área absorptiva total do intestino (Plapied *et al.*, 2011). Todavia, é importante considerar a presença das junções oclusivas (ou *tight junctions*), as quais constituem uma barreira contra a passagem de substâncias indesejadas pelos poros, entre células justapostas (Gonçalves *et al.*, 2009).

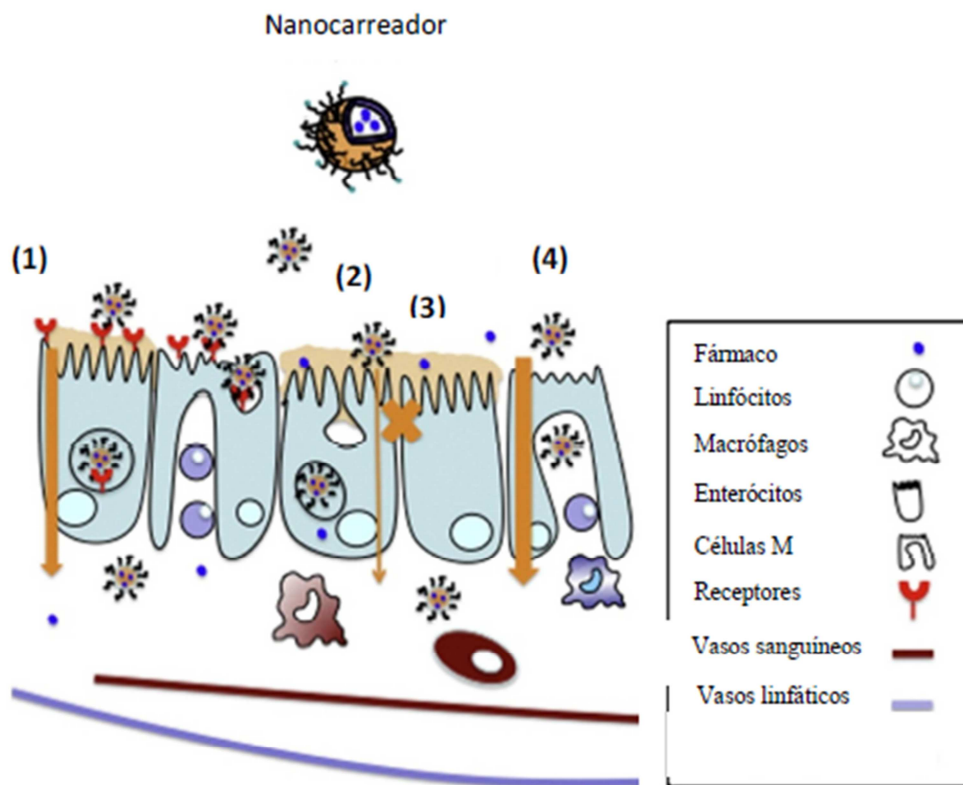


Figura 6: Representação esquemática de possíveis rotas para a captação de nanossistemas. (1) pinocitose (endocitose) via receptor, (2) transporte transcelular, (3) transporte paracelular, (4) captação via células M. A largura das setas representa a contribuição de cada processo para a absorção dos nanocarreadores (Adaptado de Papiéd *et al.*, 2011).

Tem sido alcançado um aumento no desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas orais utilizando de nanopartículas com revestimentos de superfície dentre elas o PEG (Tobío *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2009). O PEG foi usado pela primeira vez para aumentar a estabilidade de partículas, mas por torná-la também mais hidrofílica ele é capaz de modular suas propriedades bioadesivas (Lai *et al.*, 2009). Um grupo de pesquisadores observou que nanopartículas de PLA-PEG com tamanho aproximado de 160 nm conferiram uma proteção adicional contra a agregação induzida por enzimas do fluido digestivo e a degradação em fluidos do TGI simulados *in vitro* em relação à nanopartícula de PLA (Tobío *et al.*, 2000). Após gavagem, as amostras de sangue e linfa foram retiradas e foi encontrado 3-4 vezes mais radioatividade no sangue em todos os tempo mensurados no caso de partículas de PLA-PEG NC. Os autores atribuíram esse efeito a proteção contra ação enzimática e aumento da captação de partículas de PLA-PEG NC através do epitélio intestinal.

Diante deste contexto, um novo fármaco associado à uma nova forma de administração e de liberação para o organismo que aumente a seletividade para os tecidos e células alvo (células infectadas com o *T. cruzi*) deve ser o objetivo principal de novas abordagens terapêuticas (Castro *et al.*, 2006) no tratamento da doença de Chagas. Sendo assim, o uso de carreadores de fármacos

nanométricos destinados ao aumento da seletividade para as células do hospedeiro infectadas pelo *T. cruzi* representa uma alternativa a ser considerada.

Em nosso estudo, desenvolveu-se nanocápsulas poliméricas (NC) para encapsular, a LIC, obtida da espécie *L. trichocarpha*, com intuito de melhorar a sua dispersibilidade em meios aquosos e melhorar o perfil farmacocinético e a eficácia terapêutica em modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*.

2.0 Justificativa geral do trabalho

Tendo em vista as dificuldades e complexidade encontradas no tratamento da doença de Chagas, a baixa eficácia terapêutica dos fármacos existentes em parasitos de multiplicação intracelular, a toxicidade dos fármacos ativos existentes contra o *T.cruzi*, a constatação da ação benéfica do tratamento na evolução clínica da doença, mesmo em pacientes tratados não curados, a procura de novas alternativas terapêuticas **se justifica** neste trabalho que propõe a utilização da lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC), com ação sobre as formas tripomastigotas sanguíneas já demonstrada *in vitro* (Oliveira *et al.*1996), agora carregada através de vetores nanométricos (nanocápsulas-NC) com diferentes polímeros (PCL e PLA-PEG) e avaliar os perfis farmacocinéticos das diferentes formulações. O projeto **se justifica ainda** no uso de nanocápsulas por diferentes vias e esquemas de tratamento, com o propósito de aumentar o índice terapêutico da substância licnofolida e proteger a molécula biologicamente ativa contra degradação. Os estudos usarão como comparação o tratamento obtido com um fármaco de referência (benzonidazol) durante as fases aguda e crônica da infecção em modelo murino.

3.0 Objetivo Geral

Avaliar o perfil farmacocinético da lactona sesquiterpênica, licnofolida, a partir de formulações de nanocápsulas e também determinar a eficácia terapêutica em modelo murino experimentalmente infectado pelo *T. cruzi*.

3.1 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar nanocápsulas (NC) de poli-ε-caprolactona (PCL) e de PLA-PEG contendo licnofolida.
- Avaliar as características físico-química das formulações de nanocápsulas contendo a lactona sesquiterpênica licnofolida.
- Avaliar a farmacocinética da licnofolida livre e nas formulações nanoencapsuladas em animais saudáveis após administração intravenosa.
- Avaliar a eficácia *in vivo* das formulações de nanocápsulas de licnofolida em modelo murino experimentalmente infectado com cepas de *T. cruzi* com diferentes perfis de susceptibilidade/resistência ao tratamento, comparada ao benzonidazol administrado pelas vias endovenosa e oral, nas fases aguda e crônica da infecção.

4.0 Metodologias

Parte I: Obtenção da licnofolida, preparação de nanocápsulas e caracterização físico-química das nanocápsulas com licnofolida.

4.1 Metodologia de obtenção das formulações de nanocápsulas

A coleta da *Lychnophora trichocarpha*, isolamento e caracterização da licnofolida estão descritos em Saúde *et al.*(1998), Ferrari *et al.*(2012), Branquinho *et al.*(2014 a), Saúde-Guimarães *et al.*(2014) e no depósito da **patente** no **INPI (número: PI11063025)** e também requerida no “World International Patent Office” sob o número PCTBR/2012/000399 patente nº WO/2013/05989 (Branquinho *et al.*,2013).

A LS (LIC) isolada e purificada de *L.trichocarpha* foi utilizada nos ensaios *in vivo* em 2 formulações nanoestruturadas: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC. Para preparação das NC, suspensões e soluções utilizadas na experimentação *in vivo* foram utilizadas as seguintes substâncias: PCL (poli- ϵ -caprolactona, Mn 42.500 g/mol) e Poloxamer 188 (surfactante não iônico) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. PLA-PEG [(poli (*D,L-láctico*)-co-polietilenoglicol, Mn 49.000 g/mol] com PEG de Mn 5.000 g/mol foi obtido da Alkermes (Cambridge, USA) utilizado sem purificação, PLA [poli (*D,L-láctico*)] Resomer 203[®] R 203H PM 18.000 g/mol foi comprado da Boehringer Ingerlheim, (Alemanha). Epikuron170[®] (fosfatidilcolina de soja, \approx 70% fosfatidilcolina) foi fornecido de Lucas Meyer (Le Blanc Mesnil, França), Miglyol 810N (triglicerídeos de cadeia média) foi adquirido de Hulls, (Alemanha). Todas as outras substâncias utilizadas: acetona dimetilacetamida (DMA), glicose, polietilenoglicol 300 (PEG 300) todos de grau analítico foram obtidas da Sigma-Aldrich (Brasil). A água utilizada Milli-Q foi purificada no aparelho Symplicity[®] System 185 (Millipore, EUA).

4.1.1 Preparações das nanocápsulas

As NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (Fessi *et al.*, 1989). As NC poli- ϵ -caprolactona (PCL), desenvolvidas por Branquinho (2010) e Branquinho *et al.*, (2013 e 2014 a) e as NC de PLA-PEG, foram descritas por Branquinho *et al.* (2014 b) e Mosqueira *et al.* (2001 a). A formulação de NC convencional (PCL NC) foi preparada com 0,8% p/v de polímero (PCL) dissolvido em solução de acetona contendo 0,4% p/v de Epikuron 170[®], 2,5% v/v de Miglyol 810N e LIC. A fase orgânica foi transferida para o interior da fase aquosa contendo 0,75% p/v de Poloxamer 188 e a mistura mantida em agitação. Todos os solventes foram evaporados sob pressão reduzida (Laborota 4000 Heidolph Instruments, Alemanha) até obtenção das dispersões de NC. A formulação de NC furtiva (PLA-PEG NC) foi preparadas com

1,2% p/v dos polímeros PLA-PEG e Resomer 203[®] (misturados na proporção 1:1). Os polímeros foram dissolvidos em acetona contendo 0,4% p/v de Epikuron, 2,5% v/v de Miglyol 810N e LIC. Esta fase orgânica foi transferida para o interior da fase aquosa e mantidas sob agitação 5000 rpm por 10 minutos. Todos os solventes foram evaporados sob pressão reduzida até obtenção da dispersão de NC. NC brancas foram preparadas conforme metodologia acima. (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Composição de nanocápsulas de PCL (poli- ϵ -caprolactona)

Componentes de NC PCL	*LIC-PCL NC 2,3,4	#NC-Br
Fase orgânica		
Polímero PCL	0,8% p/v	0,8% p/v
Epikuron 170 [®]	0,4% p/v	0,4% p/v
Migliol 810 N	2,5% v/v	2,5% v/v
Acetona	10 mL	10 mL
LIC	20, 30,40 mg	-
Fase aquosa		
Poloxamer 188	0,75% p/v	0,75% p/v
Água milli-Q	20 mL	20 mL

*NC PCL-LIC 2,3,4: nanocápsula de PCL contendo 2,0 mg/mL, 3,0 mg/mL e 4,0 mg/mL da licnofolida respectivamente. #NC-Br: nanocápsula branca.

Tabela 4: Composição de nanocápsulas de PLA-PEG

Componentes de NCPLA-PEG	*LIC-PLA-PEG NC 2,3,4	#NC-Br
Fase orgânica		
Polímero PLA-PEG	0,6% p/v	0,6% p/v
PLA (Resomer [®])	0,6% p/v	0,6% p/v
Epikuron 170 [®]	0,4% p/v	0,4% p/v
Migliol 810 N	2,5% v/v	2,5% v/v
Acetona	10 mL	10 mL
LIC	20, 30,40 mg	-
Fase aquosa		
Água milli-Q	20 mL	20 mL

NC PLA-PEG-LIC 2,3,4: nanocápsula de PLA-PEG contendo 2,0 mg/mL, 3,0 mg/mL e 4,0 mg/mL da licnofolida respectivamente. #NC-Br: nanocápsula branca

4.2 Caracterização Físico-Químicas das nanocápsulas

4.2.1 Determinação do diâmetro e índice de polidispersão

O diâmetro médio efetivo das partículas e sua dispersão foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, a um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 90°, na temperatura de 20°C em meio aquoso. Esta técnica fornece o diâmetro médio das nanoestruturas e o índice de polidispersão (IP) da população analisada.

O IP é utilizado para determinar a distribuição de tamanho das partículas nas amostras. Formulações de nanopartículas com valores de IP menores ou iguais a 0,3 apresentam-se monodispersas, ou seja, representam uma única população de nanopartículas com distribuição de tamanho gaussiana (Scholes *et al.*, 1993).

A análise do tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (IP) foram definidos utilizando o equipamento Nanosizer N5 Plus Beckman Coulter, (Fullerton, EUA) ambos os métodos determinados por espectroscopia de correlação de fótons (ECF). Para determinação do tamanho médio das partículas e I.P as amostras foram analisadas após diluição 1:2000 em água MilliQ. As medidas de tamanho foram realizadas em triplicata em alíquotas da mesma amostra e os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

O IP calculado pelo equipamento reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas. Amostras que apresentaram IP inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas. A equação abaixo é utilizada para o cálculo do I.P de tamanho de uma amostra, segundo a literatura (Zili *et al.*, 2005). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados expressos como a média \pm desvio padrão.

$$\text{Polidispersão} = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)}$$

no qual,

$D(0.9)$ = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 90%

$D(0.5)$ = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 50%

$D(0.1)$ = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 10%

4.2.2 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta foi determinado pela técnica de microeletroforese associada à anemometria de laser dopler (ALD) utilizando-se um equipamento Zetasizer HS3000 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram analisadas após diluição 1:1000 em 1mM de NaCL, obtendo-se, assim,

dispersões coloidais com forças iônicas semelhantes ($120 \pm 30 \mu\text{S}/\text{cm}^2$). As medidas de potencial zeta foram realizadas em triplicata em alíquotas de amostras diferentes e os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

O potencial zeta (ζ) reflete o potencial elétrico existente na superfície das partículas e pode ser influenciado pela carga dos diferentes componentes dessas estruturas, localizados na interface com o meio dispersante, e pela adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão (Legrand *et al.*, 1999).

4.2.3 Porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação

A determinação do teor de fármaco contido em nanopartículas é essencial para a verificação da eficiência do sistema em carrear o fármaco. A técnica de separação mais utilizada para NC é a ultrafiltração/centrifugação (Losa *et al.*, 1993; Guterres *et al.*, 1995; Schaffazick *et al.*, 2003). Esta técnica emprega uma membrana de ultrafiltração (10-100kDa) que retém as nanopartículas em um compartimento superior do dispositivo. No filtrado é dosado o fármaco não associado intimamente às nanoestruturas. A fração de fármaco associada às nanopartículas é calculada pela subtração das concentrações total e livre (Schaffazick *et al.*, 2003).

As análises foram feitas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no aparelho Waters Alliance 2695 acoplado a um detector ultravioleta (UV) Waters E2695, por um método de doseamento validado por Branquinho *et al.* (2014 a) com adaptações. A porcentagem de encapsulação objetiva determinar o teor de fármaco incorporado à nanopartícula em relação ao total de fármaco adicionado no preparo da formulação. A porcentagem é calculada pela diferença entre a quantidade total da LIC na suspensão coloidal e a quantidade da LIC livre solúvel na fase aquosa externa, dividida pela quantidade total da LIC na suspensão após a filtração x 100. A porcentagem de encapsulação foi calculada, portanto, pela seguinte equação:

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{\text{conc. LIC total dispersão coloidal (mg/mL)} - \text{conc. LIC ultrafiltrado (mg/mL)}}{\text{conc. LIC total dispersão coloidal (mg/mL)}} \times 100$$

O fármaco total foi determinado pela completa dissolução de 100 μL da dispersão de NC em 900 μL ACN agitados no vortex por 5 min. (Vortex Instrument, IKA, Alemanha) e centrifugado em microcentrífuga (Centrifuge 5415 D, Eppendorf); 100 μL do sobrenadante foram injetados em CLAE-UV. A LIC livre solúvel na fase externa aquosa foi obtida pelo método de ultrafiltração/centrifugação de 400 μL de dispersão de NC a $500 \times g$ por 30 minutos utilizando-se uma microcentrífuga (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Na parte superior do filtro de AMICON (membranas MICROCON, MWCO 50.000, Millipore[®], Bedford, MA, U.S.A). Assim, 50 μL do ultrafiltrado contendo a LIC

livre foram misturados em 200 µL de ACN agitado em vortex e centrifugado quantidade da LIC no sobrenadante estimada por CLAE-UV. A quantidade da LS aderida à membrana de ultrafiltração foi estimada por remoção da membrana, seguida de sua lavagem em água Milli-Q. A membrana foi adicionada a 1000 µL de ACN agitada em vortex por 15 minutos, centrifugada a 5900 × g por 30 minutos e a quantidade da LIC determinada no sobrenadante. Todas as amostras analisadas por CLAE-UV foram previamente filtradas usando unidades filtrantes Millipore®, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm. As análises foram realizadas em triplicatas ± desvio padrão.

A eficiência de encapsulação das NC foi calculada pela quantidade da LIC encapsulada em 100 µL de suspensão de NC dividida pela quantidade da LIC pesada e adicionada ao preparo da suspensão de NC x 100. A eficiência de encapsulação foi calculada segundo equação abaixo.

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{quantidade total da LIC encapsulada (mL)} \times 100}{\text{quantidade da LIC pesada para o preparo (mg)}}$$

4.2.4 Estudo da estabilidade física

A estabilidade das nanopartículas pode ser influenciada, por exemplo, pela adsorção de tensoativos ou de moléculas ativas à superfície e para monitorar esta estabilidade o tamanho da partícula, o potencial zeta, o teor de fármaco e o pH são parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados (Calvo *et al.*, 1996; Losa *et al.*, 1993; Fessi *et al.*, 1989; Guterres *et al.*, 1995). Os parâmetros avaliados neste trabalho para estudo da estabilidade foram: tamanho, índice de polidispersão e porcentagem de encapsulação das NC contendo LIC. A estabilidade das formulações foi avaliada por um período total de seis meses, sendo que os parâmetros para cada formulação foram avaliados mensalmente.

4.2.5 Avaliação morfológica das nanocápsulas

A avaliação morfológica de sistemas nanoestruturados é realizada a partir da observação da forma, tamanho e superfície das partículas por meio de técnicas de microscopia (Schaffazick *et al.*, 2003).

Para análise morfológica foi utilizada a microscopia de força atômica (MFA), utilizando os equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA), no Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando sondas de silício de comprimento de 228 µm, com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 nm a 10 nm.

Para obtenção das imagens, aproximadamente 5 µL das amostras foram depositados em placas de mica clivadas no momento do uso ou em lâminas de vidro contendo parafilme em sua superfície. Após a deposição das amostras, essas foram secadas utilizando-se um jato de argônio unidirecional. A varredura foi efetuada em uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando um programa de análise do sistema (Section Analysis)

4.3 Validação de metodologia analítica para quantificação da licnofolida nas nanocápsulas poliméricas

Para determinação do conteúdo da LIC associada às nanocápsulas foi aplicada a metodologia desenvolvida e validada por Branquinho *et al.* (2014 a) com algumas adaptações na técnica. A validação de um método, através de estudos experimentais, deve garantir que o método analítico empregado atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a qualidade e a confiabilidade dos resultados (Kano, 2002). Os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, e limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com o Guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005).

4.4 Análise estatística

O tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta, porcentagem e eficiência de encapsulação das NC brancas e contendo LIC foram expressos em termos de média ± desvio padrão ou erro padrão da média e avaliada por análise de variância ANOVA Oneway usando o programa Prisma for Windows, versão 5.0. As diferenças foram consideradas como significativas quando o nível de significância foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

Parte II: Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo

4.5 Validação bioanalítica da licnofolida em plasma por CLAE-UV

4.5.1 Substância e reagentes

Itraconazol: (\pm)-1-sec-butil-4-[p-[4-[p[[*(2R,4S)*]-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-metil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-1-piperazinil]fenil-D2-1,2,4-triazolin-5ona, ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$), CAS 84625-61-6, (Lote 097K1156V/Fabricação: 30.09.2007/Validade: 26.12.2012), com teor de pureza de 98,0%, foi comprado da Sigma-Aldrich (St. Louis USA). Acetonitrila (ACN) e metanol grau CLAE (Tedia, EUA). Dimetilacetamida (DMA), PEG 300 foram comprados da Vetec (São

Paulo, Brasil). Água ultra pura foi obtida no laboratório por destilação e subsequente purificação em sistema Simplicity MilliQ (Millipore[®], Belford, EUA).

4.5.2 Equipamentos e Condição cromatográfica

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters Alliance e2695 (Waters, Manchester, UK) composto por bomba, injetor automático de amostras, forno de coluna e detector UV Waters 2489, injetor automático Waters 2695 com o loop da válvula de tamanho de 20 μ L, forno de coluna. A separação foi realizada por coluna cromatográfica C₁₈ Phenomenex[®], modelo Gemini (150 x 4,6mm d.i.; 5 μ m), pré-coluna C₁₈ Phenomenex[®] modelo AJ0-4287 (4mm x 3mm x 5 μ m). Balança AUX220 Shimadzu (Alemanha). Agitador tipo Vortex Instrument IKA (Alemanha). Centrífuga 5415D Eppendorf (USA). Banho Ultra-som USC-4800A Unique (USA). Foram utilizadas pipetas automáticas Eppendorf de volume variável (5-50, 10-100, 20-200, 100-1000 μ L), seringas de vidro (B-D Yale) de 10 mL e unidades filtrantes Millipore[®], tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m (Millipore[®],USA). Para o preparo das soluções foram usadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

As condições de operação foram adaptadas às de Branquinho *et al.* (2014 a). Para o desenvolvimento do método utilizou-se com fase móvel constituída por uma mistura ACN: água (70:30 v/v) com eluição isocrática, fluxo de 1,0 mL/min., volume de injeção de 25 μ L, temperatura de 30°C e detecção no UV a 267 nm. As soluções das amostras e de estoque foram preparadas no momento da sua utilização. Todas as fases móveis testadas foram filtradas em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μ m. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por 40 minutos.

4.5.3 Padrões de calibração

Foi preparada uma solução estoque de 1000 μ g/mL da LIC em ACN. O itraconazol (ITZ) foi utilizado como padrão interno (PI) devido a sua solubilidade em metanol, estabilidade química e adequado tempo de retenção com o método desenvolvido. Foi preparada uma solução estoque de ITZ na concentração de 250 μ g/mL diluído em metanol. A curva de calibração da LIC (curva padrão) foi construída utilizando soluções de trabalho nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 μ g/mL. Estas soluções de trabalho foram preparadas por diluição seriada a partir das soluções-padrão e por sua vez, todas foram armazenadas a -20°C.

4.5.4 Desenvolvimento do método de extração da licnofolida

Para a extração da LIC em plasma de camundongo foram testados os métodos de extração líquido-líquido e precipitação das proteínas do plasma. A extração líquido-líquido foi realizada

adicionando 300 µl de acetato de etila aos 80 µL de plasma contendo 10 µL da solução de trabalho (10,0 µg/mL) da LIC e 10 µL de PI, e homogeneizando-se em agitador vortex em tempos variados (**Tabela 5**). Após centrifugação a $400 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante resultante foi filtrado em unidade filtrante Millex com membrana Durapore de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em dessecador ao abrigo da luz. O resíduo foi ressuscitado em 100 µL de fase móvel para injeção em CLAE. A extração por precipitação das proteínas do plasma foi realizada adicionando ACN ou metanol de acordo com a **Tabela 5**, homogeneizando em agitador vortex por 2 min e centrifugando a $400 \times g$ por 10 min. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em dessecador ao abrigo da luz e o resíduo foi ressuscitado em 100 µL de fase móvel para injeção em CLAE.

Tabela 5: Testes de recuperação da licnofolida em plasma de camundongo

Método de extração	Solvente	Volume (µL)	Agitação em vortex (min)
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	1
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	5
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	10
Precipitação de proteínas	Acetonitrila	500	2
Precipitação de proteínas	Acetonitrila	1000	2
Precipitação de proteínas	Metanol	500	2
Precipitação de proteínas	Metanol	1000	2

4.5.5 Preparo dos padrões de calibração

Foi utilizado plasma de animais sadios para validação do método. O sangue de camundongos foi coletado pelo plexo sinu-orbital em tubos eppendorf contendo EDTA 0,18% p/v. O plasma foi imediatamente separado por centrifugação a $400 \times g$ por 10 minutos e estocado a -20°C. As amostras de plasma padrão da curva de calibração foram preparadas a cada dia de análise a partir de soluções-padrão de 0,5 a 10,0 µg/mL da LIC em ACN, conforme descrito na **Tabela 6**. Em todas as análises adicionou-se 10 µL de solução-padrão de ITZ na concentração de 250 µg/mL (padrão-interno), 10 µL das soluções de trabalho da LIC e 80 µL de plasma branco. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubo tipo vortex por 2 min., e submetidas ao procedimento de extração imediatamente após o preparo.

Tabela 6: Preparo das amostras de plasma padrão utilizadas na curva de calibração da quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.

Concentração da Solução-padrão (µg/mL)	Volume de PI (µL)	Volume de plasma (µL)	Concentração final presente na curva de calibração (µg/mL)
5,0	10	80	0,5
7,5	10	80	0,75
10,0	10	80	1,0
20,0	10	80	2,0
25,0	10	80	2,5
50,0	10	80	5,0
75,0	10	80	7,5
100,0	10	80	10,0

PI=itraconazol

4.5.6 Preparo dos padrões de controle de qualidade

As amostras de plasma de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) foram preparadas a partir de soluções-padrão de padrão, conforme apresentado na **Tabela 7**. Transferiu-se 10,0 µL de soluções-padrão da LIC preparadas em solução ACN em concentrações adequadas, para balões volumétricos de 100,0 mL. A seguir, adicionou-se lentamente o plasma branco sob cuidadosa homogeneização para evitar a formação de espuma.

Tabela 7: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade

Controle de qualidade	Concentração da solução de LIC (µg/mL)	Volume de plasma branco (µL)	Concentração final (µg/mL)
CQB	10,0	80	1,0
CQM	50,0	80	5,0
CQA	75,0	80	7,5

Aos tubos foram adicionados 10 µL da solução estoque de PI.

4.5.7 Validação do método para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo

Para a validação do método foram determinadas a especificidade, a recuperação, a linearidade, a precisão (inter e intra-dia) a exatidão, o limite de detecção, o limite de quantificação e a estabilidade, segundo os critérios de aceitação estabelecidos pelo Guia de Validação de Métodos

Bioanalíticos do FDA (US Food and Drug Administration, 2001) e Resolução n° 899 de março de 2003 da ANVISA (Brasil, 2003).

4.5.7.1 Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de qualquer outra presente na amostra (Causon, 1997). Na análise de amostras biológicas, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos ou produtos de decomposição (FDA, 2001), além dos anticoagulantes, quando utilizados. Tal parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de plasma branco (plasma obtido de animais saudáveis, isento de LIC e PI), sendo avaliados quatro plasmas normais e dois plasmas hemolisados para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos. A amostra de plasma hemolisado foi obtida por congelamento do sangue e posterior centrifugação por 10 minutos a 3100 rpm.

4.5.7.2 Recuperação

A recuperação indica a eficiência do procedimento de purificação das amostras estabelecido no método e indica a quantidade do fármaco obtida após a amostra de plasma ser processada, ou seja, avalia se as condições empregadas no método são adequadas o suficiente para purificar a amostra. Assim, a recuperação corresponde ao resultado obtido após análise de amostra de plasma “branco” acrescida de padrão, submetida à pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido à pré-tratamento (Causon, 1997). Esse parâmetro foi determinado comparando-se resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação a resultados de análises de amostras de solução padrão não submetidas a esse processo, mas que foram adicionadas ao plasma branco submetido ao processo de purificação. A resposta das amostras não submetidas ao processo de purificação representa a quantidade total de fármaco presente na amostra de plasma, ou seja, 100%, enquanto que a resposta das amostras submetidas ao processo de purificação representa a porcentagem recuperada. Embora porcentagens próximas a 100 de recuperação sejam desejáveis, admitem-se valores menores de recuperação, desde que o método seja preciso e exato (FDA, 2001). Este parâmetro foi investigado em três diferentes concentrações (concentrações das amostras de plasma padrão de controle de qualidade) e cinco repetições, conforme recomendado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (FDA, 2001). Nos métodos bioanalíticos, a recuperação deve ser também avaliada para os compostos utilizados como PI, independente da concentração usada. Aceita-se uma variação de até 15% do valor de recuperação determinado para os analitos de interesse.

4.5.7.3 Limite de detecção (LD) e quantificação inferior (LQI)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (Brasil, 2003). O limite de quantificação inferior (LQ) deve representar a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis.

O LD foi estabelecido por meio da análise de 5 réplicas de amostras contendo concentrações conhecidas e decrescentes dos fármacos, até o menor nível detectável sendo calculado pela equação:

$$LD = \frac{3,3\alpha}{S}, \text{ onde:}$$

α = desvio padrão do intercepto com o eixo Y observado para cinco curvas de calibração;

S = média dos valores de inclinação obtidos das mesmas cinco curvas de calibração.

O LQ foi determinado utilizando-se cinco amostras de concentrações decrescentes e conhecidas dos fármacos até o menor nível determinável, com precisão e exatidão aceitáveis. A exatidão deve estar entre $\pm 15\%$ do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 % (Bressolle *et al.*, 1996).

4.5.7.4 Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método (Bressolle *et al.*, 1996), representada, neste estudo, pela área do sinal cromatográfico.

A linearidade é obtida através da construção da curva de calibração, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (Brasil, 2003; FDA, 2001). Na construção da curva de calibração foram utilizadas amostras de plasma padrão da curva de calibração em oito concentrações diferentes da LIC (0,5-10,0 $\mu\text{g/mL}$) e cinco repetições. O intervalo da curva de calibração foi definido entre o limite de quantificação inferior e 120% da concentração mais alta que se pretendia analisar. Estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e razão entre as áreas dos sinais cromatográficos do padrão e padrão interno, considerada variável dependente (y). Os parâmetros de correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados (Brasil, 2003, FDA, 2001). Juntamente com a curva de calibração, realizou-se a análise da amostra de plasma “branco” (amostra de plasma isento de padrão e padrão interno), e da amostra “zero” (plasma isento de padrão adicionado de padrão interno) com a finalidade de garantir a ausência de picos interferentes (Brasil, 2003; FDA, 2001). Os critérios para aceitação da curva de calibração seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais. De acordo com as normas atualmente em vigor, da ANVISA e FDA, se aceita um coeficiente de variação menor ou

igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações. Além disso, o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98

4.5.7.5 Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente, sendo expressa como coeficiente de variação (CV) dessas medidas. A precisão intra-dia refere-se ao CV obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, no mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analistas ou reagentes e utilização do método durante várias semanas ou meses (Causon, 1997). Este parâmetro foi determinado analisando-se amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes e em cinco réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias consecutivos (precisão inter-dias), e foi calculado segundo a equação abaixo:

$$CV(\%) = \frac{DP}{C_{média}} \times 100$$

Onde ,

$CV(\%)$ = coeficiente de variação em porcentagem

DP = desvio padrão

$C_{média}$ = concentração média determinada

4.5.7.6 Exatidão

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (Causon, 1997).

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em cinco repetições em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias diferentes (exatidão inter-dias) e foi calculado segundo a equação:

$$Exatidão = \frac{C_{média}}{C_{teórica}} \times 100$$

Onde:

$C_{média}$ = concentração média determinada

$C_{teórica}$ = concentração teórica ou nominal

4.5.7.7 Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco numa matriz biológica depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do fármaco, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (FDA, 2001).

A determinação da estabilidade de uma amostra é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração entre a sua coleta e o momento da análise (Causon, 1997). Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras de plasma em temperatura ambiente, em ciclos de congelamento e descongelamento e após longos períodos de armazenamento. A avaliação da estabilidade pós-processamento das amostras permite que amostras processadas possam ser avaliadas após longos períodos de espera no autoinjeter do sistema cromatográfico. Além disso, o monitoramento da estabilidade das soluções-padrão é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos das análises das amostras de plasma de voluntários. Conforme recomendado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (FDA, 2001), foram determinadas as estabilidades descritas a seguir.

4.5.7.8 Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas e submetidas ao processo de purificação. Os resultados foram comparados com amostras descongeladas e imediatamente analisadas.

4.5.7.9 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a -80°C por, no mínimo, 12 horas, descongelamento e recongelamento por, no mínimo, 12 horas e assim sucessivamente até completar três ciclos. A concentração do fármaco nas amostras de plasma padrão de controle de qualidade foi determinada nos três ciclos, inclusive no tempo zero, correspondente à preparação das amostras de plasma de controle de qualidade e análise das mesmas sem submetê-las ao congelamento.

4.5.7.10 Estabilidade pós-processamento

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural, a temperatura ambiente, e analisadas nas mesmas temperatura e condições em que foram analisadas as amostras de plasma

de voluntários. A avaliação deste parâmetro contemplou o período máximo de espera das amostras processadas no auto-injetor do cromatógrafo (até 48 horas).

4.5.7.11 Estabilidade das soluções padrão

Para avaliar a estabilidade das soluções-padrão em solução de água e metanol (90:10 v/v), estas foram analisadas diariamente durante as etapas de validação e análise de amostras de plasma dos animais, com monitoramento diário dos sinais cromatográficos obtidos. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções-padrão recém-preparadas.

Parte III: Estudo farmacocinético da licnofolida administrada a camundongos tratados com diferentes formulações de nanocápsulas

4.6 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos *Swiss*, com 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto e ali mantidos segundo as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) realizados segundo o protocolo nº2012/23 aprovado pelo CEUA/UFOP. Os animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com o tratamento empregado: animais tratados com solução da LIC livre, animais tratados com LIC-PCL NC, animais tratados com LIC-PLA-PEG NC.

4.6.1 Esquema de tratamento, coleta, processamento e armazenamento das amostras de plasma.

Os experimentos farmacocinéticos para administração i.v. foram conduzidos com a dose única de 12-13,3 mg/kg com as formulação da LIC livre, LIC-PCL NC, LIC PLA-PEG NC, utilizando animais saudáveis. As dispersões de NC contendo a LIC e a lactona e a solução de LIC livre foram administradas via i.v., através da veia caudal dos animais devidamente imobilizados em caixas de contenção.

Para realizar a quantificação dos fármacos foram feitas coletas de sangue após as administrações realizadas nos tempos 5,0; 20,0; 40,0 minutos e 1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0 horas através da veia caudal lateral, seguindo a **Figura 7**. O sangue (200 µL) foi acondicionado em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, com EDTA 0,18% p/v. O plasma foi imediatamente separado por centrifugação a $400 \times g$ por 10 minutos, obtendo um volume de 80 µL. Em todas as análises adicionou-se 10 µL de solução-padrão de ITZ na concentração de 250 µg/mL (padrão-interno). Posteriormente, as amostras de plasma foram quantificadas por CLAE-UV. Foram utilizados 6 camundongos por ponto de tempo da curva por grupo.

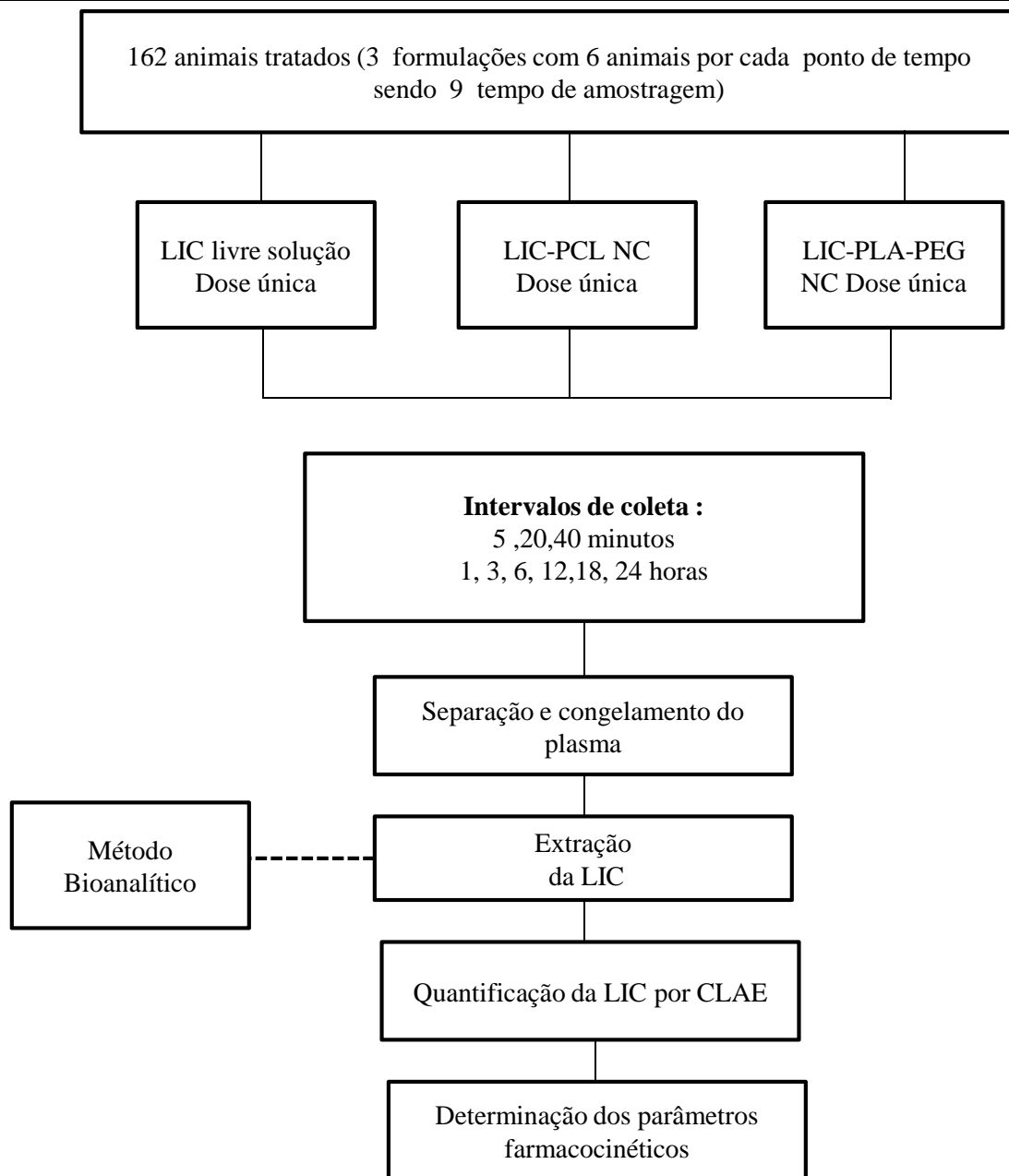


Figura 7: Delineamento experimental do estudo farmacocinético da LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC e solução da licochalcone A em camundongos *Swiss*, na dose única de 12-13,3 mg/kg por via intravenosa.

4.6.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Os perfis farmacocinéticos plasmáticos da lactona livre e nanoencapsulada forma analisados por abordagem não-compartimental utilizando-se os programas Excel[®] 2010 (Microsoft[®]).

A constante de eliminação (k_e) foi calculada, pela equação abaixo.

$$k_e = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{(t_1 - t_2)}$$

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi estimado determinado de acordo com a equação:

$$t_{1/2} = \frac{0,693 (t_2 - t_1)}{\ln C_1 - \ln C_2}$$

A área sob a curva (ASC_{0-720}) foi calculado pelo método trapezoidal nos tempos de 0 a t, relacionando a [concentração x tempo] *versus* tempo onde t é o último tempo da coleta. Essa área foi acrescida da área sob a curva extrapolada (ASC_{extrap}), sendo então denominada $ASC_{0-\infty}$, conforme equações:

$$ASC_{0-720} = \left(\frac{C_0 + C_1}{2}\right) * \Delta t + \left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right) * \Delta t \dots + \left(\frac{C(t-1) + Ct}{2}\right) * \Delta t$$

$$ASC_{t-\infty} = \frac{Ct}{k_e}$$

A área sob a curva no primeiro momento ($ASMC_{0-720}$) foi calculada pelo método trapezoidal, relacionando a [concentração x tempo] *versus* tempo, conforme a equação abaixo. Desse modo tem-se pelas equações:

$$ASMC_{0-720} = \left\{ \frac{(C_0 * t_0) + C_1 * t_1}{2} \right\} * \Delta t + \dots + \left\{ \frac{(C(t-1) * t(t-1) + (Ct * tt))}{2} \right\}$$

$$ASMC_{0-\infty} = \left(\frac{Ct * t}{k_e}\right) + \left(\frac{Ct}{k_e^2}\right)$$

O tempo de residência médio no plasma (TRM) foi estimado pela relação entre $ASMC_{0-\infty}$ e $ASC_{0-\infty}$. O *clearance ou depuração* (Cl) foi calculado considerando a dose administrada e a $ASC_{0-\infty}$. O volume de distribuição (Vd) foi determinado considerando-se o Cl/ke Gibaldi e Perrier, 1982 e Sargel *et al.* (2012)

$$TRM_{0-720} = \frac{ASMC_{0-720}}{ASC_{0-720}}$$

$$Cl_{total} = \frac{D}{ASC_{0-\infty}}$$

$$Vd = \frac{Cl_{total}}{ke}$$

4.6.3 Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos em cada grupo experimental foram expressos como termos de média \pm desvio padrão e as diferenças significativas dos valores médios foram avaliados por análise de variância ANOVA Oneway usando o programa Graph Pad Prism. As diferenças foram consideradas como significativas quando o nível de significância foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

Parte IV: Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com licnofolida modelo murino**4.7 Estudos da eficácia da licnofolida *in vivo*****4.7.1 Cepas de *T.cruzi***

Foram estudadas as seguintes cepas: Cepa CL sensível ao tratamento pelo BZ (Brenner e Chiari, 1965). Cepa Y isolada de um paciente chagásico, na fase aguda proveniente do município de Marília, São Paulo (Freitas *et al.*, 1953), posteriormente estudada e descrita por Silva e Nussensweig (1953) é considerada parcialmente resistente ao tratamento com BZ e NF (Filardi & Brenner 1987). Cepa Colombiana (Frederici *et al.*, 1964), isolada por meio de hemocultura de um caso humano na Colômbia e considerada resistente a quimioterapia com BZ e NF (Filardi & Brenner 1987). Cepa VL-10 isolada de paciente na forma indeterminada da doença de Chagas no estado de Minas Gerais. Esta cepa é considerada resistente ao tratamento com BZ (Filardi & Brenner, 1987).

4.7.2 Animais

Foi escolhido o modelo murino e o projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (**protocolo 2009/13**). Foram utilizadas fêmeas de camundongos *Swiss*, com 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto e ali mantidos segundo as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.7.3 Substâncias Ativas

Foi testada a LS LIC na forma farmacêutica nanoencapsulada (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) isolada e purificada de *L. trichocarpa* em comparação com o benzonidazol (BZ) (N-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida), isolado e purificado a partir de comprimidos de Rochagan[®] 100 mg (Roche), fármaco empregado no tratamento da doença de Chagas em humanos e aqui utilizado como controle. Foi ainda utilizado o BZ na forma farmacêutica comprimidos de Rochagan[®] 100 mg (Roche). O padrão grau analítico de BZ (teor de pureza 97,0%) foi comprado da Sigma-Aldrich (St. Louis USA).

4.7.3.1 Extração, purificação, caracterização e preparação das soluções de benzonidazol para administração por intravenosa.

O fármaco utilizado como referência na determinação da eficácia das novas formulações (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) foi o benzonidazol (BZ), purificado a partir de comprimidos

de Rochagan[®]. Não havendo possibilidade de adquirir o BZ na sua forma pura em quantidade suficiente para que este fármaco pudesse ser administrado por via i.v., à semelhança das NC com LIC, foi realizada sua dissolução na forma pura. Os procedimentos de extração, purificação, caracterização e preparação das soluções de BZ para administração i.v. estão descritas em Branquinho *et al.* (2014 b).

4.7.3.2 Preparo da suspensão benzonidazol para administração por via oral

Para o tratamento por via oral foi utilizado como fármaco referência BZ em doses diárias de 100 mg/kg de peso corporal, durante 20 dias consecutivos (Filardi & Brener, 1987).

A droga foi ressuspensa em água, utilizando a goma arábica como agente suspensivo, de tal maneira que um volume 0,25 mL foi administrado em cada animal, como utilizado por Marretto e Andrade (1994).

4.7.3.3 Preparo das soluções da licnofolida livre

Para administração da solução da LIC por via, i.v. e oral. LIC (2mg/ml) foi dissolvido em mistura de DMA: PEG 300 40:60 (v/v), como descrito Branquinho *et al.* (2014 b), Leite *et al.* (2007) diluído em 5% de glicose (p/v) para atingir as doses adequadas da LIC para administração por via i.v. e oral.

4.7.4 Infecções dos animais e protocolo de tratamento de fase aguda

Os testes *in vivo* foram feitos em grupos de oito camundongos. Os animais foram inoculados com as cepas CL, Y e Colombiana de *T.cruzi* via i.p com inóculo padronizado de 10.000 tripomastigotas sanguíneos obtidos no dia de confirmação da parasitemia e quantificado segundo a técnica de Brener (1962) (**Figura 8**).

Os tratamentos por via i.v. com LIC-PCL NC (2,0 mg/kg/dia), LIC-PLA-PEG NC (2,0 mg/kg/dia), BZ livre (50 mg/kg/dia) e todos os controles (INT, NC-Br e DMA:PEG) foi iniciado nos dias de confirmação da infecção de cada cepa, no caso da cepa Y (4º dia pós-infecção) e em animais infectados com as cepas CL e Colombiana (7º dia pós-infecção). A administração de BZ livre e das formulações nanoencapsuladas da LIC foi feita por via i.v., durante 20 dias consecutivos.

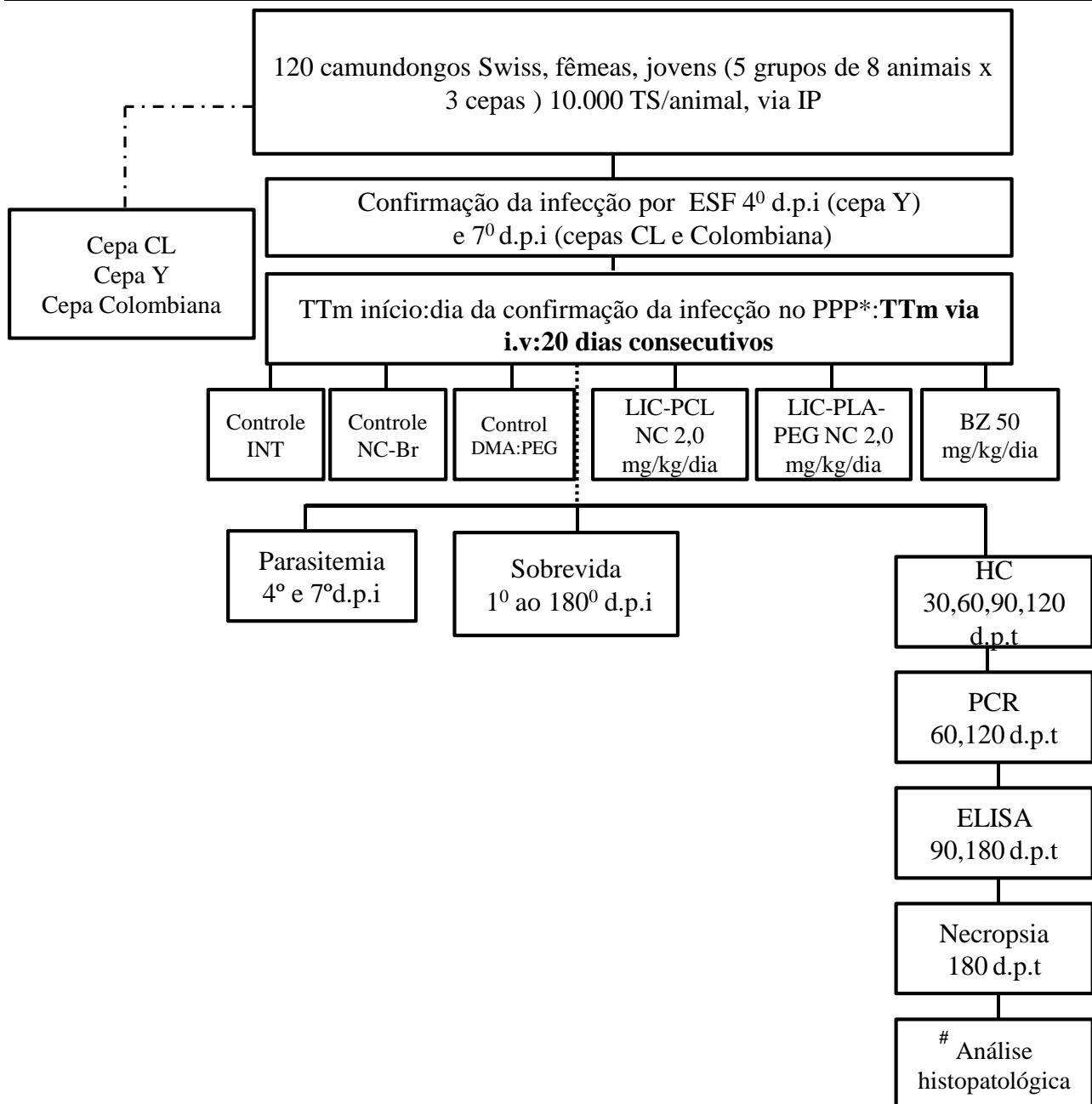


Figura 8: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via intravenosa em camundongos Swiss fêmeas inoculados com as cepas CL, Y e Colombiana de *Trypanosoma cruzi* tratados com LIC-PCL NC (nanocápsula de PCL contendo licnofolida), LIC-PLA-PEG NC (nanocápsula de PLA-PEG contendo licnofolida) na dose de 2,0 mg/kg/dia, BZ em solução (Benzonidazol-controle positivo) na dose 50 mg/kg/dia.

Grupos controles: INT (controle infectado não tratado), NC-Br (nanocápsula branca), controle DMA: PEG (controle dimetilacetamida: polietilenoglicol 300). TS: tripomastigota sanguíneo, IP: intraperitoneal, ESF: exame de sangue a fresco, TTm: tratamento, i.v.: intravenosa, HC: hemocultura, PCR: reação em cadeia da polimerase, d.p.i: dia pós-infecção, d.p.t: dia pós-tratamento), *PPP: período pré-patente (período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia em que foi detectado parasito no sangue periférico do animal por meio de ESF). Volume de administração de 0,2 mL. # Análise Histopatológica em avaliação.

Os tratamentos por via oral com LIC-PCL NC (5,0 mg/kg/dia), LIC-PLA-PEG NC (5,0 mg/kg/dia), BZ em suspensão (100 mg/kg/dia) e todos os controles (INT e NC-Br) foi iniciado nos dias de confirmação da infecção da cepa Y, procedendo-se como descrito acima abaixo (**Figura 9**). A administração das formulações foi feita por via oral por 20 dias consecutivos.

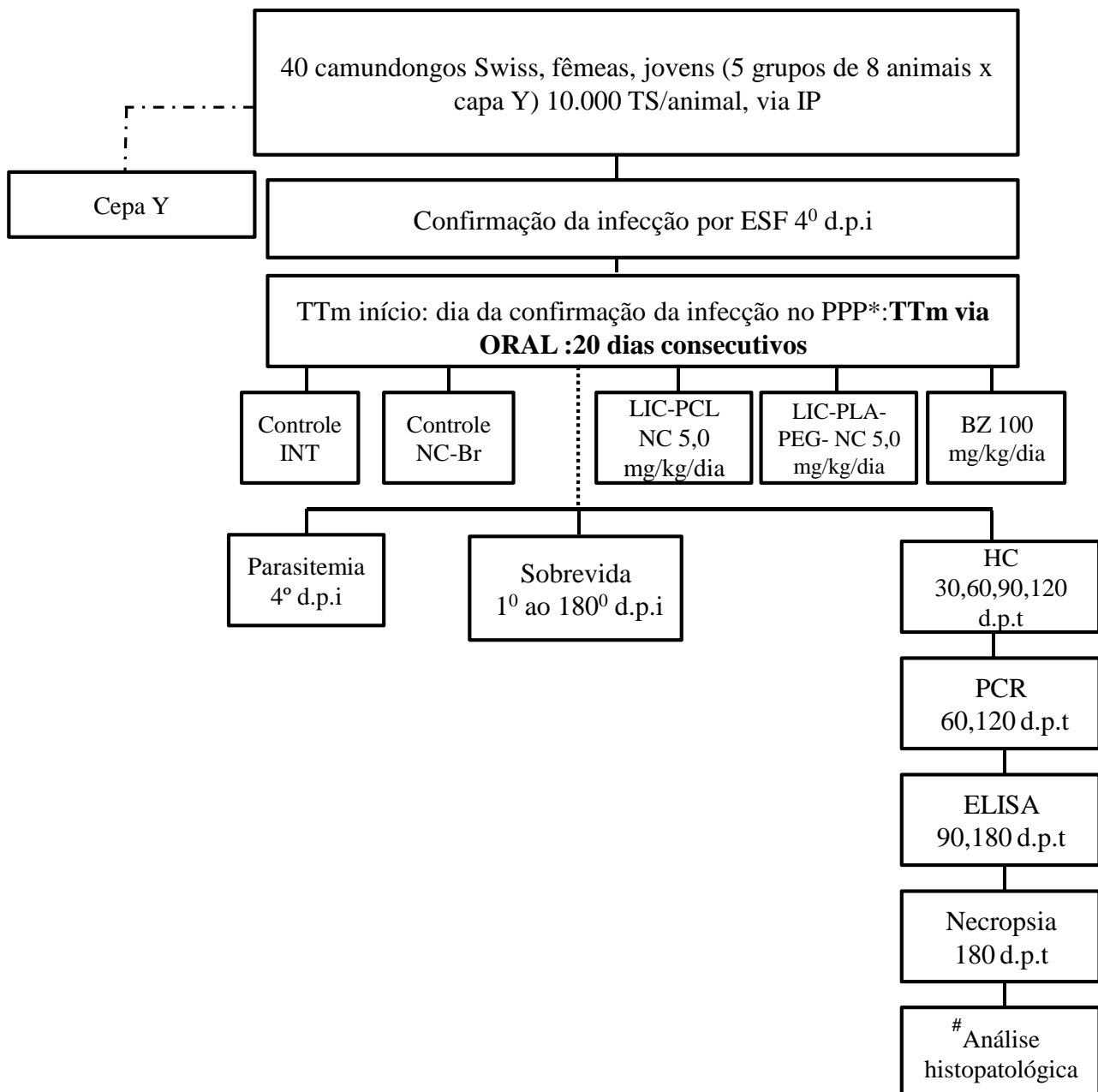


Figura 9: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos, Swiss fêmeas, inoculados a com cepa de Y de *Trypanosoma cruzi*. Tratamentos realizados: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 5,0 mg/kg/dia, BZ em suspensão na dose de 100 mg/kg/dia.

Grupos controles: INT (controle infectado não tratado), NC-Br (nanocápsula branca). TS: tripomastigota sanguíneo, i.p: intraperitoneal, ESF: exame de sangue a fresco, TTm: tratamento, i.v.: intravenosa, HC: hemocultura, PCR: reação em cadeia da polimerase, d.p.i: dia pós-infecção, d.p.t: dia pós-tratamento), *PPP: período pré-patente (período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia em que foi detectado parasito no sangue periférico do animal por meio de ESF). Volume de administração de 0,2 mL. # Análise histopatológica em avaliação.

4.7.5 Infecções dos animais e protocolo de tratamento de fase crônica

Os testes *in vivo* foram feitos em grupos de dez camundongos. Os animais foram inoculados com a cepa Y de *T.cruzi* (parcialmente resistente ao BZ) e VL-10 (resistente ao BZ) via i.p com inóculo 500 tripomastigotas sanguíneos obtidos no dia de pico de parasitemia de cada cepa (4º dia pós-infecção para cepa Y e 7º dia pós-infecção para cepa VL-10) quantificado segundo a técnica de Brener (1962) (**Figura 10 e 11**).

Os tratamentos foram realizados por via i.v. e oral com as formulações LIC-PCL NC, LIC PLA-PEG-NC, BZ livre e BZ em suspensão e todos os controles (INT e NC-Br) e iniciado 90 dias pós infecção. Antes do dia do tratamento a infecção foi confirmada por ESF em todos os animais e caso a técnica de ESF não confirmasse a presença do parasito, foi realizada a HC. A administração de BZ e das formulações nanoencapsuladas da LIC foi feita por 20 dias consecutivos. As demais informações estão descritas nas **figuras 10 e 11**.

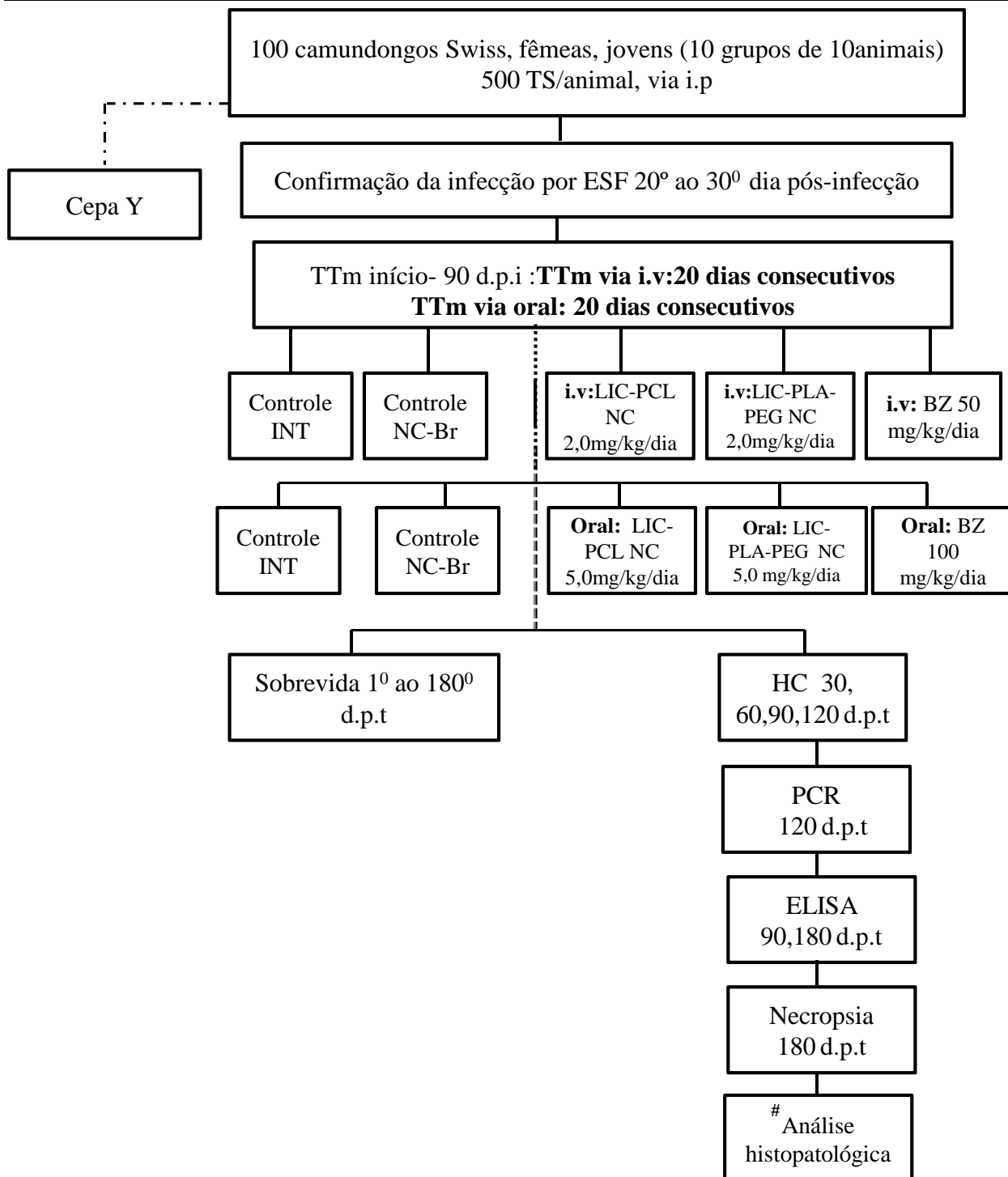


Figura 10: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas em camundongos, Swiss fêmeas, inoculados a com cepa de Y de *Trypanosoma cruzi*: A) Tratamento pela via i.v.- os animais foram tratados com: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 2,0 mg/kg/dia, BZ em solução na dose 50,0 mg/kg/dia. B) Tratamento pela via oral - os animais foram tratados com: LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC na dose de 5,0 mg/kg/dia; BZ em suspensão na dose 100,0 mg/kg/dia.

Grupos controles: IN-NT (controle infectado não tratado), NC-Br (nanocápsula branca). TS: tripomastigota sanguíneo, i.p: intraperitoneal, ESF: exame de sangue a fresco, TTm: tratamento, i.v.: intravenosa, HC: hemocultura, PCR: reação em cadeia da polimerase, d.p.i: dia pós-infecção, d.p.t: dia pós-tratamento. Volume de administração de 0,2 mL.. #Análise histopatológica em avaliação.

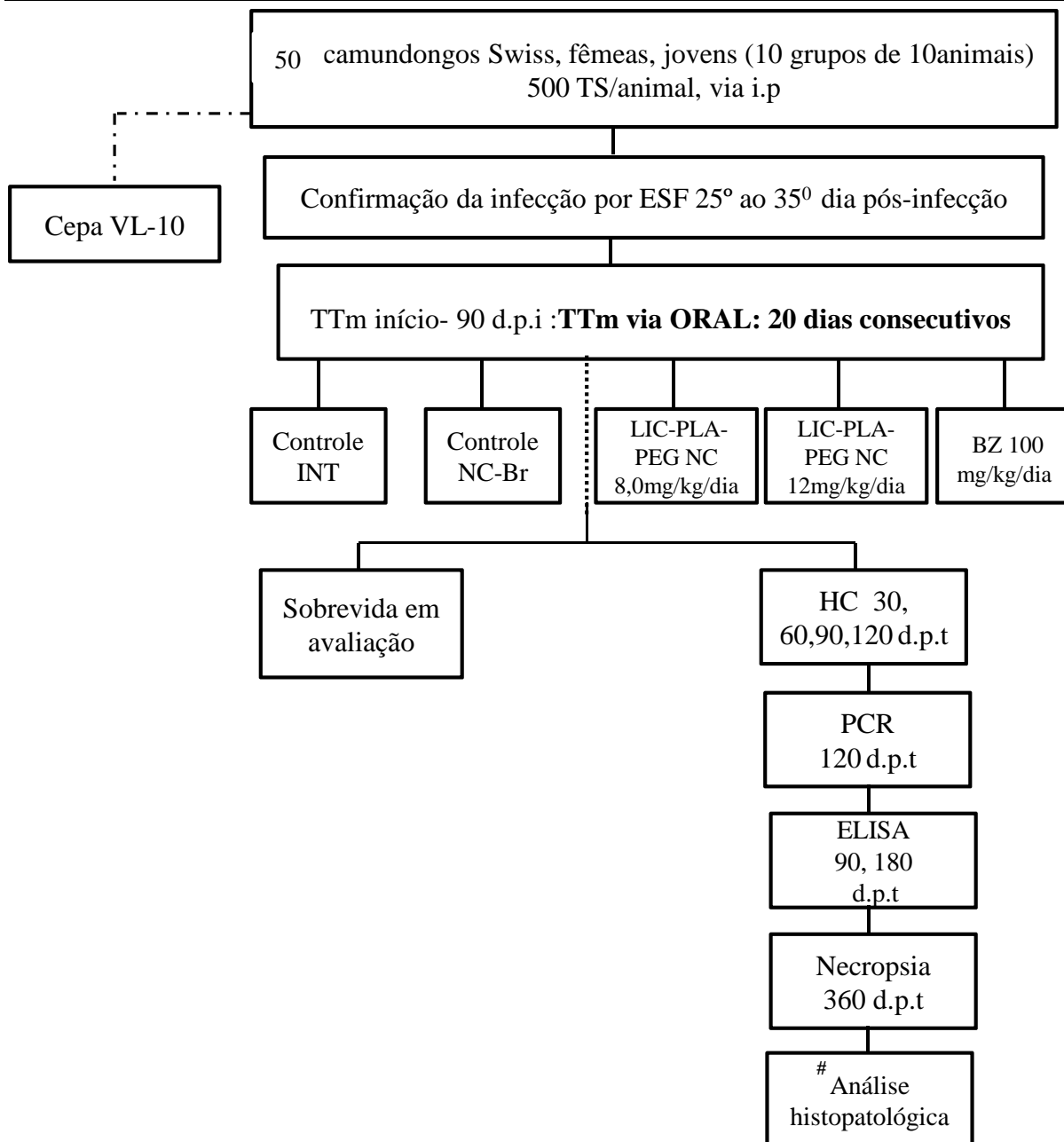
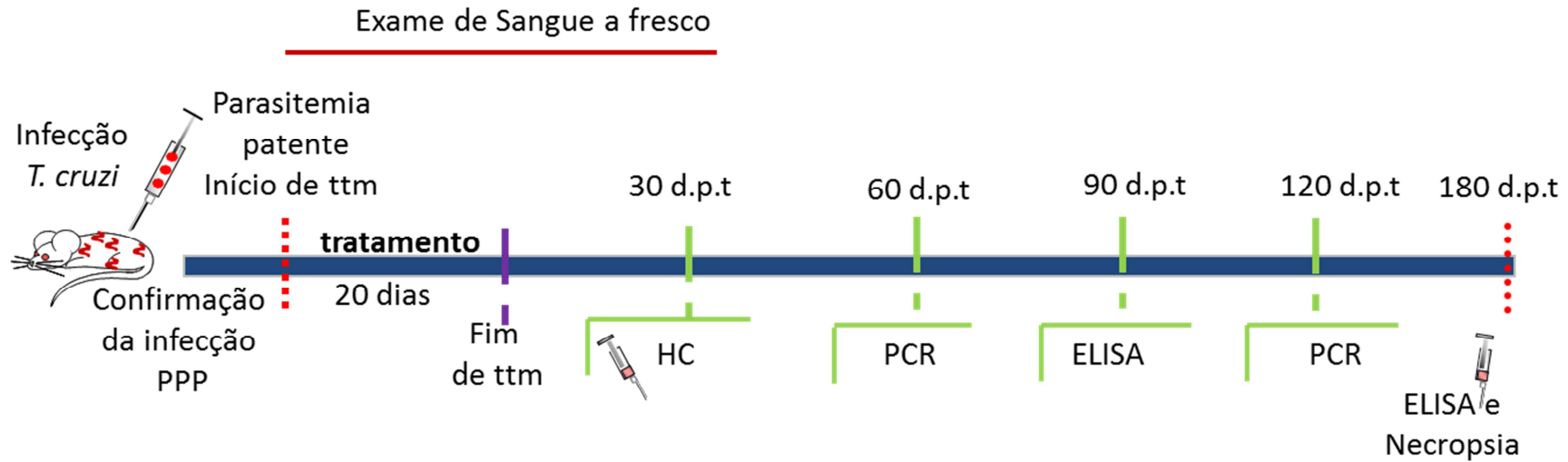


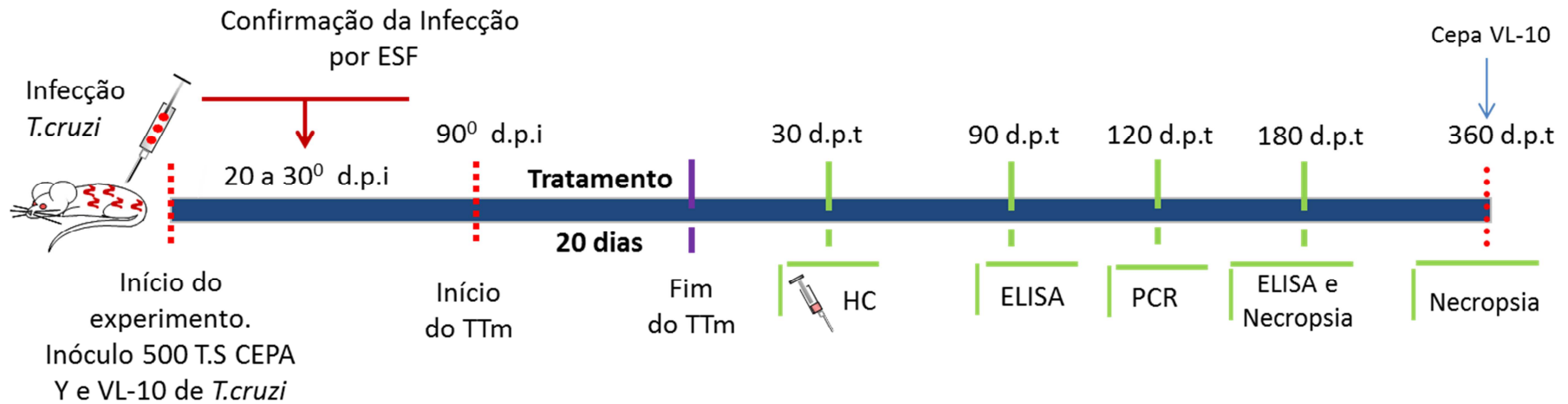
Figura 11: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos, Swiss fêmeas, inoculados a com cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi*. Tratamentos realizados: LIC-PLA-PEG NC nas doses de 8,0 e 12,0 mg/kg/dia; BZ em suspensão na dose de 100 mg/kg/dia.

Grupos controles: INT (controle infectado não tratado); NC-Br (nanocápsula branca). TS: tripomastigota sanguíneo, i.p: intraperitoneal, ESF: exame de sangue a fresco, TTm: tratamento, i.v.: intravenosa, HC: hemocultura, PCR: reação em cadeia da polimerase, d.p.i: dia pós-infecção, d.p.t: dia pós-tratamento. Volume de administração de 0,2 mL. # Análise histopatológica em avaliação

Time line do experimento DE FASE AGUDA



Time line do experimento DE FASE CRÔNICA



4.7.6 Confirmação da infecção

4.7.6.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O exame de sangue a fresco foi empregado para a confirmação da infecção a partir do 4º dia pós-inoculação (cepa Y) e do 7º dia pós-inoculação (cepa CL e Colombiana) na fase aguda da infecção. Já na fase crônica da infecção a avaliação para confirmação da infecção iniciou-se no 20º dia (cepa Y) e ocorreu até o 30º dia pós-infecção (cepa VL-10).

4.7.6.2 Ação do tratamento com as diferentes formulações

Para avaliar a ação dos diferentes tratamentos nos animais foram considerados os seguintes parâmetros.

4.7.6.3 Parasitemia (PAR)

A quantificação da parasitemia pelo exame de sangue a fresco do sangue periférico (ESF) dos animais infectados permitiu determinar a curva de parasitemia das cepas de *T. cruzi* antes, durante e após o tratamento na fase aguda da infecção (**Time Line**). Esta avaliação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brener (1962). A contagem dos parasitos teve início no 4º dia após inoculação nos animais inoculados com a cepa Y, e 7º dia nos inoculados com as cepas CL e Colombiana. O ESF foi realizado até que não fossem mais observados parasitos no sangue periférico por cinco dias consecutivos, ou até a morte dos camundongos. As curvas de parasitemia representaram as médias diárias dos parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental.

Em camundongos que apresentaram ESF negativo no 30º dia pós-tratamento (d.p.t) foi realizada a hemocultura (HC) sendo a coleta do sangue feita pela veia do plexo orbital segundo a metodologia de Filardi & Brener (1987). Para fazer a HC foi coletado um volume aproximadamente 0,5 mililitros (mL) de sangue do seio venoso retro-orbital. As amostras de sangue foram distribuídas em dois tubos de sedimentação contendo 3 mL de meio de cultura LIT (Camargo, 1964), incubadas a 28°C e homogeneizadas a cada 48h. Para detecção do parasito uma gota da hemocultura foi examinada ao microscópio óptico no 30º, 60º, 90º e 120º dias após cultivo (Time line fase aguda e crônica).

4.7.6.4 Sobrevida

A sobrevida dos animais foi avaliada diariamente e foi expressa em porcentagem.

4.7.7 Outros testes empregados no controle de cura

Todos os exames realizados como controle de cura foram feitos no Laboratório de Doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB).

4.7.7.1 Avaliações Parasitológicas

4.7.7.1.2 Hemocultura (HC)

As HC foram coletadas no 30º dia após tratamento nos animais em que a parasitemia foi subpatente (ESF negativo), em tratamentos realizados tanto na fase aguda quanto crônica empregando a metodologia de Filardi & Brener (1987).

4.7.7.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em amostras de sangue coletadas pelo plexo venoso orbital. Na fase aguda da infecção as coletas foram realizadas 30, 60 e 120 dias pós-tratamento, enquanto na fase crônica da infecção foram realizadas, 60 e 120 dias pós-tratamento. Assim, um volume de 300 µL de sangue foi coletado e conservado em solução de cloridrato de guanidina (Guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodietildinitrotetracético (EDTA) 0,2M/ pH 8,0 (1:1) como descrito por Ávila *et al.* (1991). Após sete dias as amostras foram fervidas por 10 minutos para desnaturação do DNA e homogeneização da amostra (Ávila *et al.* 1991).Resumidamente, a partir de 100 µL do lisado de sangue, mantido a temperatura ambiente, o DNA foi extraído utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega®). A PCR foi processada de acordo com o protocolo de Gomes *et al.* (1998) modificada utilizando a enzima Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), os iniciadores S35 (5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA3') e S36 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA3') (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) descritos por Ávila *et al.* (1991). A mistura foi coberta com duas gotas de óleo mineral para evitar evaporação e a amplificação foi processada em um termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA). O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelado utilizando a coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993). Controles positivos, negativos e de reagentes foram incluídos em cada um dos ensaios realizados.

4.7.7.2 Avaliação sorológica

4.7.7.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

A reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* foi realizada segundo a metodologia de Voller *et al.* (1976) modificada e padronizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP. Nos animais tratados na fase aguda da infecção, as coletas de soro foram feitas com 90 e 180 dias pós-tratamento, já para os animais tratados na fase crônica da infecção as coletas de soro foram feitas com 90 e 180 dias para cepa Y e ainda, com 90, 180 e 360 dias pós-tratamento para cepa VL-10.

Para a realização da reação foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com 100 µL/poço de antígeno diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas por 12 horas a 4°C.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução salina contendo Tween-20 a 0,05% (solução de lavagem) para eliminação da solução diluente do antígeno e de seu excesso. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de solução salina tamponada (SST) com soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C por 45 minutos. Após esta etapa, elas foram lavadas três vezes com a solução de lavagem. A seguir, as placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C com 100µL/poço das amostras de soros diluídas a 1:80. Após a incubação, elas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos a 37°C com 100µL/poço do conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído a 1:2500 (SIGMA, St. Louis, EUA) em solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20 (SST-Tween). Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem e adicionadas solução de substrato constituída por orto-fenileno-diamino (OPD), H₂O₂ e tampão citrato-fosfato e incubadas a 37°C, durante 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 32 µL/poço de H₂SO₄ 2,5 M.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (SOFT-MAX® PRO 4.0-Life Sciences edition) com filtro a 490 nm. As amostras contendo valores de absorbância iguais ou superiores ao ponto de corte (média das absorbâncias de 10 soros padrões não reativos mais duas vezes o desvio padrão) foram consideradas reativas, e as que apresentaram valores de absorbância abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas.

4.7.8 Critério de cura

Seguindo o critério de cura clássico empregado para humanos (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005) a susceptibilidade ou resistência aos tratamentos foi definida de acordo com os resultados obtidos pelo conjunto de métodos parasitológicos e sorológicos. Foram

considerados curados aqueles animais que apresentaram simultaneamente negatividade em todos os testes parasitológicos (ESF, HC, PCR, parasitismo tecidual) e sorológico (ELISA).

Um índice de cura foi calculado para cada grupo de infecção experimental e em cada esquema de tratamento empregado, considerando a porcentagem dos animais tratados curados.

Uma vez determinados os índices de cura, as cepas de *T. cruzi* estudadas foram classificadas segundo o critério de Filardi & Brener (1987) modificado por Toledo *et al.* (2003) em: resistentes (índice de cura $\leq 33\%$), parcialmente resistentes ($33\% < \text{índice de cura} < 66\%$) e susceptíveis (índice de cura $\geq 66\%$) ao esquema de tratamento empregado.

4.8 Análise estatística

A área sob a curva de parasitemia foi analisada empregando o programa Prisma for Windows, versão 5.0. O teste de normalidade Kolmogorov-Sminorv foi realizado. Para os grupos tratados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à avaliação pela ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. Aqueles resultados que não apresentaram, distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico Mann Whitney. A análise de sobrevida entre os grupos experimentais foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier log rank. As diferenças foram consideradas como significativas quando o nível de significância foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

5.0 Resultados

Parte I: Obtenção da licnofolida, preparação de nanocápsulas com licnofolida e caracterização físico-química das nanocápsulas com licnofolida

5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas: Tamanho e índice de polidispersão

Todo fracionamento cromatográfico para isolamento da licnofolida (LIC) a partir do extrato etanólico bruto, bem como a caracterização da LIC está descrito em Branquinho *et al.* (2014 a), Saúde-Guimarães *et al.* (2014) e no depósito da patente no INPI (número: PII1063025) também requerida no “World International Patent Office” sob o número PCTBR/2012/000399 patente nº WO/2013/05989 (Branquinho *et al.*, 2013).

As nanocápsulas (NC) apresentaram-se com um aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas. O tamanho, índice de polidispersão, microscopia por força atômica (MFA), potencial zeta das NC, contendo diferentes concentrações da LIC (2-4 mg/mL) e NC branca foram avaliados e os resultados encontram-se na **Tabela 8**.

Tabela 8: Características físico-químicas de formulações de nanocápsulas de PCL e PLA-PEG contendo licnofolida nas concentrações de 2-4 mg/mL.

Formulações NC	LIC (mg/mL)	Tamanho médio± DP (nm)	Índice de polidispersão (IP) ^a	Tamanho médio± DP (nm) ^b (MFA)	potential ζ ± DP (mV) ^c
PCL NC	0,0	175,4 ± 14,1	0,140 ± 0,05	214,9 ± 22,4	-47,3 ± 3,6
	2,0	182,5 ± 3,2	0,103 ± 0,05	220,1 ± 31,4	-42,7 ± 4,4
	3,0	213,9 ± 6,2*	0,203 ± 0,02	298,9 ± 49,1*	-52,8 ± 2,1
	4,0	245,2 ± 9,6*	0,220 ± 0,04	312,6 ± 68,7*	-57,1 ± 2,2*
PLA-PEG NC	0,0	109,4 ± 7,1	0,080 ± 0,01	120,3 ± 27,9	-30,3 ± 4,1
	2,0	105,2 ± 6,9	0,100 ± 0,04	129,9 ± 33,7	-37,2 ± 7,3
	3,0	137,9 ± 11,2*	0,133 ± 0,07	149,7 ± 54,2	-42,8 ± 4,0
	4,0	159,2 ± 7,6*	0,190 ± 0,09	333,1 ± 77,1*	-40,1 ± 2,2

DP: Desvio padrão ($n=3$). ^aAmostras monodispersas com índice de polidispersão ($IP < 0.3$), ^bdesvio padrão ($n=20$), ^c $n=3$ medida após diluição 1:1000 em solução 1 mM de NaCl. *Indicam resultados estatisticamente diferentes em relação às NC brancas ($P \leq 0,05$).

O tamanho médio das diferentes concentrações da LIC nas NC de PCL (LIC-PCL NC) (**Tabela 8**), analisadas por ECF (espectroscopia de correlação de fótons) foi significativamente diferente ($P \leq 0,05$) nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg/mL da LIC, em relação a NC branca, mas não

houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a formulação contendo 2,0 mg/mL da LIC e NC branca. Além disso, o tamanho das partículas aumenta quando aumentam as concentrações da LIC associadas com o sistema. Todas as concentrações da LIC associadas às NC foram monodispersas, considerando IP (índice de polidispersão) menor 0,3. Os valores de potencial zeta foram significativamente modificados ($P\leq 0,05$) pela incorporação da LIC em NC na concentração de 4,0 mg/mL de LIC em relação a NC branca. Tanto as NC brancas quanto as LIC-PCL NC tem uma carga negativa, variando de -42,7 a -57,1 mV (**Tabela 8**).

O tamanho médio das diferentes concentrações da LIC nas NC de PLA-PEG (LIC-PLA-PEG NC) (**Tabela 8**) avaliadas por ECF foi significativamente diferente ($P\leq 0,05$) nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg/mL da LIC em relação a NC branca, mas não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a formulação contendo 2,0 mg/mL da LIC em comparação com a NC branca. Todas as concentrações contendo LIC (LIC-PLA-PEG NC) foram monodispersas, considerando IP menor 0,3. Os valores de potencial zeta não foram significativamente ($P>0,05$), modificados pela incorporação da LIC em NC. Tanto as NC brancas quanto as LIC-PLA-PEG NC tem uma carga negativa, variando de -30,3 a -42,8 mV (**Tabela 8**).

A morfologia das nanopartículas (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) foi analisada por MFA (microscopia de força atômica). As formulações de NC apresentaram uma forma esférica nas imagens MFA (**Figura 13 A, B, C, D, E, F**). A LIC-PCL NC (**Figura 13 A-C**) as amostras mostraram-se polidispersas e heterogêneas, quando comparada com LIC-PEG-PLA NC (**Figura 13 D-F**), isto se deve provavelmente a presença de poloxamer. Entretanto a formulação de PLA-PEG NC, pela ausência do poloxamer as amostras mostraram-se mais homogênea e monodispersa. Na imagem de fase das duas formulações (**Figura 13 C e F**), observou-se que a natureza da amostra em termos de textura é diferente, o que indica que a estrutura das partículas também é diferente.

As análises indicam que os tamanhos por MFA das formulações LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC aumentaram com o aumento das concentrações da LIC (214,9-312,6 na LIC-PCL NC) e (120,3-333,1 na LIC-PLA-PEG NC) (**Tabela 8**). No entanto, o tamanho médio das diferentes formulações da LIC-PCL NC não foi significativamente ($P>0,05$) afetado pela concentração de 2,0 mg/mL da LIC em comparação com NC branca, porém houve diferença significativa ($P\leq 0,05$) entre as formulações contendo 3,0 e 4,0 mg/mL LIC e a NC branca. O tamanho das diferentes formulações da LIC-PLA-PEG NC (**Tabela 8**) foi significativamente ($P\leq 0,05$) afetado pela concentração de 4,0 mg/mL da LIC, em relação a NC branca, mas não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as formulações contendo 3,0 e 4,0 mg/mL LIC e NC branca. Além disso, os tamanhos determinados pela MFA foram maiores do que aqueles determinados pelo ECF nos dois tipos de NC com LIC (LIC-PCL e LIC-PLA-PEG).

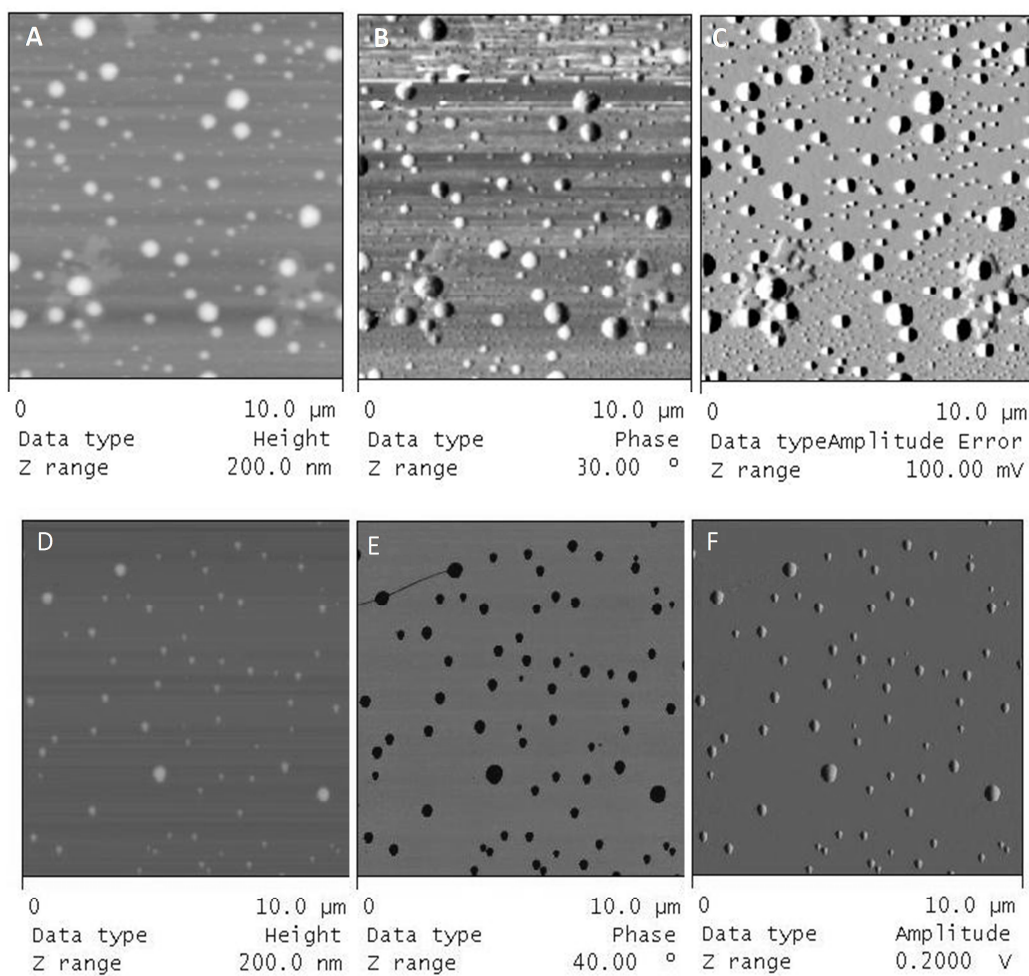


Figura 12: Imagens de microscopia de força atômica: (A e D) de altura, (B e E) de fase e de (C e F) de amplitude das formulações LIC-PCL NC (imagens superiores) e da LIC-PLA-PEG NC (imagens inferiores) mostrando nanoestruturas esféricas.

5.2 Validação de metodologia analítica para quantificação da licnofolida nas nanocápsulas poliméricas.

A metodologia analítica para quantificação da LIC nas NC poliméricas foi uma adaptação da metodologia já previamente desenvolvida e validada por Branquinho *et al.* (2014 a). As adaptações foram feitas com intuito de reduzir do tempo de retenção da LIC, e por consequência diminuir o consumo de solvente. Além disso, o detector ultravioleta (UV) apresenta maior sensibilidade em relação ao detector arranjo diodos (DAD), utilizado por Branquinho *et al.* (2014 a), diminuindo os limites de quantificação e detecção.

A **Figura 13** demonstra através do cromatograma, que no comprimento de onda de 267 nm a absorvância da substância não sofre interferência dos outros constituintes das NC no tempo de retenção da LIC, aproximadamente aos 3,0 minutos. O método foi utilizado para o doseamento da LIC na presença e na ausência dos outros constituintes das NC, sem que o resultado sofresse interferências.

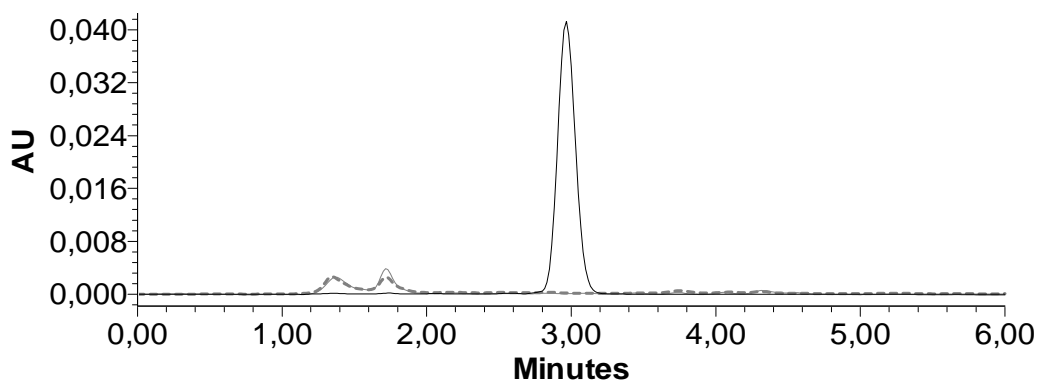


Figura 13: Perfil cromatográfico das nanocápsulas de PCL (-----) e PLA-PEG (—) e licnofolida após dissolução em acetonitrila.

A curva padrão da LIC com detecção por UV, construída a partir das médias da área sob a curva dos picos referentes à LIC nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 20,0; 40,0; 50,0 $\mu\text{g/mL}$ pode observar uma correlação linear entre a concentração da LIC pela área. A equação da reta foi $y = 35929x - 129,4$, e o coeficiente de correlação linear ($r^2 = 0,999$).

A **Tabela 9** mostra os resultados de precisão (intra-dia e inter-dia) e exatidão (intra-dia e inter-dia) da quantificação da LIC cujas médias nas amostras de controle de qualidade baixa, média e alta estão resumidas na **Tabela 9**.

Tabela 9: Precisão e Exatidão da licnofolida determinadas por método analítico.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Precisão (CV %)		Exatidão (%)	
		Intra-dia ^a	Inter-dia ^b	Intra-dia ^a	Inter-dia ^b
CQB	1,0	0,28	1,59	100,35	99,59
CQM	7,5	1,08	1,34	101,28	100,32
CQA	40,0	0,99	1,68	99,49	100,75

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto, CV: coeficiente de variação, ^a $n=5$, ^b $n=10$.

Para determinar a precisão e exatidão intra-dia da LIC, foram utilizadas cinco réplicas ($n=5$) para cada uma das três concentrações (1,0 7,5 e 40,0 $\mu\text{g/ml}$) da LIC. Os valores médios de precisão intra-dia para as concentrações da LIC variaram de 0,28-1,08%, e os valores de precisão inter-dia variaram de 1,34% e 1,68%. Todos os valores estão abaixo de 2% e de acordo com o critério de aceitação estabelecido o Guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005). A exatidão intra-dia para as concentrações da LIC variaram de 99,49-101,28% e a exatidão inter-dia variaram de 99,59-100,75%, e os valores encontram-se dentro do limite especificado pelo ICH (2005) que é de 95 a 105%. O limite de detecção da LIC foi de

0,01µg/mL. O limite de quantificação da LIC foi de 0,5 µg/mL. Os valores de precisão e exatidão foram de 3,88 e 99,42%, respectivamente da LIC (**Tabela 9**).

5.2.1 Aplicação da metodologia analítica: Porcentagem de encapsulação e Eficiência de encapsulação da licnofolida

A quantificação da LIC associado à NC (PCL NC e PLA-PEG NC) foi aplicada ao estudo de porcentagem e eficiência de encapsulação e estão apresentados na **Tabela 10**. Foi observada elevada porcentagem de encapsulação, de 97,8 a 100%, das formulações da LIC-PCL NC e de, 90,8 a 99,8%, das formulações da LIC-PLA-PEG NC. Em relação à eficiência de encapsulação, as formulações da LIC-PCL NC apresentaram elevados valores (89,6 a 93,7) e as formulações da LIC-PLA-PEG NC (87,2 a 97,7%). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações da LIC para as duas formulações, tanto para os valores de porcentagem de encapsulação quanto para eficiência de encapsulação.

Tabela 10: Avaliação da porcentagem e eficiência de encapsulação de formulações de nanocápsulas de PCL e PLA-PEG contendo licnofolida nas concentrações de 2-4 mg/mL.

Formulações de NC	LIC (mg/mL)	Porcentagem de encapsulação ± DP	Eficiência de encapsulação ± DP (%)
PCL NC	0	-	-
	2,0	100 ± 1,2	93,7 ± 1,1
	3,0	97,8 ± 1,9	89,6 ± 1,4
	4,0	99,3 ± 2,3	93,2 ± 2,2
	0	-	-
PLA-PEG NC	2,0	99,8 ± 1,4	97,7 ± 2,5
	3,0	95,9 ± 2,2	93,6 ± 1,3
	4,0	90,8 ± 1,2	87,2 ± 1,5
	0	-	-

DP: Desvio Padrão ($n=3$). Análise estatística por ANOVA.

5.3. Estudo da estabilidade física (tamanho e teor) das nanocápsulas contendo licnofolida em função do tempo

A estabilidade da LIC em formulações de NC com polímeros de PCL e PLA-PEG foi avaliada por um período de até seis meses quando armazenadas à temperatura de 4°C. Os resultados encontrados estão apresentados nas **Figuras 14 (A e B) e 15 (A e B)**.

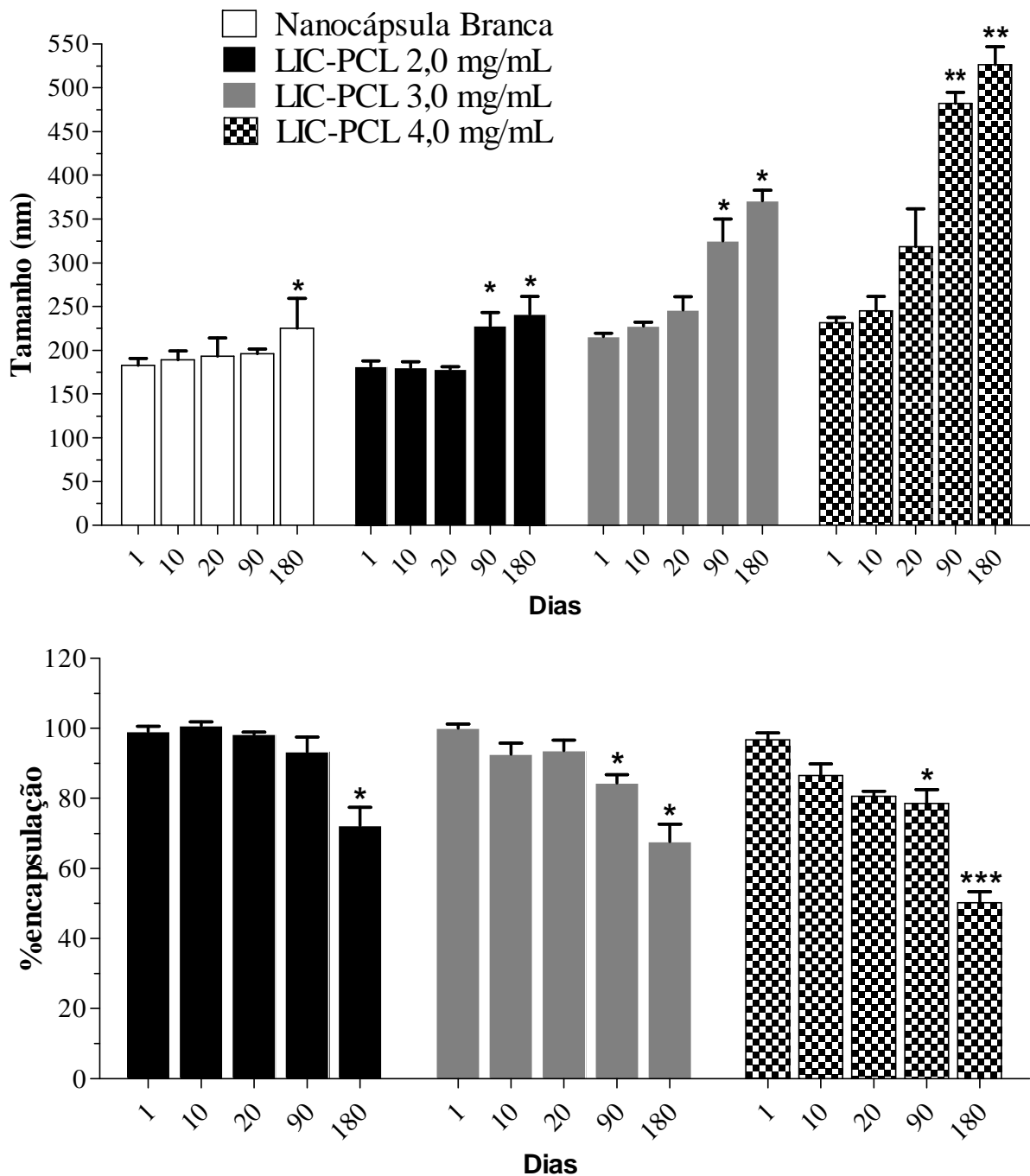


Figura 14: A) Estabilidade em relação ao tamanho de nanocápsulas de licnofolida (LIC-PCL NC). B) Estabilidade em relação à porcentagem de encapsulação das nanocápsulas de licnofolida (LIC-PCL NC) após seis meses de armazenamento a 4°C.

*Indica $0,01 \leq P < 0,05$; ** indica $0,001 \leq P < 0,01$; indica $P < 0,001$ diferença estatística comparada ao dia1. $n = 3$ amostras/concentração. Média \pm erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA.

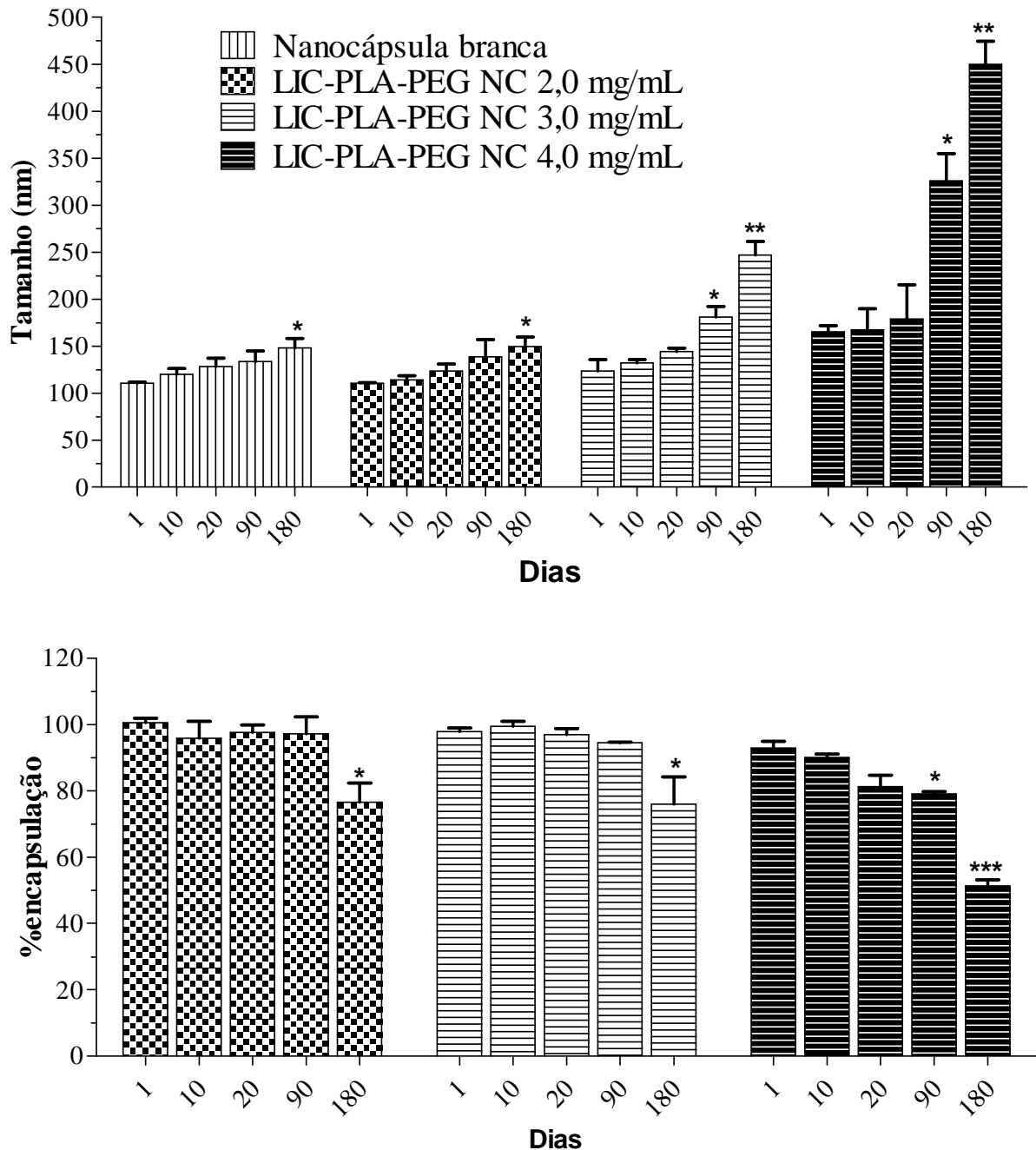


Figura 15: A) Estabilidade em relação ao tamanho de nanocápsulas de licnofolida (LIC-PLA-PEG NC). B) Estabilidade em relação à porcentagem de encapsulação das nanocápsulas de licnofolida (LIC-PLA-PEG NC) após seis meses de armazenamento a 4°C.

*Indica $0,01 \leq P < 0,05$; ** indica $0,001 \leq P < 0,01$; indica $P < 0,001$ diferença estatística comparada ao dia. $n = 3$ amostras/concentração. Média \pm erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA

No estudo de estabilidade, as formulações da LIC-PCL NC, mantiveram o tamanho próximo do tamanho inicial (dia 1) com um aumento significativo nas concentrações de 2,0, 3,0 e 4,0 mg/mL em 90 dias e 180 dias, em comparação com o primeiro dia. Já a NC branca apresentou um aumento significativo de tamanho somente em 180 dias (**Figura 14 A**). Em relação à % de encapsulação da LIC-PCL NC, houve uma redução significativa na quantidade da substância na concentração de 2,0

mg/mL da LIC após 180 dias e nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg/mL da LIC após 90 dias e 180 dias (**Figura 14 B**).

Os tamanhos das formulações da LIC-PLA-PEG NC foram menores em relação às formulações LIC-PCL NC. Para NC furtivas houve um aumento significativo no tamanho nas concentrações de 2,0 mg/mL da LIC em 180 dias e nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg/mL em 90 e 180 dias em comparação com o primeiro dia (**Figura 15 A**). Em relação % de encapsulação da LIC-PLA-PEG NC, houve uma redução significativa na quantidade da substância nas concentrações de 2,0, 3,0 mg/mL em 180 dias e 4,0 mg/mL em 90 dias e 180 dias a partir do primeiro dia (**Figura 15 B**).

5.3.1 Fotomicrografias das nanocápsulas com licnofolida

As fotomicrografias realizadas em Microscópio Óptico das formulações da LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC, na concentração de 4,0 mg/mL, a fim de visualizar cristais da LIC nas formulações em que havia agregado aparente (**Figura 16**). Foi possível observar estruturas semelhantes a cristais, que foram atribuídas à LIC. A imagem A representa a LIC-PLA-PEG NC na qual se observa cristais refringentes à esquerda e à direita da imagem, além de alguns agregados de nanopartículas. Na imagem B, que representa a LIC-PCL NC, nota-se ao centro um grande agregado de cristais atribuído à LIC e vários agregados de nanopartículas por toda a extensão da lâmina.

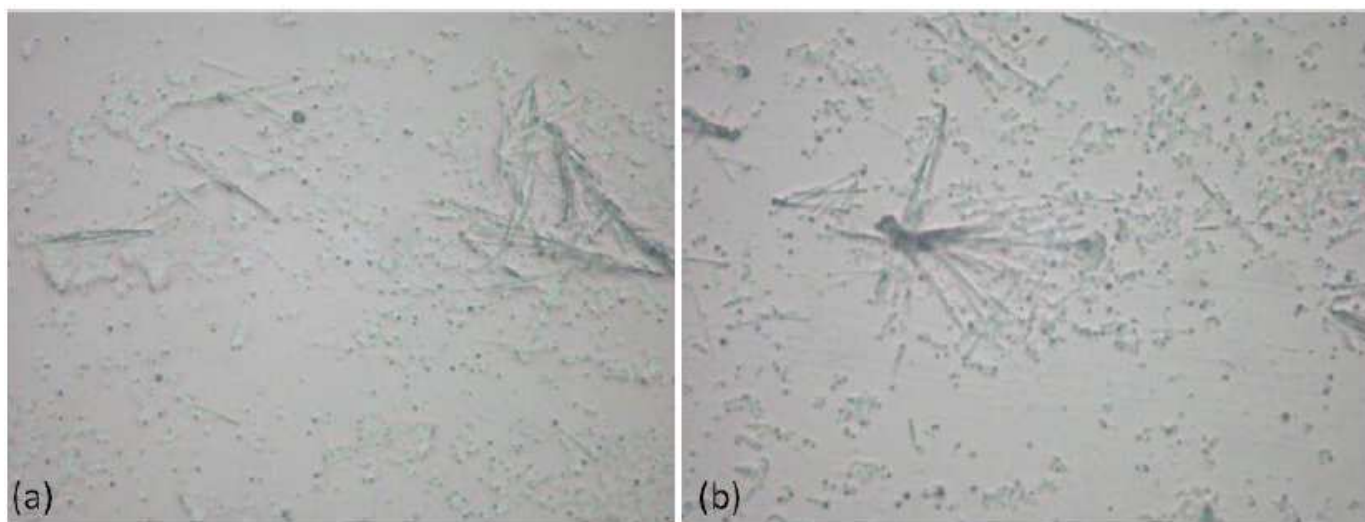


Figura 16: Fotomicrografia de nanocápsulas (a) LIC-PLA-PEG NC e (b) LIC-PCL NC.

Parte II: Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo

5.4 Desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação da licnofolida

5.4.1 Condições cromatográficas

O melhor desempenho na separação dos analitos constituiu na utilização da fase móvel composta por mistura de ACN e água na proporção 70:30 (v/v), sob fluxo de 1,0 mL por minuto, a uma temperatura de 30°C e volume de injeção de 25 µL da amostra processada. O comprimento de onda empregado no detector UV foi 267 nm, o tempo de retenção da LIC- padrão analítico (PA) foi 2,946 min. e do ITZ padrão interno (PI) foi de 4,499 min como demonstrado na **Figura 17**.

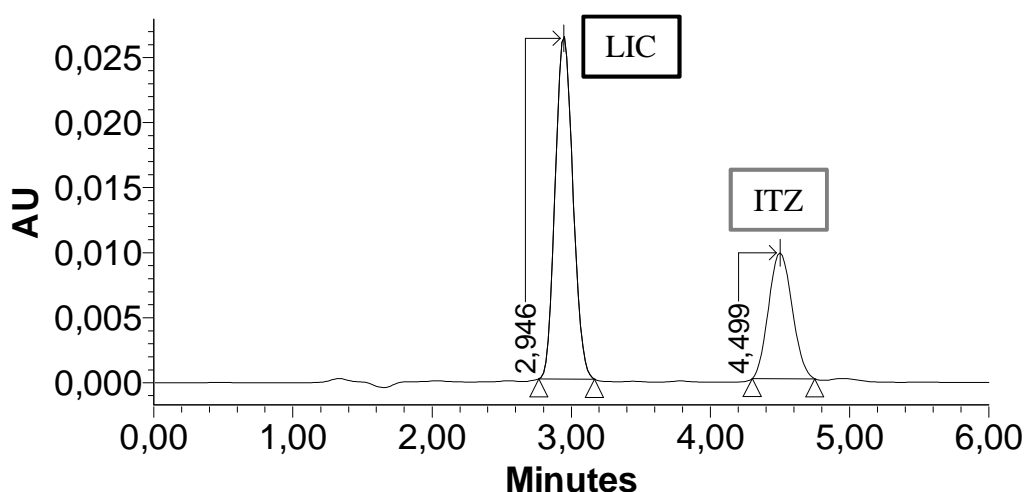


Figura 17: Cromatograma da licnofolida e PI (itraconazol) nas concentrações de 10,0 µg/mL e 2,5 µg/mL no comprimento de onda de 267 nm em detector ultravioleta, empregando como fase móvel acetonitrila:água na proporção 70:30 (v/v), fluxo de 1,0 mL/min., e temperatura de 30°C.

5.4.2 Purificação das amostras de plasma de camundongos para quantificação da licnofolida

O procedimento de purificação das amostras de plasma de animais que apresentou a melhor recuperação dos padrões analíticos foi realizado através da extração de proteínas, utilizando 1,0 mL de ACN. As amostras foram agitadas em vortex por 2 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 300×g. A fase orgânica acumulada foi filtrada em unidade HV Millex com membrana Millipore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. O filtrado foi evaporado sob vácuo até seca e o resíduo foi reconstituído em 1,0 mL de fase móvel para ser analisada pelo método cromatográfico desenvolvido.

5.4.3 Validação do método para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo

5.4.3.1 Especificidade

O método desenvolvido apresentou boa separação dos analitos (LIC) entre si e entre estes e os componentes do plasma branco e hemolisado. Os sinais cromatográficos referentes ao LIC e ITZ (PI) apresentaram adequada resolução (**Figura 18**).

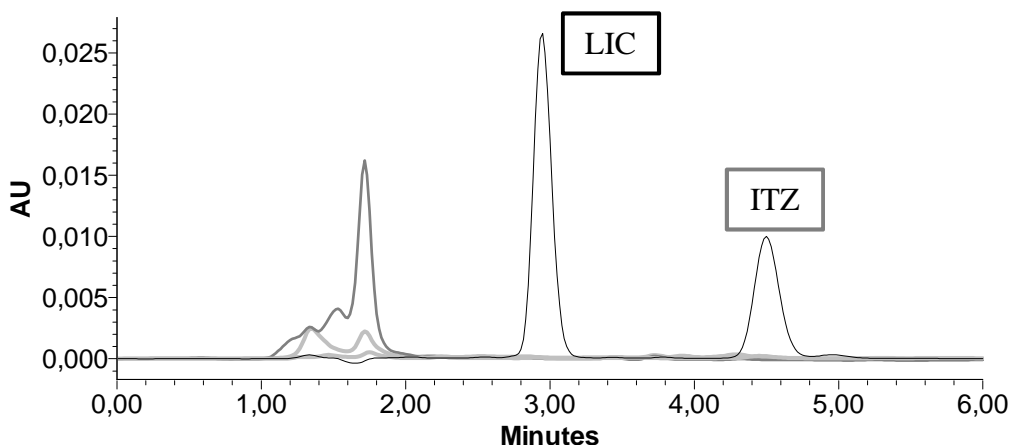


Figura 18: Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostras de plasma branco (linha cinza claro - 2 amostras) e plasma hemolisado (cinza escuro) obtidos de animais saudáveis sem a administração da LIC, comparado ao perfil cromatográfico do PA: LIC na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e do seu PI: ITZ na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, nas condições cromatográficas desenvolvidas para quantificação.

5.4.3.2 Recuperação

Foram avaliados diversos métodos de extração da LIC em plasma de camundongos para verificar o que apresentou o melhor percentual de recuperação da LIC. Os resultados estão mostrados na **Tabela 11**. O método de extração escolhido foi o de precipitação de proteínas do plasma utilizando 1000 μL de ACN por ser o que apresentou a maior porcentagem de recuperação da LIC em plasma (100%) (**Tabela 11**).

Tabela 11: Testes de recuperação da licnofolida em plasma de camundongo.

Método de extração	Solvente	Volume do solvente (μL)	Agitação (min)	% Recuperação
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	1	60,5
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	5	65,81
Líquido-líquido	Acetato de etila	300	10	95,02
Precipitação de proteínas	Acetonitrila	500	2	98,26
Precipitação de proteínas	Acetonitrila	1000	2	100,02
Precipitação de proteínas	Metanol	500	2	95,8
Precipitação de proteínas	Metanol	1000	2	92,53

O padrão-interno utilizado no presente trabalho foi ITZ que apresentou adequadas sensibilidade, seletividade e elevada % de recuperação em amostras de plasma de camundongo como demonstrado na **Figura 18**.

Tabela 12: Recuperação média ($n=6$) do procedimento de purificação das amostras de plasma de controle de qualidade adicionadas da licnofolida (PA) e itraconazol (PI).

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)	
	LIC	LIC (CV %)	PI (CV %)
CQB	1,0	110,94 (5,89)	97,62 (3,62)
CQM	5,0	100,65 (3,80)	100,26 (4,26)
CMQ	7,5	97,67 (6,96)	97,60 (1,80)
	Média ($\mu\text{g/ml}$)	103,08	98,49
	DP ($\mu\text{g/mL}$)	6,96	1,53
	CV (%)	6,75	1,55

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto, DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação, PI: padrão interno.

As recuperações médias do procedimento de purificação de amostras de plasma de controle de qualidade foram de 103,08% e 98,49 % da LIC e PI, respectivamente (**Tabela 12**).

5.4.3.3 Linearidade

Foi obtida correlação linear entre concentração da substância e resposta do método na faixa de concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ da LIC em plasma. A **Figura 19** apresenta a curva de calibração definida no método que atende os critérios de aceitação estabelecidos nos guias de

validação publicados por agências reguladoras oficiais (Brasil, 2003; FDA, 2001), ou seja, coeficiente de variação menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações. Além disso, o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98.

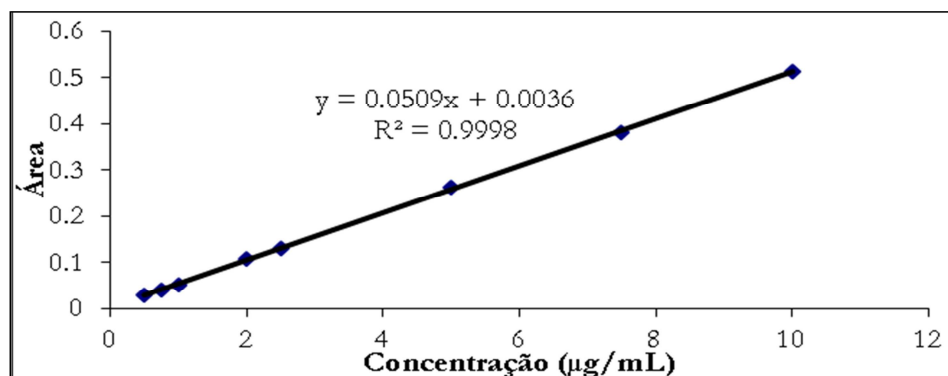


Figura 19: Curva de calibração do método analítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo por cromatografia líquido de alta eficiência utilizando acetonitrila:água na proporção de 70:30 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 30°C.

5.4.3.4 Precisão

Este parâmetro foi determinado analisando-se amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes e em seis réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias consecutivos (precisão inter-dias). A precisão do método esteve entre 1,71% e 5,84% para amostras de plasma analisadas no mesmo dia (intra-ensaio) e entre 2,57% e 6,45% para amostras analisadas em dias diferentes (inter-ensaios). Os resultados estão apresentados na **Tabela 13**.

5.4.3.5 Exatidão

A exatidão foi determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em seis repetições em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias diferentes (exatidão inter-dia).

Todas as amostras de controle de qualidade em plasma adicionadas da LIC apresentaram desvios em relação aos valores nominais menores que 15%. A exatidão do método para amostras analisadas no mesmo dia variou de 92,09% a 102,06% e nas amostras analisadas em diferentes dias variou de 95,88% a 99,42%. Os resultados estão resumidos na **Tabela 13**.

Tabela 13: Precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método analítico para quantificação da licnofolida em plasma de camundongo.

Concentração LIC ($\mu\text{g/ml}$)		Precisão (CV %)		Exatidão (%)	
		Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
CQB	1,0	1,71	2,57	93,10	97,44
CQM	5,0	5,84	6,45	92,09	95,88
CQA	7,5	2,17	4,45	102,06	99,42

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto, DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação. Os resultados expressam a média da análise de seis amostras, durante três dias.

5.4.3.6 Limite de quantificação e limite de detecção da licnofolida no plasma

O limite de quantificação da LIC foi de $0,5 \mu\text{g/mL}$, com precisão e exatidão de 0,065% e 109,45%, respectivamente, para o plasma, valores estes adquiridos a partir da curva de linearidade para o plasma. O limite de detecção foi de $0,025 \mu\text{g/mL}$.

5.4.3.7 Estabilidade da licnofolida

Conforme recomendado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (US Food and Drug Administration, 2001), foram determinadas as estabilidades descritas a seguir.

5.4.3.7.1 Estabilidade de curta duração da licnofolida

Os resultados foram comparados com amostras descongeladas e imediatamente analisadas. Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração mostraram que as amostras de plasma de controle de qualidade mantidas à temperatura ambiente por 4 horas mantiveram-se estáveis (Tabela 14).

Tabela 14: Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma ($n=6$), analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.

	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente		
		Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
		CQB	1,0	0,96	2,01	104,96	1,02
CQM	5,0	4,98	3,06	102,11	5,76	3,84	101,81
CQA	7,5	7,41	4,07	96,99	7,97	8,29	99,53

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto, CV: coeficiente de variação.

5.4.3.7.2 Estabilidade da licnofolida em ciclos de congelamento e descongelamento

A avaliação dos resultados da estabilidade da LIC das amostras de plasma de controle de qualidade avaliadas por três ciclos de congelamento e descongelamento mostrou que estas se mantiveram estáveis (**Tabelas 15**).

Tabela 15: Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma de camundongo ($n=6$) mantidas à temperatura de -20°C e submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.

Ciclos		Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas		
			Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
			1	CQB	1,0	0,96	2,01	103,59
	CQM	5,0	4,98	3,06	99,09	5,52	3,62	110,11
	CQA	7,5	7,41	4,07	98,86	7,75	3,67	100,72
2	CQB	1,0	0,96	2,01	103,59	1,23	13,44	95,99
	CQM	5,0	4,98	3,06	99,09	5,04	11,77	105,65
	CQA	7,5	7,41	4,07	98,86	7,17	2,80	107,61
3	CQB	1,0	0,96	2,01	103,59	1,40	10,81	98,74
	CQM	5,0	4,98	3,06	99,09	5,34	6,01	107,83
	CQA	7,5	7,41	4,07	98,86	7,10	9,19	100,12

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

5.4.3.7.3 Estabilidade pós-processamento da licnofolida

Foi avaliada a estabilidade pós-processamento por 48 horas à temperatura ambiente e os resultados mostram que as amostras foram capazes de se manter estáveis durante o período de análise pelo auto-injetor na CLAE-UV (**Tabelas 16**).

Tabela 16: Estabilidade da licnofolida em amostras de plasma de camundongo ($n=6$) mantidas à temperatura de 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.

	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras analisadas 48 após extração		
		Concentração	Precisão	Exatidão	Concentração	Precisão	Exatidão
		Real ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	Real ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)
CQB	1,0	0,96	2,01	103,59	1,33	9,34	101,57
CQM	5,0	4,98	3,06	99,09	5,64	4,23	103,35
CQA	7,5	7,41	4,07	98,86	7,07	2,05	105,41

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

5.4.3.7.4 Estabilidade de longa duração da licnofolida

As amostras de plasma de controle de qualidade contendo LIC, armazenadas a -20°C , mantiveram-se estáveis por dois meses (**Tabela 17**).

Tabela 17: Estabilidade da LIC em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a -20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo.

	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas		
		Concentração	Precisão	Exatidão	Concentração	Precisão	Exatidão
		Real ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	Real ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)
CQB	1,0	0,96	2,01	103,59	0,94	1,56	94,30
CQM	5,0	4,98	3,06	99,09	3,17	6,02	92,67
CQA	7,5	7,41	4,07	98,86	7,17	4,68	97,56

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Parte III: Estudo farmacocinético da licnofolida administrada a camundongos tratados com diferentes formulações de nanocápsulas

5.5 Quantificação da licnofolida nas amostras de plasma de camundongos

Na **Tabela 18** estão representados os parâmetros farmacocinéticos obtidos das curvas de concentração plasmática em função do tempo, após administração de dose única de 12-13,3 mg da LIC, com quantificação da LIC até 720 min (12 horas).

Tabela 18: Parâmetros farmacocinéticos após administração intravenosa (*bolus*) da licnofolida (12-13,3 mg/kg) em diferentes formulações

Parâmetros farmacocinéticos	Formulações		
	LIC livre	LIC-PCL NC	LIC-PLA-PEG NC
ASC ₀₋₇₂₀ (µg. min/mL)	304,17	2380,20	3714,67
ASC _{0-∞} (µg.min/mL)	354,78	2648,07	5051,28
ASMC ₀₋₇₂₀ (µg.min ² /mL)	6088,26	51244,99	868745,34
AUMC _{0-∞} (µg.min ² /mL)	20655,80	153529,07	886382,60
TMR ₀₋₇₂₀ (min)	20,0	215,29	233,86
Clearance (mL/min)	320,0	4,72	2,58
V _d (mL)	1398,08	303,13	227,33
ke (min ⁻¹)	0,027	0,015	0,011
t _{1/2} (min)	25,0	45,0	62,0

Parâmetros calculados usando análise não compartimental para administração intravenosa em *bolus*. A concentração de LIC livre e em NC administrada foi de 12,0-13,3 mg/mL.

ASC₀₋₇₂₀: área sob a curva até 720 min., ASC_{0-∞}: área sob a curva extrapolada ao infinito, ASMC₀₋₇₂₀: área sob a curva no primeiro momento até 720 min., ASMC_{0-∞}: área sob a curva no primeiro momento extrapolada, TMR: tempo médio de residência, V_d: volume de distribuição, ke: constante de eliminação plasmática de primeira ordem, t_{1/2}: tempo de meia-vida de eliminação plasmática.

A análise dos parâmetros farmacocinético da LIC encapsulada em NC PCL mostrou um aumento de 7,82 vezes na ASC, em relação à LIC livre (**Tabela 18**). Houve também um aumento na ASC_{0-∞}, ASMC_{0-t}, ASMC_{0-∞} da LIC-PCL NC em relação à LIC livre. O TMR₀₋₇₂₀ da LIC-PCL NC também aumentou na ordem de 10,8 vezes em relação à LIC livre. O t_{1/2} da LIC-PCL NC foi 1,80 vezes maior em relação à LIC livre. O V_d de LIC foi reduzido 4,6 vezes com a associação às NC PCL. Houve também diminuição do Cl (67,8 vezes) e da constante de eliminação (ke) com esta mesma formulação (**Tabela 18**).

Após administração intravenosa da LIC em PLA-PEG NC houve um aumento de 12,21 vezes na ASC_{0-t} em relação à LIC livre. Houve também aumento nos parâmetros $ASC_{0-\infty}$, $ASMC_{0-t}$, $ASMC_{0-\infty}$ da LIC-PLA-PEG NC, em relação à LIC livre. O TMR_{0-720} da LIC-PLA-PEG NC aumentou 11,7 vezes, em comparação à LIC livre. Entretanto, o V_d da LIC foi reduzido 6,15 vezes na LIC-PLA-PEG NC. Além disso, o valor do $t_{1/2}$ da LIC-PLA-PEG NC foi 2,5 vezes maior em relação à LIC livre. Adicionalmente, a depuração ou clearance (Cl) da LIC a partir da administração de NC de PLA-PEG foi reduzida 124,03 vezes. A constante de eliminação (ke) também foi reduzida 2,45 vezes pelo uso de NC PLA-PEG (**Tabela 18**).

Por fim, comparou-se o perfil farmacocinético entre as duas formulações encapsuladas (LIC-PLA-PEG NC e LIC-PCL NC) (**Tabela 18**). Houve um aumento de 1,56 vezes na ASC_{0-t} da LIC-PLA-PEG NC em relação à LIC-PCL NC. Houve ainda aumento nos parâmetros $ASC_{0-\infty}$, $ASMC_{0-t}$, $ASMC_{0-\infty}$ da LIC-PLA-PEG NC, em relação à LIC-PCL NC. O mesmo aconteceu no $t_{1/2}$ da LIC-PLA-PEG NC que foi 1,88 vezes maior em relação à LIC-PCL NC. Ocorreu ainda, uma redução da depuração (Cl) da LIC com o uso de NC de PLA-PEG em relação às NC de PCL (1,82 vezes maior).

A **Figura 20** mostra as curvas da concentração plasmática *versus* tempo da licnofolida nas três diferentes formulações, após administração intravenosa de 12,0- 13,3 mg/kg de peso corporal. Foram utilizados o plasma de seis camundongos por tempo para construção da curva média para cada formulação.

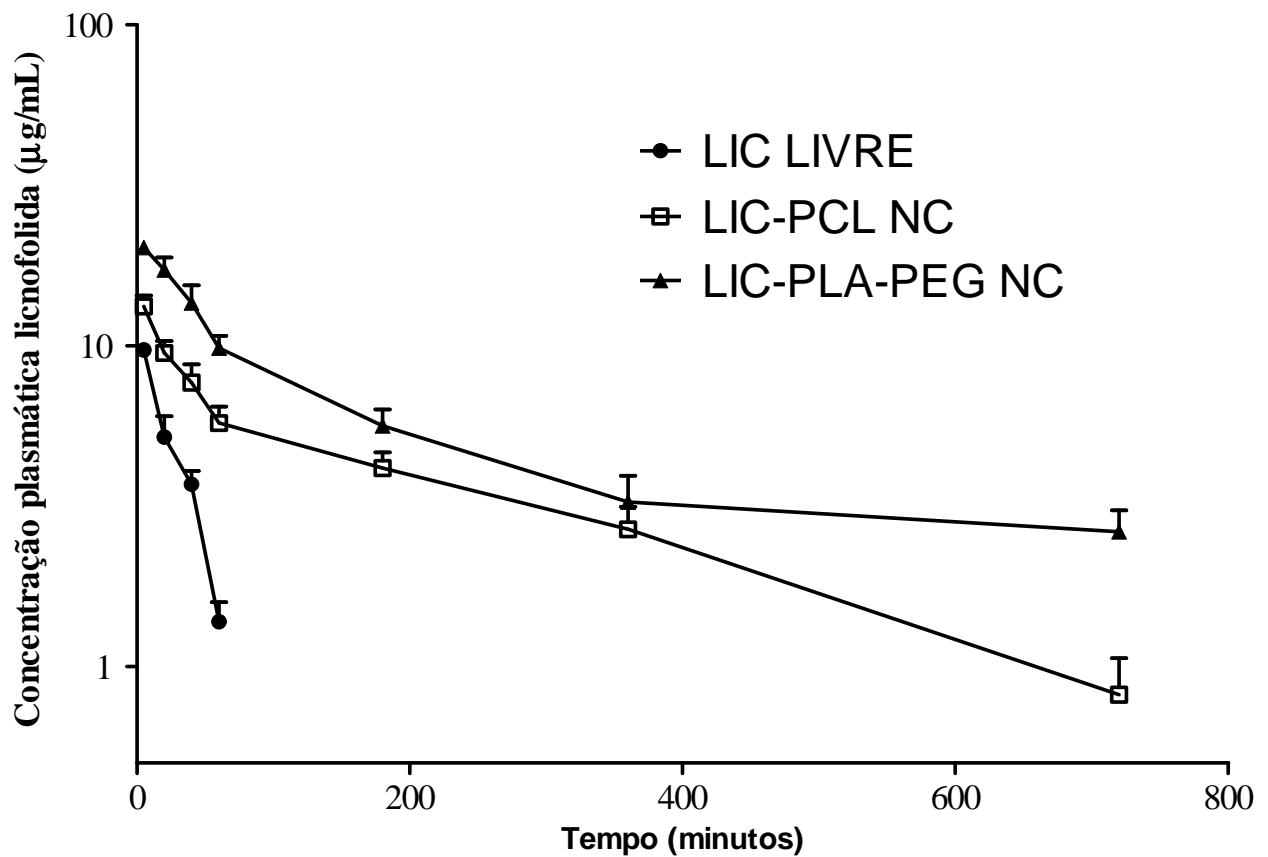


Figura 20: Perfil plasmático da licnofolida em escala semilogarítmica nas diferentes formulações, solução intravenosa de LIC livre e nanocápsulas de PCL e de PLA-PEG após administração intravenosa, na dose única de 12-13,3 mg/kg em camundongos Swiss (média \pm erro padrão, $n = 6$).

Observa-se que a ASC para a formulação de PLA-PEG e PCL foi respectivamente 12,21 e 7,80 vezes, maior em relação à ASC do LIC livre em formulação intravenosa.

Parte IV: Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com licnofolida livre ou encapsulada em camundongos infectados

5.6 Estudos da eficácia da licnofolida em diferentes formulações *in vivo*

5.6.1 Curva de parasitemia e sobrevida de animais infectados pelas cepas CL, Y e Colombiana tratados na fase aguda por via intravenosa.

As curvas de parasitemia dos animais infectados com a **cepa CL de *T.cruzi***, sensível ao BZ e tratados na fase aguda com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC, LIC livre e BZ, por via i.v. estão representadas na **Figura 21 A**.

Os resultados mostraram que os animais infectados e tratados durante a fase aguda da infecção com as formulação da LIC NC (PCL e PLA-PEG NC) 2,0 mg/kg/dia por 20 dias apresentaram resultados semelhantes à BZ 50 mg/kg/dia por 20 dias ($P>0,05$), reduzindo a parasitemia que se tornou subpatente durante e após o tratamento em 100% dos animais infectados e tratados. Animais infectados e tratados com LIC livre 2,0 mg/kg/dia por 20 dias, também apresentaram redução da parasitemia, porém com menor intensidade ($P\leq 0,05$) em relação aos animais infectados e tratados com as formulações da LIC NC e BZ, mas ao mesmo tempo esta parasitemia foi significativamente menor ($P\leq 0,05$) em relação aos animais controles. Todos os controles apresentaram parasitemia sempre mais elevadas em relação a todos os tratamentos, e semelhantes entre si.

A sobrevida dos animais infectados com a **cepa CL** e tratados com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ estão representadas na **Figura 21 B**. O grupo controle infectado não tratado apresentou tempo médio de sobrevida de 27 dias. Todos os animais infectados e tratados com as formulações LIC NC (ambas as formulações PCL e PLA-PEG) e BZ sobreviveram à fase aguda e apresentaram tempo médio de sobrevida foi até seis meses pós-tratamento quando foram necropsiados para avaliações histopatológicas. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) em relação à sobrevida entre os grupos de animais tratados com as formulações de NC e BZ. Os animais infectados e tratados com a formulação LIC livre apresentaram 50% (4/8) de sobrevida. Os animais infectados e tratados com LIC livre que não sobreviveram (50%) à fase aguda a mortalidade ocorreu até 35 dias pós-tratamento.

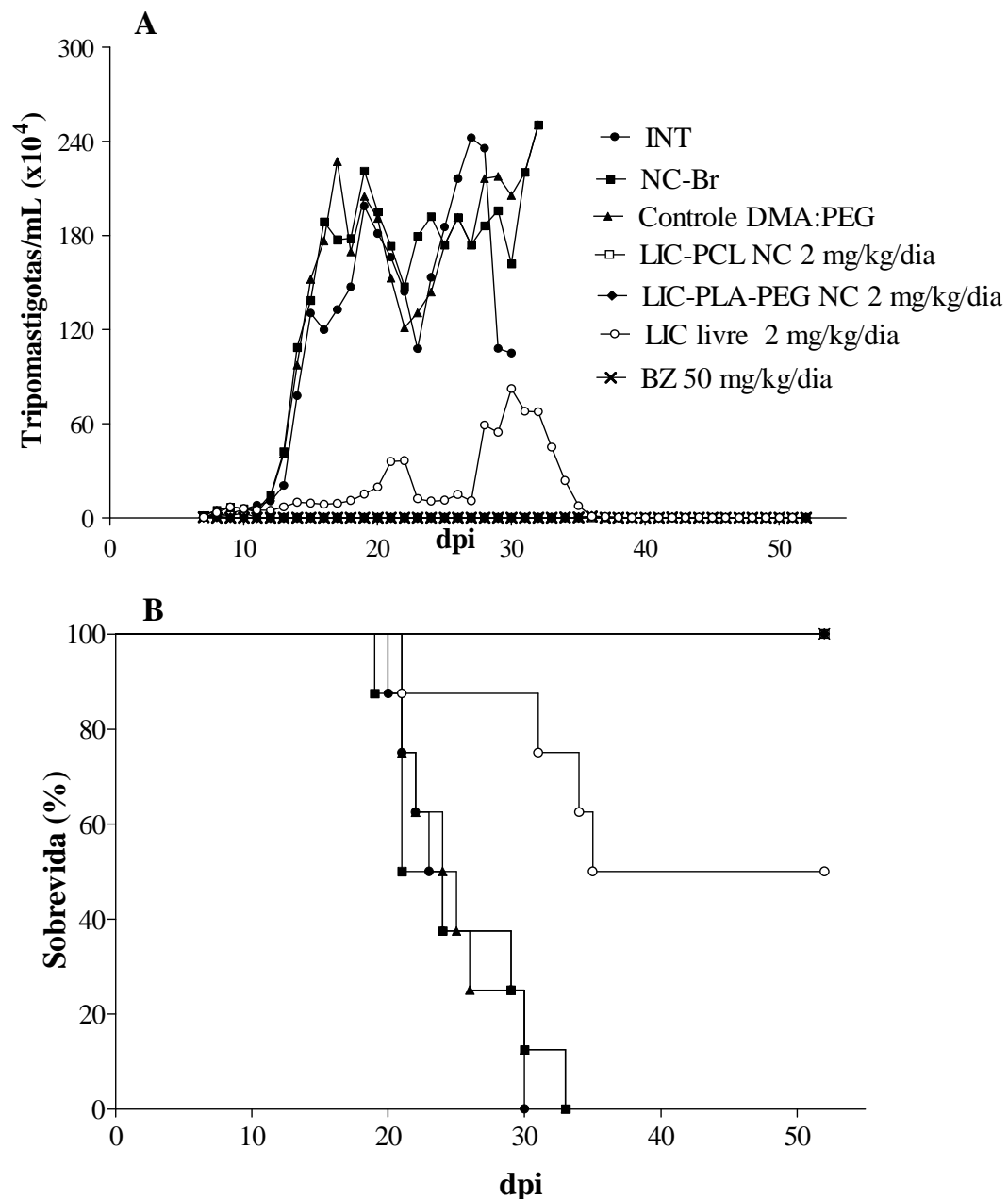


Figura 21: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa CL de *Trypanosoma cruzi*, tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia); LIC livre 2,0 mg/kg/dia por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa. Controles-INT: infectado não tratado, NC-Br (nanocápsula branca) e controle DMA:PEG (dimetilacetamida: polietilenoglicol). dpi: dias pós infecção.

As curvas de parasitemia dos animais infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, parcialmente sensível ao BZ, e tratados na fase aguda com as formulações LIC livre, LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ, por via i.v. e dos grupos controle estão representadas na **Figura 22 A**. Vale ressaltar que diante dos resultados insatisfatórios obtidos nos animais tratados com LIC livre frente às formulações NC não foram mais tratados animais com esta formulação, pois eles apresentaram

parasitemia e mortalidade mais elevadas e ausência de eficácia terapêutica em relação à LIC encapsulada como descrito por Branquinho *et al.* (2014 b).

Os animais infectados e tratados durante a fase aguda da infecção, com as formulações da LIC-PLA-PEG NC e LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia por 20 dias apresentaram redução da parasitemia semelhante à formulação BZ 50,0 mg/kg/dia por 20 dias ($P>0,05$). Os animais infectados e tratados com LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ apresentaram os percentuais de parasitemia subpatente de 100%, 75% e 87,5%, respectivamente. Todos os controles apresentaram parasitemia sempre mais elevadas significativamente ($P\leq 0,05$) em relação a todos os tratamentos, e semelhantes entre si.

A sobrevida dos animais infectados com a **cepa Y** e tratados com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ estão representadas na **Figura 22 B**. O grupo controle infectado não tratado apresentou tempo médio de sobrevida de 16 dias. Dos animais infectados e tratados com as formulações: NC PLA-PEG-LIC e NC PCL-LIC e BZ, 100% sobreviveram à fase aguda e apresentaram sobrevida até seis meses, quando foram necropsiados para avaliações histopatológicas.

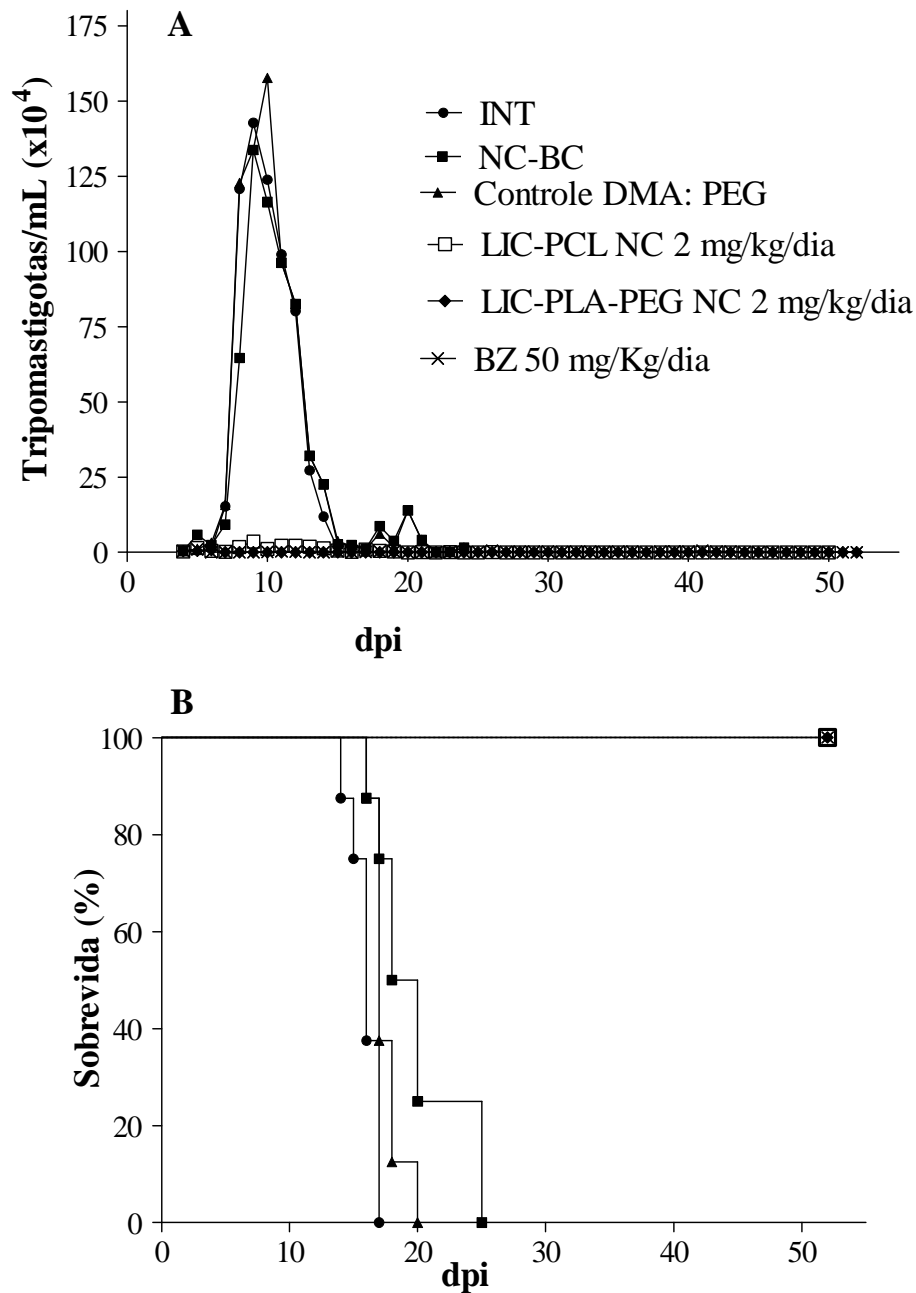


Figura 22: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa.

Controles- INT: infectado não tratado, NC-Br (nanocápsula branca) e controle DMA:PEG (dimetilacetamida: polietilenoglicol). dpi: dias pós-infecção.

As curvas de parasitemia dos animais infectados **com cepa Colombiana de *T. cruzi*, 100% resistente ao tratamento pelo BZ**, e tratados na fase aguda com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ, por via i.v. estão representadas na **Figura 23 A**.

Os animais infectados e tratados com as formulações LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia por 20 dias e LIC-PLA-PEG NC 2,0 mg/kg/dia por 20 dias, apresentaram os melhores resultados com maior redução da parasitemia, mas não houve diferença significativa neste parâmetro entre os resultados obtidos com as duas formulações de NC ($P>0,05$). Além disso, os animais infectados e tratados com BZ 50,0 mg/kg/dia por 20 dias apresentaram parasitemia significativamente maior em relação aos animais infectados e tratados com as formulações de NC. Entretanto não houve diferença significativa na parasitemia ($P\leq 0,05$) do grupo tratado com os grupos controles. Todos os controles apresentaram parasitemia semelhantes entre si. Apenas os animais tratados com LIC-PLA-PEG NC apresentaram parasitemia subpatente e durante todo o tempo de observação (até seis meses pós-tratamento), o que foi observado 7/8 animais (87,5%). Todos os demais tratamentos tornaram a parasitemia subpatente mais tardiamente e esta se deu antes nos animais tratados com LIC-PCL NC (39 dias de infecção), seguida de BZ (44 dias). Todos os animais controle apresentaram parasitemia patente até a morte por consequência da infecção.

A sobrevida dos animais infectados com a cepa Colombiana e tratados com as formulações LIC-PLA-PEG NC e LIC-PCL NC e BZ estão representadas na **Figura 23 B**. O grupo controle infectado não tratado apresentou tempo médio de sobrevida de 49 dias, enquanto 100% dos animais tratados com LIC-PLA-PEG-NC sobreviveram à fase aguda e apresentaram sobrevida de até seis meses pós-tratamento quando foram necropsiados para avaliações histopatológicas. Animais tratados com as formulações LIC-PCL NC e BZ apresentaram 75% e 62,5% de sobrevida respectivamente, por até seis meses pós-tratamento, quando também foram necropsiados para avaliação histopatológica.

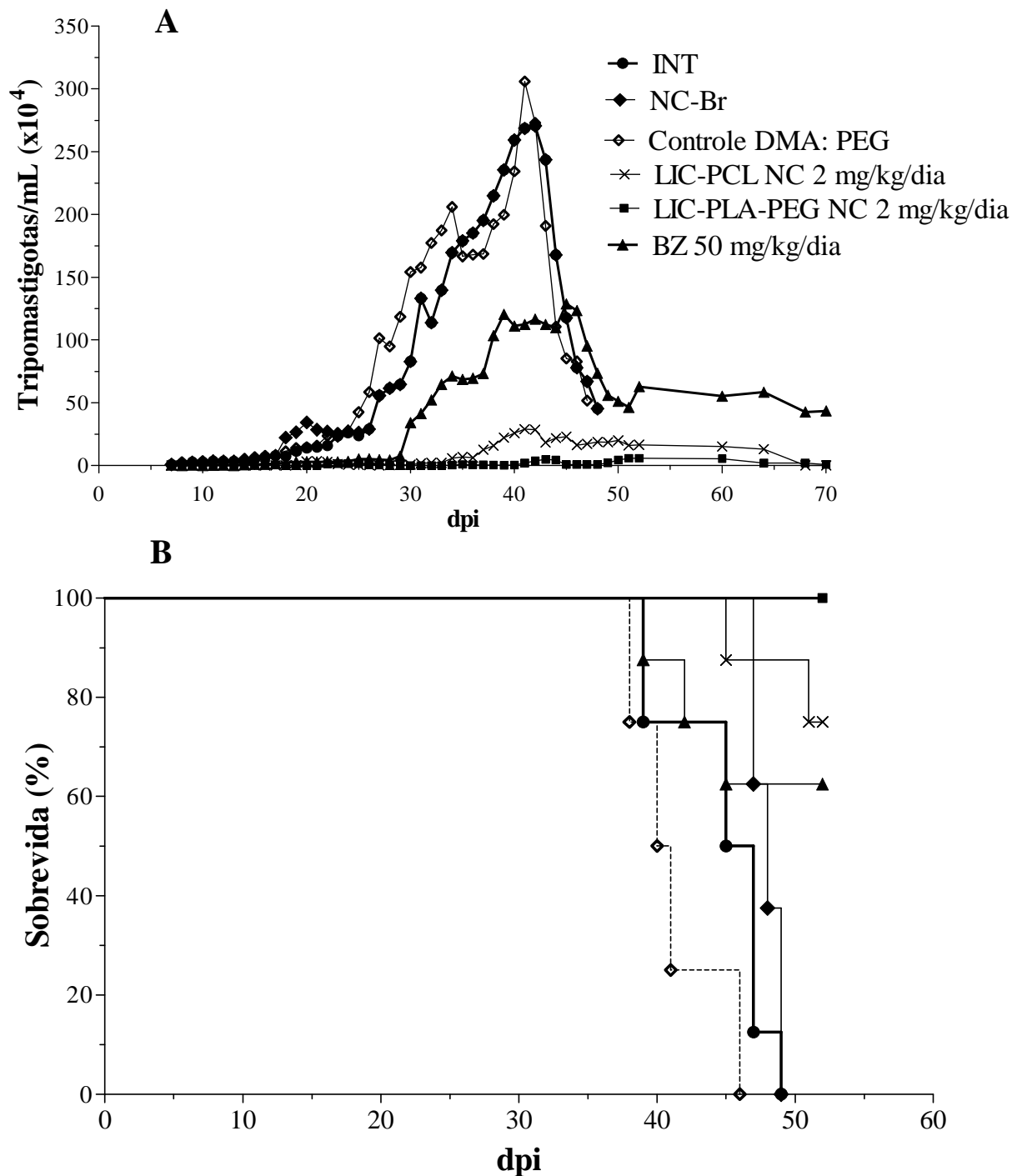


Figura 23: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevida de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, tratados com BZ (benzonidazol) 50 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via intravenosa. Controles- INT: infectado não tratado, NC-Br (nanocápsula branca) e controle DMA:PEG (dimetilacetamida: polietilenoglicol). dpi: dias pós-infecção

5.6.2 Curva de parasitemia e sobrevida de animais infectados pelas cepas Y na fase aguda e tratados por via oral

A curva de parasitemia dos animais infectados com a **cepa Y de *T.cruzi***, parcialmente sensível ao BZ, e tratados na fase aguda com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ, administradas por **via oral** estão representadas na **Figura 24 A**.

Os animais infectados e tratados com a formulação LIC-PLA-PEG NC 5,0 mg/kg/dia por 20 dias, apresentou redução da parasitemia estatisticamente semelhante à formulação BZ 100 mg/kg/dia por 20 dias ($P>0,05$). No entanto, o grupo tratado com LIC-PCL NC apresentou parasitemia significativamente maior em relação à LIC-PLA-PEG NC e BZ ($P>0,05$), mas significativamente menor em relação ao controle INT ($P>0,05$). Todos os animais (100%), infectados e tratados com BZ, apresentaram parasitemia subpatente durante e após o tratamento, 6 dos 8 animais (75%) infectados e tratados com LIC-PLA-PEG NC apresentaram parasitemia subpatente, e 5 dos 8 (62,5%) animais infectados tratados com a formulação LIC-PCL NC apresentaram parasitemia subpatente após o tratamento.

A sobrevida dos animais infectados com a cepa Y e tratados com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ estão representadas na **Figura 24 B**. O grupo controle infectado não tratado apresentou tempo médio de sobrevida de 20 dias, enquanto 100% dos animais infectados e tratados com LIC-PLA-PEG NC e BZ sobreviveram à fase aguda e apresentaram sobrevida por até seis meses pós- tratamento quando foram necropsiados para avaliações histopatológicas. Animais infectados e tratados com a formulação LIC-PCL NC apresentaram 87,5% de sobrevida por até seis meses pós-tratamento, quando também foram necropsiados para avaliação histopatológica.

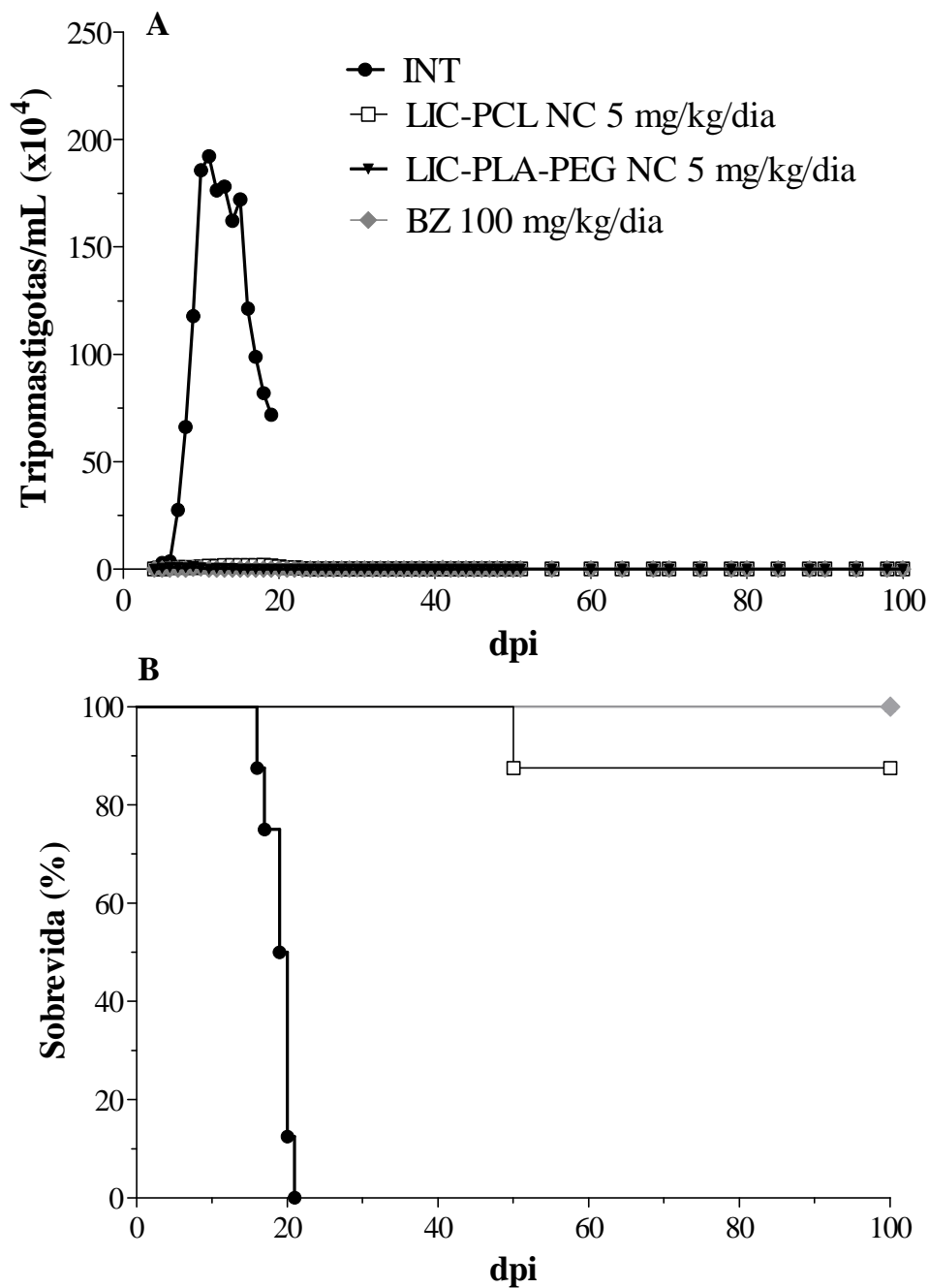


Figura 24: (A) Curvas de parasitemia média e (B) Gráficos de sobrevivência de camundongos infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados com BZ (benzonidazol) 100 mg/kg/dia e diferentes formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (PCL-LIC NC e PLA-PEG-LIC NC 2,0 mg/kg/dia) por 20 dias consecutivos, administrados via oral e controle INT: infectado não tratado. dpi: dias pós-infecção.

5.6.3 Eficácia terapêutica fase aguda

5.6.3.1 Tratamento por via intravenosa

Foram considerados curados aqueles animais que apresentaram simultaneamente negatividade em todos os testes parasitológicos (ESF, HC, PCR) e sorológico (ELISA), atendendo assim o critério mais atual de cura parasitológica de infecção experimental com *T. cruzi* ou doença de Chagas humana (Consenso Brasileiro da doença de Chagas, 2005). Os resultados estão apresentados na **Tabela 19**.

Os animais infectados com a cepa CL de *T. cruzi* (Tabela 20) e tratados por via i.v., na fase aguda da infecção, apresentaram cura parasitológica de 100% (8/8) dos animais quando tratados com ambas as formulações da LIC-NC (LIC-PLA-PEG-LIC e LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia) bem como os tratados com a formulação BZ 50 mg/kg/dia. Os animais infectados e tratados com LIC livre, 2,0 mg/kg/dia, não apresentaram cura parasitológica. A sobrevivência dos animais infectados com a cepa CL foi de 100% nos tratados com ambas as formulações da LIC-NC e com a formulação de BZ, de 50% nos animais tratados com LIC livre, e de 0% nos controles (**Tabela 19**).

Tabela 19: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0 mg/kg/dia, usando diferentes formulações durante a fase aguda da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i> / Resistência ao BZ	Formulações	Dose mg/kg/dia	Sobrevida (%)	Cura parasitológica (%)
*CL (sensível)	LIC-PCL NC	2,0	100	100
	LIC-PLA-PEG NC	2,0	100	100
	LIC Livre	2,0	50	0
	BZ	50	100	100
	Controles [#]	-	0	0
**Y (parcialmente resistente)	LIC-PCL NC	2,0	100	62,5
	LIC-PLA-PEG NC	2,0	100	100
	BZ	50	100	75
	Controles [#]		0	0
**Colombiana (resistente)	LIC-PCL NC	2,0	75	0
	LIC-PLA-PEG NC	2,0	100	62,5
	BZ	50	62,5	0
	Controles [#]		0	0

*Tratamento iniciado no 7º dia de infecção. (Dia de confirmação da infecção da cepa CL e Colombiana).

** Tratamento iniciado no 4º dia de infecção. (Dia de confirmação da infecção da cepa Y).

[#]Controles: infectados não tratado, controle nanocápsula branca (2,0 mg/kg/dia) e controle DMA: PEG (50 mg/kg/dia)

Os animais infectados com a **cepa Y de *T.cruzi* (Tabela 19)** e tratados por via i.v., na fase aguda da infecção, apresentaram cura parasitológica de 100% (8/8) nos animais tratados com LIC-PLA-PEG NC 2,0 mg/kg/dia e de 62,5% nos camundongos tratados com as formulações LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia. Nos animais infectados e tratados com a formulação BZ50 mg/kg/dia o índice de cura foi de 75% (6/8 animais tratados). A sobrevivência dos dos animais infectados com a cepa Y (**Tabela 19**) foi de 100% nos tratados com ambas as formulações LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC bem como nos tratados com BZ, enquanto nos grupos controles nenhum animal sobreviveu à infecção.

Os animais infectados com a **cepa Colombiana de *T.cruzi* (Tabela 19)** e tratados por via i.v., na fase aguda da infecção, apresentaram cura parasitológica em 62,5% (5/8) nos animais tratados com LIC-PLA-PEG NC 2,0 mg/kg/dia. Este resultado foi estatisticamente superior ($P>0,05$) em relação às demais formulações testadas em paralelo, como LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia de BZ 50,0 mg/kg/dia que não curaram parasitologicamente nenhum animal. A sobrevivência dos animais infectados com a cepa Colombiana (**Tabela 19**) foi de 100%, 75% e 62,5% dos animais tratados com as formulações LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ, respectivamente. Nenhum animal dos grupos controles sobreviveu à infecção.

5.6.3.2 Eficácia terapêutica da licnofolida em nanocápsulas por via oral

Os animais infectados com a **cepa Y de *T.cruzi* (Tabela 20)**, utilizando, a via clássica de administração de fármacos (via oral), na fase aguda da infecção, apresentaram cura parasitológica em 62,5% (5/8) dos animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia, 62,5% (5/8) dos animais tratados com LIC-PLA-PEG NC 5,0 mg/kg/dia e 57,0% (4/7) dos camundongos tratados com a formulação LIC-PCL NC 5,0 mg/kg/dia. A porcentagem de sobrevivência destes mesmos animais (**Tabela 20**) foi de 100% (8/8) nos tratados com ambas as formulações LIC-PLA-PEG NC e BZ. Os animais infectados e tratados com LIC-PCL NC apresentaram 87,5% de sobrevivência (7/8), enquanto o grupo controle infectado não tratado nenhum animal sobreviveu à infecção.

Tabela 20: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepas Y de *T. cruzi* e tratados com licnofolida por via oral na dose de 5,0mg/kg/dia, durante a fase aguda da infecção.

Formulações	Via	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Cura (%)
LIC-PCL NC	Oral	5,0	87,5	57,0
LIC-PLA-PEG NC	Oral	5,0	100	62,5
BZ	Oral	100,0	100	62,5
Controle	-	-	0	0

5.6.4 Eficácia terapêutica da licnofolida em nanocápsulas na fase crônica

Os animais infectados com a **cepa Y de *T. cruzi* e tratados por via i.v., na fase crônica** da infecção, com a formulação da LIC-PLA-PEG NC 2,0 mg/kg/dia apresentaram cura parasitológica em 50% (5/10) dos animais. Este resultado foi estatisticamente superior em relação à formulação da LIC-PCL NC 2,0 mg/kg/dia que apresentou índice de cura de 33% (3/9). Entretanto, ambas as formulações da LIC-NC apresentaram índices de cura estatisticamente superiores ao BZ 50 mg/kg/dia e controles uma vez que ambos os grupos apresentaram 0% de cura.

Tabela 21: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia, via oral na dose de 5,0 mg/kg/dia, durante a fase crônica da infecção.

Formulações	Via	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Cura (%)
LIC-PCL NC	i.v.	2,0	90	33
LIC-PLA-PEG NC	i.v.	2,0	100	50
BZ	i.v.	50,0	50	0
Controles*	i.v.	-	50	0
LIC-PCL NC	Oral	5,0	100	30
LIC-PLA-PEG NC	Oral	5,0	90	55
BZ	Oral	100	80	0
Controles [#]	Oral	-	70	0

*Controles: infectado não tratado controle nanocápsula branca (2,0 mg/kg/dia) e controle DMA: PEG (50 mg/kg/dia) # Controles: infectado não tratado controle nanocápsula branca (5,0 mg/kg/dia)

Os animais infectados **cepa Y de *T. cruzi* e tratados por via oral, na fase crônica** com a formulação da LIC-PLA-PEG NC 5,0 mg/kg/dia apresentaram cura parasitológica de 55% (5/9) deles. Este resultado foi estatisticamente superior em relação a formulação da LIC-PCL NC 5,0 mg/kg/dia que curou 30% (3/10) dos animais. No entanto, todos os animais tratados com as

formulações de NC-LIC apresentaram índices de cura estatisticamente superiores ao grupo tratado com BZ 100,0 mg/kg/dia e controles uma vez que ambos os grupos apresentaram 0% de cura. Foram observados melhores resultados de eficácia terapêutica com a formulação LIC-PLA-PEG NC em relação ao tratamento com a LIC-PCL NC, quando administradas por ambas as vias, endovenosa e oral (**Tabela 21**).

A taxa de sobrevivência pós-tratamento dos animais tratados pela via i.v. foi de 90% nos animais tratados com LIC-PCL NC e de 100% nos tratados com a LIC-PLA-PEG NC. Nos camundongos infectados e tratados pela via oral, a taxa de sobrevivência foi de 100% nos animais tratados com LIC-PCL NC e 90% tratados com LIC-PLA-PEG NC. Dos animais tratados com BZ 50 mg/kg/dia (i.v.), apenas 50% sobreviveram até o último dia do experimento (6º mês pós-tratamento). Já os animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia (via oral) apresentaram sobrevivência de 80%, muito próxima à sobrevivência dos camundongos tratados com as formulações de NC (**Tabela 21**).

Os animais infectados com a cepa VL-10 de *T.cruzi* (100% resistente ao tratamento pelo BZ) e tratados por via oral, na fase crônica da infecção, mostraram cura parasitológica de 87,5% (7/8), quando tratados com LIC-PLA-PEG NC na dose de 12,0 mg/kg/dia. Este resultado foi estatisticamente superior ao observado nos animais tratados com LIC-PLA-PEG na dose de 8,0 mg/kg/dia, que mostraram cura de 43% (3/7) quando tratados com esta formulação. No entanto, animais tratados com as formulações contendo LIC em NC apresentaram índices superiores de cura em relação aos tratados com BZ 100 mg/kg/dia, quando nenhum animal apresentou cura parasitológica (0%), assim como os animais controles. A sobrevivência dos animais foi de 70% (7/10) nos tratados com LIC-PLA-PEG na dose de 8,0 mg/kg/dia e de 80% (8/10) nos tratados com LIC-PLA-PEG NC na dose de 12,0 mg/kg/dia e de 80% nos tratados com BZ. Os animais tratados com NC branca 70% (7/10) sobreviveram de e dos infectados não tratados 60% (6/10) sobreviveram (**Tabela 22**).

Tabela 22: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PLA-PEG e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa VL-10 de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via oral nas doses de: 8,0 mg/kg/dia e de 12,0 mg/kg/dia, durante a fase crônica da infecção.

Formulações	Via	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevivência (%)	Cura (%)
LIC-PLA-PEG	Oral	8,0	70	43,0
LIC-PLA-PEG NC	Oral	12,0	80	87,5
BZ	Oral	100	80	0
Controles*	Oral	-	60	0

* Controles: infectado não tratado e controle nanocápsula branca (12,0 mg/kg/dia)

As **Tabelas 23 e 24** apresentam o resumo dos principais esquemas de tratamento (via, dose) e parâmetros que permitem avaliar os resultados de eficácia terapêutica obtidos no tratamento de camundongos nas fases aguda e crônica da infecção com as formulações LIC NC, LIC livre e BZ, comparativamente.

Tabela 23: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com diferentes cepas de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia e via oral na dose de 5,0 mg/kg/dia, durante a **fase aguda infecção**.

Cepas de <i>T.cruzi</i>	Formulações	Via	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Cura parasitológica (%)
*CL (sensível)	LIC-PCL NC	i.v.	2,0	100	100
	LIC-PLA-PEG NC	i.v.	2,0	100	100
	LIC Livre	i.v.	2,0	50	0
	BZ	i.v.	50	100	100
	Controles [#]	-	-	0	0
**Y (parcialmente resistente)	LIC-PCL NC	i.v.	2,0	100	62,5
	LIC-PLA-PEG NC	i.v.	2,0	100	100
	BZ	i.v.	50	100	75
	Controles [#]	-	-	0	0
**Colombiana (resistente)	LIC-PCL NC	i.v.	2,0	75	0
	LIC-PLA-PEG NC	i.v.	2,0	100	62,5
	BZ	i.v.	50	62,5	0
	Controles [#]	-	-	0	0
**Y (parcialmente resistente)	LIC-PCL NC	Oral	5,0	87,5	57,0
	LIC-PLA-PEG NC	Oral	5,0	100	62,5
	BZ	Oral	100,0	100	62,5
	Controle	-	-	0	0

*Tratamento iniciado no 7º dia de infecção (PPP). (Dia de confirmação da infecção da cepa CL e Colombiana). ** Tratamento iniciado no 4º dia de infecção (PPP). (Dia de confirmação da infecção da cepa Y). [#]Controles: infectados não tratado, controle nanocápsula branca (2,0 mg/kg/dia) e controle DMA: PEG (50 mg/kg/dia)

Tabela 24: Eficácia terapêutica das formulações de nanocápsulas contendo licnofolida (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) em camundongos Swiss infectados com cepa Y e VL-10 de *T.cruzi* e tratados com licnofolida por via intravenosa na dose de 2,0mg/kg/dia e via oral nas doses de 5,0 mg/kg/dia, 8,0 mg/kg/dia e 12 mg/kg/dia, durante a **fase crônica da infecção**.

Cepas de <i>T.cruzi</i>	Formulações	Via	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Cura parasitológica (%)
*Y (parcialmente resistente)	LIC-PCL NC	i.v.	2,0	90	33
	LIC-PLA-PEG NC	i.v.	2,0	100	50
	BZ	i.v.	50,0	50	0
	Controles [#]	-	-	50	0
	LIC-PCL NC	Oral	5,0	100	30
	LIC-PLA-PEG NC	Oral	5,0	90	55
	BZ	Oral	100	80	0
	Controles [#]	-	-	70	0
*VL-10 (resistente)	LIC-PLA-PEG	Oral	8,0	70	43,0
	LIC-PLA-PEG NC	Oral	12,0	80	87,5
	BZ	Oral	100	80	0
	Controles [@]	Oral	-	60	0

*Tratamento iniciado 90 dias pós-infecção. *Controles: infectado não tratado controle nanocápsula branca (2,0 mg/kg/dia) e controle DMA: PEG (50 mg/kg/dia) # Controles: infectado não tratado controle nanocápsula branca (5,0 mg/kg/dia). @ Controles: infectado não tratado e controle nanocápsula branca (12,0 mg/kg/dia)

6.0 Discussão

Este trabalho teve como foco estudar a lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC) isolada de *Lychnophora trichocarpa*, planta originária de nossa flora encontrada no cerrado mineiro, com atividade *anti-T. cruzi* comprovada em ensaios *in vitro* contra tripomastigotas sanguíneas (Oliveira *et al.*, 1996, Chiari *et al.*, 1996, Graef *et al.*, 2005). A atividade da LIC demonstrada *in vitro* motivou o estudo de avaliação de sua atividade terapêutica *in vivo*, inicialmente comprovada contra cepas de *T. cruzi* sensíveis e parcialmente resistente ao tratamento pelos fármacos usualmente empregados no tratamento humano, benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NF) (Branquinho, 2010 e Branquinho, 2014 b), bem como o de sua farmacocinética, ambas realizadas em modelo murino.

Inicialmente, é importante mencionar que todo o fracionamento cromatográfico do isolamento da LIC a partir do extrato etanólico bruto da planta e os dados de caracterização (ponto de fusão, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , infravermelho) foram descritos por Branquinho *et al.* (2013, 2014 a). Todos os dados de caracterização da substância isolada estão de acordo com os dados da literatura para substância a LIC, inicialmente descritos por Bohlmann *et al.* (1980) e Vichnewski *et al.* (1989).

A escolha da NC como carreador da LIC dentre alguns sistemas coloidais que incluem nanoemulsões (O/A) tais como lipossomas e nanoesferas, foi realizada com o propósito de se obter uma formulação capaz de encapsular a substância lipofílica, LIC, no núcleo oleoso das NC tendo em vista, sua elevada lipofilicidade ($\log P=5,03$) e sua baixa solubilidade em meio PBS, pH 7,4 ($33\pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) (Branquinho *et al.*, 2013 e 2014 b). A estrutura das NC confere ao material encapsulado maior estabilidade frente às interações com as proteínas plasmáticas. A membrana polimérica que circunda o núcleo oleoso é, em geral, a responsável por essa maior estabilidade, membrana essa ausente nas nanoemulsões (Mosqueira *et al.*, 2001 b). Além disso, as NC são os vetores de escolha para encapsulação de fármacos altamente lipofílicos e destinados à administração via intravenosa (i.v.) (Mosqueira *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2008), uma das vias utilizadas para administração da LIC NC neste estudo. As formulações de NC convencionais (LIC-PCL NC) e furtivas (LIC-PLA-PEG NC), deste estudo, foram preparadas pelos métodos de nanoprecipitação descritos por Fessi *et al.* (1989). A técnica é de fácil execução e pode ser facilmente adaptada para escala industrial. Estas formulações foram desenvolvidas por Branquinho *et al.* (2014 a e b).

O tamanho das partículas e a sua distribuição de tamanho são uma das características mais importantes de uma dispersão coloidal. Elas determinam a distribuição da substância ativa *in vivo*, seu destino biológico, toxicidade, suas características de direcionamento e distribuição tecidual. Enfim, representam um aspecto essencial na sua biodistribuição e clearance sanguíneo (Owens &

Peppas, 2006). Além disso, elas podem também influenciar na liberação de fármacos e na estabilidade das nanopartículas (Mohanraj & Chen, 2006). Assim, partículas maiores (acima de 300 nm) são mais rapidamente reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) e, portanto, facilmente retiradas da circulação. Além disso, a medida do diâmetro médio das partículas em função do tempo permite avaliar sua tendência à agregação e sedimentação indicativas de sua instabilidade na dispersão (Schaffazick *et al.*, 2003).

O diâmetro médio das nanocápsulas produzidas neste estudo foi comparável com os previamente descritos na literatura, e apresentou valores compreendidos entre 100 e 300nm (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Assis *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; de Paula *et al.*, 2013). As nanocápsulas apresentaram-se com um aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas.

O diâmetro médio, avaliado por espectroscopia de correlação de fótons (ECF), das NC de PCL (LIC-PCL NC) variou de 175,4 nm a 245,2 nm e foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) em relação às NC de PLA-PEG (LIC-PLA-PEG NC) com valores entre 105,2 a 137,9 nm. Isto sugere uma organização diferenciada do bloco hidrofílico do polímero PEG na superfície das NC. Esta organização é responsável pela redução da tensão interfacial durante a difusão mútua do solvente no processo de preparação. O tamanho reduzido das NC do dibloco (PLA-PEG) pode ser atribuído às diferenças na tensão interfacial durante a mistura dos solventes, gerando partículas de menor tamanho. Nas NC de PLA-PEG as cadeias de PEG se organizam provavelmente na forma de uma coroa ou brosa (*brush*), gerando uma barreira hidrofílica pela solvatação de grande volume de água ao redor do núcleo hidrofóbico de PLA (core), prevenindo a agregação das NC por estabilização estérica tal como discutido por Torchilin, (1995). Além disso, foi observado um aumento gradativo do tamanho das partículas à medida que as concentrações de LIC aumentaram, indicativas de sua associação ao núcleo oleoso, o que determina aumento do diâmetro final. Estudos realizados anteriormente por nosso grupo (Mosqueira *et al.* 2001; 2004, 2006; Leite *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011; de Paula *et al.*, 2013) descrevem resultados semelhantes. Vale enfatizar, que mesmo as NC com maior concentração da LIC (4,0 mg/mL), as NC permaneceram estáveis por meses (como discutido a frente) e ainda, compatíveis com o tamanho descrito na literatura para serem administradas (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008; de Paula *et al.*, 2013).

Torchilin, (2000) mostrou que em focos inflamatórios e infecciosos, nanopartículas com tamanhos entre 10 a 500 nm são capazes de extravasarem e se acumularem no espaço intersticial. No entanto, numa revisão de Romero & Morilla (2010), os autores citam trabalhos hipotetizando que os nanocarreadores devem ter um tamanho inferior a 200 nm para ter acessos a focos inflamatórios e infecciosos. Sendo assim, um dos nossos objetivos foi a obtenção de NC destinadas

à administração i.v. e oral da LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC na concentração de 2,0 mg/mL, com tamanhos médio inferiores à 200 nm (182,5 e 105,3 nm, respectivamente).

O índice de polidispersão reflete o perfil de homogeneidade da população de NC da amostra; assim NC com concentrações da LIC de 2,0 a 4,0 mg/mL apresentaram baixos índices de polidispersão ($IP < 2,5$), caracterizando populações homogêneas em relação ao tamanho das partículas (Mosqueira *et al.*, 2001 a; Scholes *et al.*, 1993). Foi recentemente reportado por Branquinho *et al.* (2013, 2014 b) que a LIC em formulação de PLA-PEG, com tamanho médio de 105,3 nm, foi capaz de promover cura parasitológica em animais infectados com cepas CL e Y de *T. cruzi* em proporção significativamente maior, em relação à NC de PCL contendo LIC, cujo tamanho médio das partículas produzidas foi de 182,5nm. Estes resultados permitiram inferir que os melhores resultados obtidos com a formulação peguilada, deveram-se provavelmente, ao seu reduzido tamanho, diminuindo sua captura pelo SFM, permanecendo conseqüentemente por maior tempo na circulação sanguínea (Romero & Morilla, 2010), como de fato foi observado nos estudos farmacocinéticos aqui descritos. Portanto, a probabilidade da LIC atingir locais de inflamação induzida pela presença do parasita, particularmente aumentada durante a fase aguda da infecção, foi alcançada devido ao aumento do tempo de sua circulação no plasma.

O potencial zeta foi avaliado neste estudo com o objetivo de detectar alterações na carga superficial das partículas devido à associação da LIC às NC. Sabe-se que valores absolutos de potencial zeta acima de 30 mV levam à maior estabilidade das dispersões de nanopartículas devido à repulsão entre elas, evitando sua agregação (Legrand *et al.*, 1999; Soppimath *et al.*, 2001). O potencial zeta é afetado principalmente pelo poloxamer (um tensoativo não iônico que reduz o potencial zeta em valor absoluto), pelos fosfolípides e pelos polímeros do tipo poliésteres que favorecem uma carga negativa na interface das NC (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). A adsorção de fármacos na superfície das nanoestruturas geralmente resulta em alterações dos valores do potencial zeta e também na estabilidade coloidal do sistema nanocarreador. As NC de PCL (LIC-PCL NC) apresentaram valores negativos e mais altos de potencial zeta (-47,3 a -57,2 mv) que as NC de PLA-PEG (LIC-PLA-PEG NC) (-30,3 a -40,1 mv). Isto provavelmente reflete a presença de grupos polarizáveis no PCL, particularmente devido à polarização dos grupos ésteres da cadeia e também dos grupos carboxilas terminais do PCL. Os fosfolípides também induzem o aparecimento de forte carga interfacial nas NC, como demonstrado anteriormente por Mosqueira *et al.* (2001). No caso das NC preparadas a partir do polímero peguilado, vários trabalhos sugerem que a redução na sua carga superficial é induzida pela presença das cadeias de PEG (Tobío *et al.*, 2000; Fresta *et al.*, 2001; Mosqueira *et al.*, 2001b; Ameller *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2005, Assis *et al.*, 2008, de Paula *et al.*, 2013). De acordo com Mosqueira *et al.* (2001b), a presença de PEG ligadas às superfícies das partículas, juntamente com a camada de hidratação que as envolve, possivelmente

mascam os grupamentos carboxílicos, reduzindo assim seus valores de potencial zeta. Embora as PLA-PEG NC tenham apresentado redução no potencial zeta, os valores absolutos ainda são altos quando comparados com potenciais zeta de nanoesferas PLA-PEG (Gref *et al.*, 1994). Isto pode ser explicado pela presença de lecitina na formulação das NC que contribui para a manutenção de cargas negativas mais altas na superfície da partícula (Mosqueira *et al.* 2001b; Mosqueira *et al.*, 2006). No entanto, não foi observado aumento significativo ($P > 0,05$) no potencial zeta à medida que concentrações crescentes da LIC foram associadas aos sistemas de NC (com exceção da LIC-PCL NC 4,0 mg/mL). Estes resultados indicam que a maior parte da substância ativa LIC, encontra-se provavelmente, absorvida ao núcleo oleoso sem influenciar a carga elétrica da interface das NC. O potencial de superfície pode ainda influenciar a resposta biológica do vetor uma vez que após administração i.v., carreadores coloidais convencionais que apresentam superfície hidrofóbica são rapidamente captados pelas células do SFM (Barratt, 2000). As características de superfície da partícula também podem alterar a resposta biológica do fármaco a ela associado. Quando se administra intravenosamente sistemas de nanopartículas convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação das células do SFM, dificultando a chegada do fármaco, ou substância ativa, ao sítio de ação. Por esta razão, diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das NC, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da nanopartícula.

As imagens obtidas por microscopia de força atômica (MFA) apresentaram boa resolução e forneceram uma visão tridimensional das NC, como descrito anteriormente (Leite *et al.*, 2005, Assis *et al.*, 2008, de Paula *et al.*, 2013). As análises mostraram partículas em diferentes campos, com tamanho uniforme, monodispersas e esféricas. O tamanho das NC de PCL (LIC-PCL NC) e NC PLA-PEG (LIC-PLA-PEG NC) obtidas por MFA na superfície da mica variou de 214,9 a 312,6 nm e 120,3 a 159,2 nm, respectivamente. O tamanho médio das formulações NC PCL (LIC-PCL NC) e NC PLA-PEG (LIC-PLA-PEG NC) por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) variou de 175,4 nm a 245,2 nm e de 105,2 a 159,2 nm, respectivamente. Esta diferença entre as medidas ocorreu por possível achatamento das NC na superfície da mica sob pressão da sonda mecânica como observado por Leite *et al.* (2005) e de Paula *et al.* (2013). Este possível achatamento das NC na superfície da mica é provavelmente relacionado à sua estrutura líquida oleosa interna envolvida por uma membrana polimérica flexível (Leite *et al.*, 2005). Essa propriedade de achatamento da NC torna-se importante na transposição de barreiras endoteliais, visando o seu extravasamento para tecidos e alvos específicos, especialmente no caso de tecidos inflamados infectados pelo *T. cruzi*.

Foi realizada neste trabalho a validação de metodologia analítica de quantificação da LIC em NC poliméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta pelo fato desta metodologia apresentar características adequadas à análise da LIC em

relação à especificidade, precisão e exatidão. A aplicação de metodologia analítica desenvolvida e validada tinha como objetivo avaliar a porcentagem e eficiência de encapsulação da LIC nas NC. A metodologia desenvolvida foi na realidade uma adaptação e otimização de Branquinho *et al.* (2014 a) com o intuito de melhorar os limites de detecção e quantificação da LIC NC, tempo de análise para propiciar e facilitar estudos futuros como os da cinética de liberação *in vitro* da LIC NC. Existem alguns trabalhos na literatura para quantificação da LIC (Santos *et al.*, 2003; Gobbo-Neto & Lopes, 2008) com longo tempo de análise até 110 minutos, complexo protocolo de eluição em gradiente e elevado limite de quantificação para LIC. No entanto, a quantificação da LIC em formulações, bem como análises relativamente simples foram descritas pela primeira vez por Branquinho *et al.* (2013 e 2014a). O comprimento de onda (λ) de 267 nm foi selecionado para a detecção e a quantificação da LIC devido à maior seletividade frente aos excipientes utilizados nas formulações e frente aos solventes utilizados nas análises. Um λ similar foi selecionado pelo método de CLAE com detector de arranjo diodos (CLAE-DAD), utilizando eluição isocrática com os eluentes metanol: água (60:40) e com um tempo de retenção da LIC de 7,0 minutos. No presente estudo, a combinação de acetonitrila: água (70:30) proporcionou um pico simétrico e o tempo de retenção obtido para a LIC foi de 3,0 minutos. Este método para quantificação da LIC por eluição isocrática e com pequeno tempo de retenção permitiu a quantificação do analito com várias vantagens em comparação com os estudos previamente citados (Santos *et al.*, 2003; Gobbo-Neto & Lopes, 2008). A análise obtida por CLAE-UV apresentou coeficiente de correlação linear segundo os critérios de aceitação estabelecidos pelo Guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005), $r^2=0,999$, e valores de CV inferiores a 3%, demonstrando uma correlação linear às concentrações de 0,5-50 $\mu\text{g/mL}$ para CLAE-UV. Esta faixa de linearidade se mostrou suficiente para análise da LIC em formulações de NC. Nas análises de precisão e exatidão, ambos os métodos apresentaram valores dentro do recomendado (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005), sendo os valores de erro padrão relativos inferiores a 2% e a recuperação média foi de 95 a 105%, demonstrando assim precisão e exatidão adequadas. Os LD e LQ obtidos foram de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já os dados de LD e LQ por CLAE-DAD obtidos por Branquinho *et al.* (2014 a) foram de 0,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De acordo com os resultados aqui obtidos, o método CLAE-UV mostrou-se mais sensível em relação ao CLAE-DAD. Os resultados dos parâmetros de validação avaliados corroboram os dados de Santos *et al.* (2003), Gobbo-Neto & Lopes (2008) e Branquinho *et al.* (2014 a), seguindo a atual diretriz regulatória (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005), para métodos analíticos por CLAE. O valor alto obtido na porcentagem de encapsulação da LIC nas NC de PCL e PLA-PEG reforça a hipótese de que a LIC encontra-se associada às NC em seu núcleo oleoso (Mosqueira *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2011; de Paula *et al.*, 2013).

Muitos fatores combinados tais como: a composição de NC, os parâmetros utilizados no processo de preparação das NC e as condições de armazenamento podem afetar a estabilidade das mesmas (Mora-Huertas *et al.*, 2010). A avaliação da estabilidade de dispersões coloidais de NC ao longo do tempo é essencial, pois esses sistemas são termodinamicamente instáveis e formulações líquidas são também mais susceptíveis à instabilidade físico-química e microbiológica (Guterres *et al.* 1995). Vale enfatizar que o estudo da estabilidade aqui desenvolvido foi fundamental para escolha da concentração a ser utilizada nos experimentos *in vivo* de farmacocinética e eficácia terapêutica. A preservação do tamanho médio das NC e o índice de polidispersão são parâmetros críticos para assegurar que o nanocarreador do fármaco mantenha as propriedades de biodistribuição adequadas (Gref *et al.*, 1995). Além da estabilidade do tamanho médio das NC da LIC, a estabilidade da porcentagem de encapsulação é também importante para assegurar uma farmacocinética reprodutível e por consequência, a eficácia terapêutica. Em relação ao tamanho médio, índice de polidispersão e porcentagem de encapsulação, as formulações da LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC foram estáveis durante seis meses de avaliação. Vale a pena mencionar que LIC-PLA-PEG NC foram relativamente mais estáveis que LIC-PCL. Não foram detectados sedimentos ou observado óleo livre em qualquer formulação durante todo o tempo de observação. Além disso, não foram observados cristais da LIC nas formulações de PCL e PLA-PEG em concentrações de 0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/mL até 6 meses de observação. No entanto, os cristais foram detectados após seis meses. Guterres *et al.* (1995) e Schaffazick *et al.* (2003) também relataram o aparecimento de cristais de fármacos em formulações de NC durante o armazenamento após oito meses. De acordo com estes autores, este fenômeno pode ser atribuído à presença de nanocristais estabilizados por meio de agentes de superfície, que com o tempo crescem e precipitam. Assim como mencionado anteriormente, o estudo de estabilidade foi fundamental para definir a concentração da LIC a ser empregada nos estudos de eficácia terapêutica *in vivo*. A concentração de LIC 2,0 mg/mL nas formulações de LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC mantiveram-se estáveis por longo período de tempo e apresentou pequena variação nos intervalos analisados sendo esta, utilizada ao longo do nosso trabalho de experimentação animal.

Com o objetivo de entender os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da eficácia terapêutica observada neste estudo com as formulações da LIC NC, foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para ser aplicado ao estudo farmacocinético da LIC após administração em camundongos. A CLAE, com detecção ultravioleta (CLAE-UV) foi o método de escolha, por apresentar características adequadas à análise de amostras de origem biológica em relação à especificidade, precisão e exatidão. A CLAE tem se mostrado vantajosa em relação a outras metodologias por ser uma técnica rápida, de custo acessível à maioria dos laboratórios na

atualidade, específica e que permite a determinação simultânea de diferentes fármacos e de seus metabólitos (Bompadre, 1998).

O estudo aqui abordado mostrou pela primeira vez, o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para quantificação da LIC em plasma de camundongo, empregando uma metodologia e técnica simples, e, principalmente, quantificando a LIC em formulações nanoestruturadas no plasma. O método mostrou-se adequado para sua aplicação em ensaios de farmacocinética devido à simplicidade, eficiência na purificação das amostras pela extração em precipitação de proteínas, utilização de padrão interno (PI) disponível comercialmente, além da alta sensibilidade. Na literatura há relato da validação bioanalítica de outras lactonas sesquiterpênica como no estudo realizado por Jabor *et al.* (2007) que realizaram a validação da 15-deoxygoyazensolida em plasma de rato, por CLAE-UV. Entretanto, a lactona foi administrada somente na sua forma livre. Há outros métodos bioanalíticos para quantificação de lactonas, mas geralmente utilizando técnicas sofisticadas, e por consequência onerosas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) (Isacchi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Nosso estudo demonstrou que o método de precipitação de proteínas possibilitou boa recuperação da LIC com baixa contaminação pelos constituintes do plasma, minimizando os resíduos que poderiam ficar retidos na coluna cromatográfica e diminuir a sua vida útil. O padrão interno (PI) utilizado foi o itraconazol, que mesmo não sendo estruturalmente semelhante à LIC, foi quantificado pelo método com adequada sensibilidade e seletividade. A comparação entre os cromatogramas obtidos de plasma branco, hemolisado e plasma contaminado com LIC e PI não revelaram a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos. A composição da fase móvel foi otimizada envolvendo estudos relacionados à alteração da proporção dos solventes utilizados, visando alcançar as condições ideais de separação dos analitos de interesse, favorecendo uma análise rápida de aplicação na rotina deste trabalho. Foram fixados os seguintes parâmetros: fase móvel constituída de acetonitrila: água (70:30 v/v), fluxo de 1mL/min, tempo de análise cromatográfica de 6 minutos e detecção a 267 nm na quantificação da LIC e PI. Nestas condições, LIC e PI demonstraram excelente resolução, eluindo em 3,0 e 4,5 minutos, respectivamente, com boa separação entre os picos. Com o intuito de assegurar a confiabilidade do método utilizado neste trabalho, foi realizada ainda sua validação seguindo recomendações da legislação vigente (FDA, 2001; Brasil, 2003) para determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em diferentes matrizes biológicas (sangue total, soro, plasma, urina e tecido), cujos parâmetros fundamentais para validação incluem: especificidade, recuperação, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

Os valores dos limites de detecção e de quantificação da LIC foram de 0,025 e 0,5 µg/mL, respectivamente, assim como a faixa de linearidade do método delimitada pelos limites de

quantificação inferior (0,5 µg/mL a 10,0 µg/mL) que foram adequados à quantificação da LIC em amostras de plasma de camundongos utilizados no monitoramento pré-clínico, pois permitiu quantificar tanto os valores de concentração plasmática máxima quanto os valores de concentrações terminais para determinação do decaimento plasmático.

A análise da regressão linear das curvas de calibração apresentou altos índices de correlação ($r^2=0,999$) cumprindo o requisito de no mínimo 0,98 (Brasil, 2003). Os valores médios de recuperação da LIC e do PI foram de 103,08% e 98,49% respectivamente, evidenciando adequada recuperação do fármaco e do PI após o procedimento de purificação das amostras de plasma. Estes valores apresentaram-se superiores a 60% com precisão e exatidão adequadas à utilização do método nos ensaios de farmacocinética (Bressole *et al.*, 1996; FDA, 2001). Os resultados de precisão intra e inter-ensaio, expressos como coeficiente de variação, mostraram-se adequados. Os valores médios obtidos para as análises realizadas no mesmo dia e em dias diferentes se mantiveram dentro dos limites considerados aceitáveis, cujo valor do coeficiente de variação deve ser igual ou menor que 15%. As amostras de plasma analisadas também apresentaram exatidão (85% a 115%) de acordo com o critério estabelecido (Brasil, 2003; FDA, 2001). Os resultados da estabilidade da LIC em amostras de plasma, mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas, não demonstraram alteração significativa em relação à concentração das amostras recém-preparadas. A análise de amostras de plasma mantidas à temperatura de -20°C e estabilidade de longa duração, foram avaliadas durante o intervalo de tempo entre a coleta das amostras de plasma no ensaio pré-clínico até o último dia de análise. Este período foi de 60 dias, durante o qual as amostras apresentaram desvios em relação à concentração nominal, menores que 15% comprovando sua estabilidade. A análise das amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento permitiram concluir que as mesmas permanecem estáveis por até três ciclos. A estabilidade pós-processamento foi avaliada mantendo-se a amostra após procedimentos de extração e suspensão em fase móvel, por 48 horas à temperatura ambiente e os resultados indicaram que não houve degradação significativa da em relação à concentração das amostras recém-preparadas.

O estudo farmacocinético da LIC foi feito pela primeira vez e conduzido com a LIC na forma livre e associada às duas formulações de nanocápsulas (LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC) na dose única de 12-13,3 mg/kg administradas via intravenosa (i.v.) em camundongos saudáveis. Esta dose foi escolhida por ser a dose com a qual se obteve maior chance de determinar com precisão as concentrações plasmáticas pelo método desenvolvido. Além disso, as NC de PCL e PLA-PEG contendo LIC na concentração de 2,0 mg/mL foram selecionadas e injetadas nos animais, pois apresentavam o menor tamanho médio e maior estabilidade em relação às demais concentrações.

Os parâmetros farmacocinéticos mais importantes a serem determinados para uma administração i.v. de fármacos são ASC, $t_{1/2}$, Cl, TMR. Quando os fármacos são nanoencapsulados,

observa-se de maneira geral, um prolongamento de sua circulação plasmática, aumento da ASC, do TMR e do $t_{1/2}$ e uma redução do *Cl*. (Li & Huang, 2008). No presente estudo, quando se confronta os parâmetros farmacocinéticos da LIC livre e LIC-PCL NC, verificou-se que a ASC_{0-t} foi 7,82 vezes superior para a formulação LIC-PCL NC, bem como o TMR que foi 10,7 vezes superior e o $t_{1/2}$ foi 1,8 vezes maior. Entretanto, o Vd foi 4,60 vezes inferior em relação à formulação LIC livre. O valor elevado do Vd das NC deve-se ao fato delas permanecerem por mais tempo na corrente sanguínea, reduzindo o extravasamento dos fármacos que geralmente ocorre rapidamente com fármacos de alta lipofilia. O *Cl* e a *ke* também foram 67,80 e 1,8 vezes inferiores para a formulação LIC-PCL NC, demonstrando assim, a superioridade da formulação da LIC-PCL o que esta de acordo com o observado por outros autores que estudaram a farmacocinética de fármacos em polímeros convencionais (Mosqueira *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011).

Ao se confrontar os parâmetros farmacocinéticos da LIC livre com LIC-PLA-PEG LIC, os dados obtidos com a formulação peguilada são ainda diferentes em relação aos discutidos acima. Isto se deve à natureza e funcionalidade do PEG que permanece por mais tempo na circulação sanguínea, devido ao retardo da clearance plasmáticas das nanopartículas pelas células do SFM. (Mosqueira *et al.*, 2001b, 2004). Assim, a análise dos parâmetros farmacocinéticos da LIC, com valores de ASC_{0-t} 12,09 vezes maiores para formulação LIC-PLA-PEG NC em relação à LIC livre, o TMR 11,69 vezes maiores, o $t_{1/2}$ foi 2,48 vezes maior e Vd 6,15 vezes inferior à LIC livre, indicam claramente o efeito de retenção do fármaco no compartimento sanguíneo, efeito esse ideal para atuar sobre as formas tripomastigotas circulantes do *T. cruzi*. O *Cl* e a *ke* foram 124,0 e 2,45 vezes inferior para formulação LIC-PLA-PEG NC, demonstrando assim, a superioridade da formulação peguilada frente à LIC livre. Esses dados corroboram os de outros autores que estudaram a farmacocinética de diferentes fármacos em polímeros com superfície modificada (Mosqueira *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011).

Por fim, ao se comparar os perfis farmacocinéticos entre as formulações convencionais e furtivas contendo LIC, nossos resultados reforçam os achados da literatura (Mosqueira *et al.*, 2004; Khalil *et al.*, 2013). A ASC_{0-t} da formulação LIC-PLA-PEG NC é superior em relação à LIC-PCL NC. O $t_{1/2}$ e TMR da formulação peguilada foram 1,88 e 1,34 vezes superiores respectivamente, em relação à formulação convencional. Ocorreu ainda, uma redução significativa do *Cl* da LIC-PLA-PEG NC que foi 1,82 vezes inferior em relação à LIC-PCL NC, indicando mais uma vez o efeito de liberação prolongada da LIC no sangue que impede sua metabolização e depuração rápida. Todos os dados estão de acordo com os valores obtidos por Mosqueira *et al.* (2004 e 2001 b). Estudos *in vivo* mostraram que as cadeias de PEG foram capazes de aumentar oito vezes a área sob a curva obtida em plasma de camundongos (Mosqueira *et al.*, 2001 b). Sumarizando, todas as características físico-químicas da formulação peguilada (LIC-PLA-PEG NC) e as suas propriedades

farmacocinéticas foram favoráveis para manter a LIC por maior tempo na corrente sanguínea, e estes fatores foram fundamentais para garantir e explicar a superioridade das formulações da LIC-PLA-PEG NC em relação à LIC-PCL NC, promovendo cura parasitológica de animais infectados com cepas de diferentes perfis de resistência/susceptibilidade como mostrado por Branquinho *et al.* (2013 e 2014 b).

Com intuito de fazer uma comparação com nosso estudo, uma abordagem geral será apresentada sobre a farmacocinética dos candidatos mais promissores alternativos para o tratamento da DCh que são os inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE), (Urbina, 2009). Os compostos mais importantes são os derivados azólicos, incluindo os imidazóis e triazóis. Estes compostos têm propriedades farmacocinéticas especiais em mamíferos, incluindo grandes volumes de distribuição e tempo de meia-vida longo (Urbina & Docampo, 2003; Guedes *et al.*, 2011). O triazólico albaconazol, potente contra *T. cruzi* em cães infectados e *in vitro* (Guedes *et al.*, 2004; Urbina, 2009) apresenta uma meia-vida notavelmente longa em cães (51 horas), em macacos (24 horas) e em humanos (120 horas). No entanto, sua meia-vida em camundongos é extremamente curta (0,5 hora) (Urbina & Docampo, 2003) o que explicaria os resultados obtidos nestes animais.

Visando melhorar o $t_{1/2}$ e reduzir potenciais efeitos adversos frequentemente atribuídos aos derivados azólicos, a vetorização do albaconazol em NC foi realizada por Barros (2007). Observou-se, uma resposta terapêutica dose-dependente quando as NC foram utilizadas, aliada a uma redução significativa da toxicidade. Estes dados indicam que, provavelmente, o perfil farmacocinético do fármaco foi alterado com o uso das NC (Barros, 2007). O mesmo ocorre com o ravuconazol que apresenta $t_{1/2}$ vida curta de 24,4 min. em camundongos (Urbina *et al.*, 2003). D0870 apresentou eficácia terapêutica quando associado à nanoesferas. A substância foi mais eficaz *in vivo* quando comparada a droga livre (Molina *et al.*, 2001). Isto sugere que provavelmente, ocorreu uma melhora nos parâmetros farmacocinéticos tendo em vista a grande variação do $t_{1/2}$ plasmático em camundongos e sua elevada toxicidade (Liendo *et al.*, 1998). O posaconazol, que se encontrava em ensaios clínicos, apresenta um $t_{1/2}$ em camundongos de 18 h, quando administrado em dose única de 20 mg/kg (Buckner *et al.*, 2012 b). Entretanto, a administração deste fármaco em camundongos ocorre por 20 dias ou até 40 dias em animais infectados (Molina *et al.*, 2000, Diniz *et al.*, 2013), o que pode acarretar acúmulo do fármaco e por consequência causar considerável toxicidade (Buckner *et al.*, 2012 b) aos animais.

Os programas da SVS (Secretaria de Vigilância Sanitária do Brasil) comprovam a necessidade de se manter a política de vigilância epidemiológica para DCh e a busca de novas terapias tendo em vista o novo quadro epidemiológico de recentes surtos agudos no país, totalizando 727 notificações de 2005-2010. A maioria (cerca de 70%) foi decorrente de transmissão via oral, alcançando uma letalidade de 2,6% (SVS, 2010). Ainda com relação à urgente necessidade

de se identificar novas abordagens terapêuticas para DCh, é relevante citar que esta parasitose foi classificada como a mais importante doença tropical da América Latina em termos de impacto no desenvolvimento socioeconômico, influenciando principalmente na saúde e na produtividade de populações carentes e desprovidas de representação e de cuidados médicos holísticos (Franco-Paredes *et al.*, 2009). Outra realidade cada vez mais confirmada é o grande número de pessoas com diagnóstico da DCh em diversos países de vários continentes (Coura, 2013). Aliado a tudo isto, a maioria das doenças negligenciadas é excluída dos programas de pesquisa e desenvolvimento das indústrias farmacêuticas. Entre 1975 a 2004, das 1556 novas moléculas de drogas comercializadas no mundo, apenas 21 eram direcionadas para doenças negligenciadas (oito para malária, três para tuberculose e 10 para as todas as outras doenças negligenciadas) (Chung *et al.*, 2008).

Esta realidade persiste até hoje reforçando a necessidade pelo desígnio, de busca e síntese de novos compostos. Recentemente, lactonas sesquiterpênicas vêm sendo largamente estudadas em animais (camundongos) experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi*, por diferentes grupos de pesquisadores (Sulsen *et al.*, 2008; 2011; da Silva *et al.*, 2013). As lactonas estudadas reduziram a parasitemia e elevaram a sobrevida dos animais tratados em relação aos animais infectados não tratados, mas não foi observada cura parasitológica na fase aguda da infecção.

O nosso trabalho é inovador em relação ao uso de uma nova substância candidata ao tratamento da DCh, pois houve a inclusão desta nova substância química (LIC) nas nanoestruturas (NC), resultando numa resposta em termos de cura parasitológica muito superior à produzida com o medicamento em uso no Brasil, o BZ (Rochagan[®]), em animais experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi* sensíveis, parcialmente resistentes e resistentes aos fármacos usados em humanos. Na fase aguda da infecção os estudos de eficácia terapêutica *in vivo* por via i.v. demonstraram cura parasitológica de até 100% em camundongos Swiss experimentalmente infectados com as cepas CL e Y de *T. cruzi* e tratados com diferentes esquemas terapêuticos (tratamentos iniciados 24 h pós-infecção e no período pré-patente de cada cepa), e diferentes formulações de nanocápsulas contendo LIC (LIC PCL NC e LIC-PLA-PEG NC). Entretanto, a LIC livre reduziu a parasitemia, aumentou a sobrevida dos camundongos em relação aos grupos controles, porém nenhum animal infectado tratado foi curado, o que evidencia a superioridade da eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas (Branquinho *et al.*, 2014 b). Ainda na fase aguda da infecção, animais infectados com a cepa Y foram tratados com as formulações de NC na dose de 5,0 mg/mL por 20 dias.

O perfil de dissolução LIC livre e de liberação da LIC NC está descrito em Branquinho *et al.* (2014 a). Após 24 horas, cerca de 100% da LIC foram completamente dissolvidos, ao passo que, aproximadamente 60% foram liberados das NC. A análise do perfil de dissolução indicam que a difusão através de membranas (diálise) ocorre lentamente, e que a completa dissolução ocorre somente após 24 horas de contato com o meio. O perfil de liberação da LIC em NC foi diferente e

mostra a retenção da substância no interior do nanocarreador. A liberação da LIC da NC foi lenta, mas completa, resultando na liberação de 97% desta substância em 48 horas. O tempo necessário para 50% de liberação da LIC NC (T_{50}) foi de 20,7 e de 7,3 horas para dissolução da LIC livre (Branquinho *et al.*, 2014 a). Esta é uma hipótese que pode justificar a eficácia terapêutica de NC contendo LIC frente à falha na terapêutica de animais infectados tratados com a LIC livre (Branquinho *et al.*, 2014 b).

Um estudo mais aprofundado foi realizado na sequência deste trabalho, utilizando cepas mais resistentes ao tratamento (Colombiana e VL-10), durante a fase crônica da infecção, tratados com as mesmas formulações manométricas por via oral.

As propriedades biológicas da LIC como ação anti-*T. cruzi in vitro* e agora já conhecida *in vivo*, foram atribuídos à presença na molécula de três grupos funcionais alquilantes: α -metileno- γ -lactona, α , β -ciclopentenona e grupo éster (angelato). O principal grupo com ação anti-tripanicida se deve a presença do grupo α -metileno- γ -lactona (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986), que alquilam nucleófilos biológicos por adição tipo Michael (Santos, 1989; Picman, 1986; Rüngeler *et al.*, 1999). A LIC apresenta ainda uma potente ação citotóxica (Ren *et al.*, 2012) e clastogênica (Canalle *et al.*, 2001). Recentemente, numa parceria desenvolvida entre nosso grupo com a Universidade de Montpellier I-France, no Laboratório de Physiologie & Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles - INSERM - U1046 (Equipe I- Coordenada pelo Dr. Sylvain Richard), foi avaliada a citotoxicidade da LIC *in vitro*, utilizando como modelo cardiomiócitos isolados de camundongos. Foi possível detectar na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LIC (0,14 nM), 50% de células arrítmicas e esta arritmia celular chegou a 100% na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (14 nM); ou seja, foram observados efeitos arritmogênicos pela observação de ondas de Ca^{2+} ectópicas e modificações de correntes iônicas com a dose mais alta testada (14 nM). Assim a LIC mostrou-se segura no tocante à cardiotoxicidade em concentrações inferiores a 0,14 nM.

Na Universidade de Montpellier I-France, foi conduzida ainda, um experimento de administração da LIC NC em camundongos por via intravenosa, durante 20 dias consecutivos empregando-se os mesmos parâmetros avaliados *in vitro*. Verificou-se que as NC protegem os animais contra a arritmia observada em cardiomiócitos isolados (dados não mostrados). Assim, fica mais uma vez comprovada que o emprego da nanotecnologia viabiliza a utilização *in vivo* da LIC, impedindo seus potenciais efeitos tóxicos. A NC é, portanto, promissora e proporciona uma opção terapêutica com menor risco de arritmias ventriculares que ameaçam a vida, aliada ainda ao fato que as NC direcionam sua distribuição dentro do organismo aumentando a sua eficácia terapêutica e permitindo uma ação mais sustentada mediante a liberação controlada da substância ativa LIC quando comparada com aquela produzida pela administração da LIC livre (Branquinho *et al.*, 2014 a, b). Além disso, as lactonas sesquiterpênicas, bem como a LIC, são eletrófilos altamente reativo e

as NC podem eventualmente proteger a molécula ativa da degradação enzimática ou química em condições fisiológicas o que merece ser investigado em estudos posteriores.

Considerando os resultados promissores da LIC em formulação nanoestruturada, já comprovada eficaz, especialmente em camundongos infectados com as cepas CL e Y de *T. cruzi* e tratados com formulação peguilada (LIC-PLA-PEG NC) durante a fase aguda da infecção (Branquinho *et al.*, 2014 b) a LIC nanoencapsulada foi avaliada em camundongos infectados com a cepa Colombiana (100% resistente ao tratamento com BZ e NF) (Filardi & Brener, 1987) tratados também por via i.v. na fase aguda da infecção, por 20 dias consecutivos, como feito anteriormente.

As formulações LIC-PCLNC e LIC-PLA-PEG NC, 2,0 mg/kg/dia apresentaram redução significativa da parasitemia em relação ao fármaco de referência BZ 50,0 mg/kg/dia. Somente os animais infectados e tratados com a formulação LIC-PLA-PEG NC apresentaram cura parasitológica numa porcentagem de 62,5%, enquanto os animais infectados e tratados com LIC-PCL NC e BZ não apresentaram cura (0% de cura), reforçando mais uma vez a importância do polímero (PEG), usado na composição das NC no favorecimento e das suas propriedades farmacocinéticas. Todos (100%) os animais infectados com a cepa Colombiana e tratados com LIC-PLA-PEG NC sobreviveram durante todo o período de observação, enquanto 75% e 62,5% dos animais tratados com LIC-PCL NC e BZ, respectivamente, sobreviveram por mais de seis meses quando foram todos necropsiados para futuras avaliações histopatológicas. Este resultado obtido é muito animador se considerada a baixa dose da substância utilizada no tratamento (25 vezes inferior à do BZ), evidenciando a alta potência terapêutica da LIC, aliado ainda ao fato da lactona sesquiterpênica em uso estar totalmente associada ao núcleo de um vetor polimérico (NC) (Branquinho *et al.*, 2014 a) que confere à formulação redução de toxicidade da substância ativa e sua maior permanência na circulação sanguínea, agindo assim por exaustão e por mais tempo sobre as formas tripomastigotas sanguíneo dos parasitos que são eliminados continuamente pelas células hospedeiras ao longo da infecção (Romero & Morilla, 2010).

Diversas publicações e uma patente depositada por nosso grupo de pesquisas (Branquinho *et al.*, 2013) demonstraram que as nanopartículas podem incrementar a biodisponibilidade oral de substâncias ativas em estudos pré-clínicos (Paplied *et al.*, 2011). A administração oral é a forma mais utilizada e prontamente desejável para administração de fármacos devido à conveniência e facilidade para o paciente, especialmente quando o tratamento é utilizado em doenças crônicas e diariamente (Gamboa & Leong, 2013) como é o caso dos pacientes acometidos pela DCh. A administração oral é particularmente atraente ou até mesmo essencial, quando o acesso ao sistema de saúde é precário e/ou limitado, é o caso de alguns países em desenvolvimento, (Gamboa & Leong, 2013). Existem diversos relatos na literatura da utilização de nanopartículas para

administração oral de peptídeos, proteínas, genes, nutracêuticos e fármacos sintéticos (Lopes *et al.*, 2010).

A via oral, via de escolha para administração da LIC nos protocolos experimentais de fase crônica, vem sendo cada vez mais utilizada para administração das nanopartículas, dentre elas as NC (Plapied *et al.*, 2011 and Gamboa & Leong, 2013). Quando em comparação aos demais sistemas nanoestruturados para administração oral, as nanopartículas (NC e nanoesferas) apresentam algumas vantagens, por exemplo, em relação aos lipossomas, bem como às micelas, por se mostrarem mais estáveis no fluido do trato gastro-intestinais (TGI). Além disso, devido à possibilidade de utilização de diferentes materiais poliméricos, é possível modular as propriedades físico-químicas das nanopartículas, tais como hidrofobicidade, carga superficial, eficiência de incorporação do fármaco e seu perfil de liberação, visando otimizar o comportamento *in vivo* desses sistemas (Galindo-Rodriguez *et al.*, 2005; Papiéd *et al.*, 2011; Le Droumaguet *et al.*, 2012). Portanto, a enorme versatilidade dos vetores nanoparticulados pode permitir a adequada liberação de uma ampla gama de ativos biológicos (Yamanaka; Leong, 2008; Zakerimilani *et al.*, 2013).

Diante disto, na evolução de nosso estudo, camundongos Swiss foram infectados com cepa Y de *T.cruzi*, e tratados por via oral com as formulações LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC, administradas agora na dose de 5,0 mg/kg/dia e o grupo tratado com BZ na dose de 100 mg/kg/dia por 20 dias consecutivos na fase aguda da infecção, reproduzindo assim o protocolo clássico de tratamento em modelo murino experimentalmente infectado. Houve 62,5% de cura parasitológica em animais infectados e tratados com BZ e com LIC-PLA-PEG NC, e de 57% em animais infectados e tratados com LIC-PCL NC. A sobrevivência dos animais infectados e tratados foi de 100% com BZ e LIC-PLA-PEG NC e de 87,5% nos tratados com LIC-PCL NC. Por meio dos diversos trabalhos na literatura, podemos afirmar que a LIC nanoencapsulada e administrada por via oral, de uma maneira geral, é muito eficaz e potente no tratamento da DCh experimental, considerando-se que a dose de 5,0 mg/kg/dia foi capaz de promover cura parasitológica em 62,5% dos animais e a sobrevivência de 100%.

Apesar da via oral ser a mais utilizada e prontamente aceita para administração de fármacos, alguns inconvenientes são encontrados para entidades químicas ativas como a LIC, por esta sofrer degradação em pH elevado (Branquinho *et al.*, 2013 e 2014 a). Portanto, é provável que as NC desenvolvidas neste estudo melhoraram a estabilidade da LIC durante o trânsito intestinal, pois o efeito da molécula foi mantido resultando na cura de animais infectados com cepa de *T.cruzi* parcialmente resistente ao tratamento por via oral.

Considerando os resultados promissores observados nos tratamentos realizados durante a fase aguda da infecção, foi realizado um novo experimento para verificar se a LIC nanoencapsulada seria eficaz em induzir cura, também, durante a fase crônica da infecção de camundongos com cepa

Y, parcialmente resistente ao tratamento pelo BZ e NF (Filardi & Brener, 1987). Assim sendo, animais infectados foram tratados como nas condições iniciais, com as formulações da LIC-PCL NC, LIC-PLA-PEG NC via i.v., na dose de 2,0 mg/kg/dia e com as mesmas formulações via oral, na dose de 5,0 mg/kg/dia, sendo o BZ utilizado como referência e administrado pelas vias i.v. (50 mg/kg/dia) e oral (100 mg/kg/dia).

Os resultados obtidos foram bem promissores. Nenhum animal infectado e tratado (0%) com BZ, vias i.v. e oral, apresentou cura parasitológica, enquanto os animais tratados com LIC-PCL NC e LIC-PLA-PEG NC, via i.v., apresentaram 33 e 50% de cura, respectivamente. Já os animais tratados pelas mesmas formulações por via oral apresentaram 30 e 55% de cura, respectivamente. Assim a comparação entre vias de administração do tratamento com LIC-PCL NC, i.v. *versus* oral, detectou-se índices de cura parasitológica 33% *versus* 30%. A mesma comparação feita entre vias de administração do tratamento com LIC-PLA-PEG NC, i.v. *versus* oral, verificou-se 50% *versus* 55% de cura. A superioridade da eficácia terapêutica da formulação peguilada por via i.v. já foi descrita ao longo deste trabalho. Os índices de cura significativamente mais elevados desta formulação peguilada comparada à formulação convencional (PCL NC) por via oral, pode ser interpretada considerando resultados de outros pesquisadores, que demonstraram que este tipo de NC conferiu uma proteção adicional contra a agregação induzida por enzimas do fluido digestivo e em fluidos do TGI em relação à nanopartícula PLA estudada por Tobío *et al.* (2000). Estes autores demonstraram após marcação com radioisótopos e administradas por via oral que as amostras de sangue e linfa obtidas posteriormente destes animais estavam com concentração das partículas NC PLA-PEG bem superior às partículas PLA. Alguns estudos demonstraram que o revestimento dos nanosistemas com PEG (Tobío *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; Ramachandran *et al.*, 2009) podem impedir que o ambiente ácido e a ação enzimática afetem a estrutura dos carreadores (Roger *et al.*, 2010).

Foram avaliados ainda neste estudo, animais infectados com a cepa VL-10 100% resistente ao tratamento com BZ e NF (Filardi & Brener, 1987) e tratados com formulação peguilada administrando duas diferentes doses com objetivo de verificar o efeito dose *versus* eficácia, sendo o tratamento realizado na fase crônica da infecção. Os animais em que se administrou a formulação peguilada na dose de 12,0 mg/kg/dia apresentaram cura superior aos animais que receberam a formulação peguilada de 8,0 mg/kg/dia; ou seja, índices de cura de 87,5% (7/8) *versus* 43% (3/7), respectivamente, enquanto os animais BZ 100 mg/kg/dia e controles não curaram (0%). Em relação à sobrevida, a relação com a dose foi direta, ou seja, 80% *versus* 70%, nos animais tratados com a maior e menor dose, respectivamente. Nos animais infectados e tratados com BZ a sobrevida foi de 80%, semelhante à LIC-PLA-PEG NC 12,0 mg/kg/dia, enquanto os grupos controle NC branca e infectados não tratados a sobrevida foi de 70% e 60%, respectivamente.

Com o intuito de evidenciar a potência da LIC-NC, bem como a sua eficácia terapêutica em animais infectados com cepas resistentes, podemos citar vários trabalhos utilizando os fármacos triazólicos (inibidores da biossíntese do ergosterol), que são atualmente os candidatos mais promissores para a triagem clínica em humanos. Molina *et al.* (2000) mostraram cura de 50% (3/6) e sobrevida de 50% de animais infectados com cepa Colombiana e tratados na fase crônica da infecção pelo fármaco POZ 20mg/kg/dia. Bahia *et al.* (2012) mostraram cura de 70% de animais infectados com cepa VL-10 e tratados na fase crônica da infecção pelo fármaco fexinidazol, 300 mg/kg/dia. Mais uma vez as nanocápsulas carregadas da LIC se mostraram mais eficazes na cura parasitológica e sobrevida dos animais infectados por uma cepa 100% resistente, tratados na fase crônica da infecção e por via oral, e muito potente o que, em conjunto, representa um grande avanço em termos de praticidade e viabilidade no tratamento futuro da doença de Chagas humana.

Os achados do nosso trabalho podem ser considerados em alguns casos, melhores que os resultados mais promissores obtidos com novos fármacos alternativos utilizados no tratamento da DCh tais como os inibidores da biossíntese do ergosterol (Molina *et al.*, 2000; Urbina, 2009, Buckner *et al.* 2012 a, Bahia *et al.*,2012, Diniz *et al.*, 2013). Apesar da atividade dos IBE contra o *T.cruzi*, a resposta obtida em diversos estudos realizados tem sido extremamente variável entre diferentes cepas do parasito tanto no modelo murino (Molina *et al.*, 2000; Toledo *et al.* 2003; Diniz *et al.*, 2013) como em cães (Guedes *et al.*, 2004; Diniz *et al.*, 2010). Possivelmente, a melhor eficácia terapêutica obtida pela formulação LIC-PLA-PEG NC em camundongos infectados certamente ocorreu devido ao seu perfil farmacocinético que apresentou maior $t_{1/2}$, menor CL, maior ASC e maior TMR e em relação à formulação LIC-PCL NC.

Como conclusão, demonstramos claramente que nanocarreadores de fármacos foram capazes liberar de modo controlado uma nova substância, a licnofolida, isolada de uma planta brasileira e com potente atividade frente ao *T. cruzi*, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. Essas nanopartículas foram capazes de alterar os parâmetros farmacocinéticos da substância ativa, alvo deste estudo, o que resultou numa eficácia terapêutica surpreendentemente boa ou mesmo elevada, em doses tão baixas de uma substância de origem natural em ambas as fases da infecção, alcançando índices de cura de 50-88% dos animais de experimentação infectados com cepas totalmente resistentes ao benzonidazol, inclusive no tratamento por via oral. Estes achados representam uma perspectiva extraordinária para o tratamento da doença de Chagas (atualmente muito limitado) que constitui uma das mais graves doenças parasitárias negligenciadas do globo atingindo um número elevado de pessoas nas áreas mais pobres dos países latino-americanos e subdiagnosticada em outros Continentes, onde sua transmissão continua ocorrendo silenciosamente, por transmissão congênita dispensando o seu vetor natural (os triatomíneos hematófagos), e

favorecida pela inexistência nestes locais das medidas clássicas de controle da transfusão sanguínea, transplantes, uso de seringas compartilhadas, dentre outras.

7.0 Conclusões

1. Neste trabalho foram desenvolvidas NC poliméricas com polímero convencional (PCL) e furtivo (PLA-PEG) para a associação da licnofolida (LIC), alvo deste estudo. Elas foram estáveis por até seis meses, nas concentrações de 20, 3,0 e 4,0 mg/mL da substância ativa. As NC com concentração de LIC de 2,0 mg/mL foram empregadas nos estudos *in vivo* de farmacocinética e eficácia terapêutica, por serem mais estáveis e com menor variabilidade no tamanho e eficiência de encapsulação.
2. As NC convencionais e furtivas foram monodispersas, com tamanho médio variando entre 109 e 245 nm. As NC furtivas mostraram-se mais estáveis, com menor tamanho médio (avaliadas tanto por ECF quanto por MFA) e potencial zeta menos negativo, menor índice de polidispersão em relação à NC convencional. Assim, verificou-se que com a incorporação da LIC em um sistema nanoestruturado foi possível aumentar a dispersão da substância ativa em meios aquosos, facilitando sua administração *in vivo* por via intravenosa e oral.
3. A LIC de natureza lipofílica foi efetivamente associada à PCL NC e PLA-PEG NC e as formulações se mantiveram estáveis durante os experimentos *in vivo*. As porcentagens de encapsulação da LIC foram próximas de 100%, quando quantificada pelos métodos CLAE-UV, indicando a adequabilidade do uso do nanocarreador escolhido (nanocápsulas) para associação da LIC.
4. O método CLAE-UV desenvolvido para quantificação da LIC em plasma de camundongo foi validado e mostrou-se específico, linear, preciso, exato e sensível dentro dos limites de quantificação, possibilitando boa recuperação do analito de interesse-a LIC.
5. Os principais parâmetros farmacocinéticos observados no tratamento dos camundongos com as NC foram ASC, $t_{1/2}$, CL, TMR, V_d e k_e . Verificou-se de maneira geral, um prolongamento de sua circulação plasmática, aumento da ASC e do $t_{1/2}$ e uma redução do CL e do TMR da formulação peguilada em relação à convencional. A superioridade de todos os parâmetros de PK da formulação LIC PLA-PEG NC justificam a obtenção de maiores índices de cura de animais infectados por cepas de *T. cruzi* com diferentes perfis de resistência/susceptibilidade e tratados com PLA-PEG nas fases aguda e crônica da infecção. Os mesmos parâmetros

farmacocinéticos da LIC livre apresentaram valores estatisticamente inferiores em relação à às formulações nanoestruturadas.

6. A eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas contendo LIC em animais tratados por via i.v. na fase aguda da infecção com a cepa CL foi de 100% quando tratados com LIC-PLA-PEG NC, LIC-PCL NC e BZ. Os animais infectados com a cepa Y apresentaram 100% de cura quando tratados com LIC-PLA-PEG NC e de 62,5% e 75% quando tratados com LIC-PCL NC e BZ, respectivamente. Por outro lado, animais tratados com LIC livre e os controles não apresentaram cura. A sobrevida foi de 100% em animais infectados com as cepas CL e Y e tratados com as formulações de NC convencionais e furtivas e BZ, enquanto nos tratados com LIC livre e nos grupos controles a sobrevida foi de 50% e 0%, respectivamente.
7. Em relação aos animais infectados com a cepa Colombiana, somente os tratados com a formulação peguilada (LIC-PLA-PEG NC) apresentaram cura parasitológica num percentual de 62,5%. A sobrevida foi de 100% em animais tratados com LIC-PLA-PEG, 75% nos tratados com LIC-PCL NC e 62,5 nos tratados com BZ. Foi notória a superioridade dos índices de cura obtidos nos animais tratados com a formulação peguilada, o que pode ser atribuído à melhoria de todos os parâmetros farmacocinéticos obtidos com esta formulação.
8. A eficácia terapêutica da formulação LIC-PLA-PEG NC e BZ em animais infectados com a cepa Y de *T.cruzi* e tratados por via oral na fase aguda da infecção foi de 62,5%. Com a formulação, LIC-PCL NC o índice de cura foi de 57,2% enquanto nenhum animal controle apresentou cura parasitológica. A sobrevida foi de 100% nos animais tratados com LIC-PLA-PEG NC e BZ e de 87,5% nos tratados com LIC-PCL NC.
9. A eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas contendo LIC em animais experimentalmente infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, tratados por via i.v. e oral na fase crônica da infecção com a formulação LIC-PLA-PEG NC administrada por via i.v. e oral foi 50% e 55% respectivamente. Este resultado foi estatisticamente superior com a formulação convencional que curou 33% por via i.v. e 30% por via oral. A taxa de sobrevida dos animais tratados pela via i.v. foi de 100% com LIC-PLA-PEG NC e de 90% nos tratados com LIC-PCL NC. Nos camundongos tratados pela via oral, a taxa de sobrevida foi de 90% nos tratados com LIC-PLA-PEG NC e de 100% nos tratados com LIC- PCL NC. Dos animais tratados com BZ 50mg/kg/dia (i.v.), apenas 50% sobreviveram. Já os animais

tratados com BZ 100mg/kg/dia (via oral) apresentaram sobrevida de 80%, muito próxima à sobrevida dos camundongos tratados com as formulações de NC.

10. A eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas contendo LIC em animais infectados com cepa VL-10 de *T.cruzi* (100% resistente ao tratamento pelo BZ) e tratados na fase crônica da infecção foi de 87,5% nos tratados com LIC-PLA-PEG NC na dose de 12,0 mg/kg/dia. Este resultado foi estatisticamente superior aos 43% observado nos animais tratados com LIC-PLA-PEG na dose de 8,0 mg/kg/dia. Foi verificado que as formulações contendo LIC em NC apresentaram índices de cura superiores em relação aos tratados com BZ e a animais controle nos quais não houve cura. A sobrevida nos animais tratados com LIC-PLA -PEG foi de 70% na dose de 8,0 mg/kg/dia, 80% nos tratados com LIC-PLA-PEG NC na dose de 12,0 mg/kg/dia e de 80% nos tratados com BZ. Os animais tratados com NC branca apresentaram 70% de sobrevida e os animais infectados não tratados sobreviveram 60%.

Conclusão Geral

Este trabalho empregou nanotecnologia no desenvolvimento final de duas formulações de nanocápsulas convencional e furtiva, contendo a lactona sesquiterpênica licnofolida de origem natural, avaliou sua farmacocinética em modelo murino nos quais estas formulações apresentaram maior eficácia terapêutica que a licnofolida livre e o benzonidazol, único fármaco disponível atualmente para tratamento da doença de Chagas no Brasil, em modelo experimental murino de fase aguda e crônica, tratados pelas vias intravenosa e oral quando infectados com cepas de *T. cruzi* sensível, parcialmente resistente e totalmente resistentes aos fármacos disponíveis para o tratamento humano, evidenciando o grande potencial terapêutico da substância em estudo para o tratamento da doença de Chagas.

8.0 Perspectivas do trabalho

1. Avaliação histopatológica do parasitismo e lesões de órgãos de camundongos isolados de animais tratados e não tratados.
2. Análise dos parâmetros de toxicidade aguda em modelo murino.
3. Análise dos dados *in vitro* e *in vivo* dos testes de toxicidade em cardiomiócitos.
4. Realizar o estudo de biodistribuição da livre LIC livre e das formulações com LIC estudadas em modelo murino.
5. Realizar estudo piloto de eficácia terapêutica das formulações com LIC em nanocápsulas em modelo cão.
6. Aumentar dose e tempo de tratamento para avançar na eficácia terapêutica em modelo murino infectado com cepas totalmente resistentes na fase aguda e crônica da infecção.
7. Buscar pela síntese química a obtenção da licnofolida em laboratório.

9.0 Referências Bibliográficas

ABE, F., NAGAFUJI, S., OKABE, H., AKAHANE, H., ESTRADA-MUÑIZ, E., HUERTA-REYES M. and REYES-CHILPA R. Trypanocidal constituents in plants. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol Pharm Bull*, 27, 141-143, 2002.

ADLER, A. F. and LEONG, K. W. Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on non-viral gene delivery. *Nano Today*, 5, 553-569, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasil: 2010. Disponível <http://www.portal.anvisa.gov.br/.../Guia+de+Estudos+Não+Clínicos++versão+2.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2013

ALEXIS, F., RHEE, J., RICHIE, J.P., RADOVIC-MORENO, A.F. and LANGER, R. Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. *J Control Release*, 70, 1–20, 2008.

ALVIANO, D. S., BARRETO, A. L. S., DIAS, F. A., RODRIGUES, I. A., ROSA, M. S. S., ALVIANO, C. S. and SOARES, R. M. A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Front Microbiol*, 3, 2012.

ANDRADE, S.G., MAGALHAES, J.B. and PONTES, A.L. . Evaluation of chemotherapy with benzimidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ*, 63, 721-726, 1985.

ANDRADE, S.G., FREITAS, L.A., PEYROL, S., PIMENTEL, A.R. and SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ*, 69, 191-197, 1991.

ANDRADE, S.G., RASSI A., MAGALHÃES, J.B., FERRIOLLI, F.F. and 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*, 86, 624-626, 1992.

ANDRADE, A.L., ZICKER, F., DE OLIVEIRA, R.M., ALMEIDA, S.S., LUQUETTI, A., TRAVASSOS, L.R., ALMEIDA, I.C., DE ANDRADE, S.S., DE ANDRADE, J.G. and MARTELLI, C.M. Randomized trial of efficacy of benzimidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, 348, 1407-1413, 1996.

AMELLER, T., MARSAUD, V., LEGRAND, P., GREF, R. and RENOIR, J.-M. Pure antiestrogen RU 58668-loaded nanospheres: morphology, cell activity and toxicity studies. *Eur J Pharm Sci*, 21, 361-370, 2004.

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

APT, W., ARRIBADA, A., ZULANTAY, I., SANCHEZ, G., VARGAS, S. L. and 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*, 97(1), 23-9, 2003.

ASSIS, D.N., MOSQUEIRA, V.C.F., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S. and CARDOSO, V.N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Tc-fluconazole nanocapsules. *Int J Pharm*, 349,152-160, 2008.

AVGOUSTAKIS, K., BELETSI, A., PANAGI, Z., KLEPETSANIS, P., LIVANIOU, E., EVANGELATOS, G. and ITHAKISSIOS, D. S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, *in vitro* stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm*, 259, 115-127, 2003.

ÁVILA, H.A., SIGMAN, D.S., COHEN, L.M., MILLIKAN, S. and SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Parasitol*, 48, 222-223, 1991.

ÁVILA, J.L., ÁVILA, A. and MONZÓN, H. Differences in allopurinol and 4-aminopyrazolo (3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 11, 51-60, 1984.

BAHIA, M. T., DE ANDRADE, I. M., MARTINS, T. A. F., NASCIMENTO, A. F. S., DINIZ, L. F., CALDAS, I. S., TALVANI, A., TRUNZ, B. B., TORREELE, E. and RIBEIRO, I. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLoS negl Trop Dis*, 6, 2012.

BAHIA, M.T., GUEDES, P.M.M., FIETTO, J.L.R., LANA, M., TOLEDO, M.J.O. Current advance in human and experimental Chagas disease chemotherapy. *Research Advance in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5, 99-121, 2005.

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

BARREIRO, E. J. and BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. *Química Nova*, 32, 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J. and FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. *Química Nova*, 22, 744-759, 1999.

BARROS, C.M. Desenvolvimento e avaliação biológica de formulações de nanocápsulas para tratamento da doença de Chagas em modelo murino. *Dissertação de Mestrado-Programa Pós-Graduação em Ciências Biológicas*. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007,99p.

BATISTA, D. D. G. J., BATISTA, M. M., DE OLIVEIRA, G. M., DO AMARAL, P. B., LANNES-VIEIRA, J., BRITTO, C. C., JUNQUEIRA, A., LIMA, M. M., ROMANHA, A. J., SALES JR, P. A., STEPHENS, C. E., BOYKIN, D. W. and SOEIRO, M. D. N. C. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 2940-2952, 2010.

- BAZON, J. N., CALLEGARI LOPES, J. L., VICHNEWSKI, W. and CALLEGARI LOPES, J. N. Constituents of *Lychnophora brunioides*. *Fitoterapia*, 68(1), 92-93, 1997.
- BIRNBAUM, D.T., KOSMALA, J.D., HENTHORN, D.B. and BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of β -estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J Control Release*, 65, 375-387, 2000.
- BOHLMANN, F., ZDERO, C., ROBINSON, H. and KING, R.M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*, 19, 2381-2385, 1980.
- BOHLMANN, F., MOLLER, L., KING, R. M. and ROBINSON, H. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*, 20, 1149-1151, 1981.
- BOHLMANN, F. and JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernoniaceae (Compositae). *Plant Syst Evol*, 4, 3-43, 1990.
- BOMPADRE, S., FERRANTE, L. and LEONE, L. On-line solid phase extraction of cephalosporins. *J Chromatogr A*, 812, 191-196, 1998.
- BORELLA, J.C., LOPES, J.L.C., VICHNEWSKI, W., CUNHA, W.R. and HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. *Biochem Syst Ecol*, 26, 671-676, 1998.
- BORSATO, M.L., GRAEL, C.F., SOUZA, G.E. and LOPES, N.P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 55, 809-813, 2000.
- BRENGIO, S. D., BELMONTE, S. A., GUERREIRO, E., GIORDANO, O. S., PIETROBON, E. O. and SOSA, M. A. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*, 86, 407-412, 2000.
- BRANQUINHO, R.T. Avaliação da eficácia de lactona sesquiterpênica nanoestruturada em modelo experimental de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas*, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 166p., 2010.
- BRANQUINHO, R. T., MOSQUEIRA, V. C. F., KANO, E. K., DE SOUZA, J., DORIM, D. D. R., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. and DE LANA, M. HPLC-DAD and UV-spectrophotometry for the determination of lychnopholide in nanocapsule dosage form: Validation and application to release kinetic study. *J Chromatogr Sci*, 52, 19-26, 2014 a.
- BRANQUINHO, R. T., MOSQUEIRA, V. C. F., OLIVEIRA-SILVA, J. C. V. D., SIMÕES-SILVA, M. R., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. and LANA, M. D. Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 2067-2075, 2014 b.
- BRANQUINHO RT, MOSQUEIRA VC, SAÚDE-GUIMARÃES DA, LANA M. Maio 2013. Composições farmacêuticas contendo lactonas sesquiterpênicas da classe dos furanoeliangolidos para tratamento de infecções parasitárias e de tumores. World Intellectual Property Organization (WIPO) n°WO/2013/05989.

- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 4, 389-396,1962.
- BRENER, Z. and CHIARI, E. Susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to various chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 9, 197-207,1965.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*, 27, 347-382,1973.
- BRENER, Z., CANCADO, J.R., GALVAO, L.M., DA LUZ, Z.M., FILARDI, L.S., PEREIRA, M.E., SANTOS, L.M. and CANCADO, C.B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88, 149-153, 1993.
- BRENER, Z. and GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 114, 103-110, 1997.
- BRESSOLLE, F., BROMET-PETIT, M. and AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 686, 3-10, 1996.
- BREUNIG, M., BAUER, S. and GOEPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm*, 68, 112-128,2008.
- BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv Exp Med Biol*, 625, 61-80, 2008.
- BUCKNER, F. S. and NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis*, 23, 609-616, 2010.
- BUCKNER, F.S. and URBINA, J.A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2012 a.
- BUCKNER, F. S., BAHIA, M. T., SURYADEVARA, P. K., WHITE, K. L., SHACKLEFORD, D. M., CHENNAMANENI, N. K., HULVERSON, M. A., LAYDBAK, J. U., CHATELAIN, E., SCANDALE, I., VERLINDE, C. L. M. J., CHARMAN, S. A., LEPESHEVA, G. I. and GELB, M. H. Pharmacological characterization, structural studies, and *in vivo* activities of anti-chagas disease lead compounds derived from tipifarnib. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4914-4921, 2012 b.
- CALVO, P., VILA-JATO, J.L. and ALONSO, M.J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carries. *J Pharm Sci*, 85, 530-536, 1996.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 12, 93-100, 1964.
- CANALLE, R.B.R.V., CALLEGARI, L. J.L. and TAKAHASHI, C.S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lychnopholide in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Detect Prev*, 25(1), 93-101, 2001.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 44, 29-37, 2002.
- CASTRO, J.A., DE MECCA, M.M. and BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*, 25(8), 471-479, 2006.

- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses - Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 689, 175, 1997.
- CERQUEIRA, M.B.S., SOUZA, J.T., JÚNIOR, R.A. and PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). *Ciência e Cultura*, 39 (5/6), 551-553, 1987.
- CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*, 56,675-711, 2004.
- CHAGAS C.J. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1, 159-218, 1909.
- CHANG, R.K., PRICE, J.C. and WHITWORTH, C.W. Dissolution characteristics of poly (ϵ -carolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. *Drug Dev Ind Pharm*, 12,2355-2380, 1986.
- CHEN, J., HE, H., LI, S. and SHEN, Q. An HPLC method for the pharmacokinetic study of vincristine sulfate-loaded PLGA-PEG nanoparticle formulations after injection to rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879, 1967-1972.
- CHIARI, E., BRAGA DE OLIVEIRA, A., RASLAN, D.S., MESQUITA, A.A.L. AND TAVARES, K.G. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(3), 372-374, 1991.
- CHIARI, E., DUARTE, D.S., RASLAN, D.S., SAÚDE, D.A., PERRY, K.S.P., BOAVENTURA, M.A.D., GRANDI, T.S.M., et al., *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research*, 10(7), 636-638, 1996.
- CHOI, Y., THOMAS, T., KOTLYAR, A., ISLAM, M. T. and BAKER, J. R. Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for cancer cell-specific targeting. *Chem Biol*, 12, 35-43,2005.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. *Nature*, 465, S4-S5, 2010.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. *Rev Soc Bras de Med Trop*, 38(III), 29, 2005.
- COURA, J. R. and DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 3-24, 2002.
- COURA, J. R. Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 549-554, 2009.
- COURA, J. R. and BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115, 5-13, 2010.
- COURA, J. R. and DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 31-40, 2009.

- COURA, J. R. and BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: A systemic review. *Rev Soc Bras de Med Trop*, 45, 286-296, 2012
- COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108, 962-967, 2013
- COURA, J. R. and VIÑAS, P. A. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature*, 465, S6-S7, 2010.
- COUVREUR, P., FATTAL, E. and ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharm Res*, 8, 1079-1086, 1991.
- COUVREUR, P., DUBERNET, C. and PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm*, 41, 2-13, 1995.
- COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P. and VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 19, 99-134, 2002.
- CUNHA, W.R. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão Filho (*Vernoniae, Compositae*). *Tese de Doutorado em Química-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto*, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 166 p, 1994.
- CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., STOLF N, BELLOTTI, G, PATARROYO, M.E., PILLEGGI, F. and KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 92, 3541-3545, 1995.
- DAMGE, C., REIS, CP. and MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 45-68, 2008.
- DELI, M.A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 892-910, 2009.
- DA SILVA, C. F., BATISTA, D. G. J., OLIVEIRA, G. M., DE SOUZA, E. M., HAMMER, E. R., DA SILVA, P. B., DALIRY, A., ARAUJO, J. S., BRITTO, C., RODRIGUES, A. C. M., LIU, Z., FARAHAT, A. A., KUMAR, A., BOYKIN, D. W. and SOEIRO, M. N. C. *In vitro and in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form - DB1965 - against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS ONE*, 7, 2012
- DA SILVA, C. F., DA GAMA JAEN BATISTA, D., DE ARAÚJO, J. S., BATISTA, M. M., LIONEL, J., DE SOUZA, E. M., HAMMER, E. R., DA SILVA, P. B., DE MIERI, M., ADAMS, M., ZIMMERMANN, S., HAMBURGER, M., BRUN, R., SCHÄHLY, W. and DE NAZARÉ CORREIA SOEIRO, M. Activities of psilostachyin A and cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *in vitro and in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 5307-5314.
- DA SILVA, R. M., OLIVEIRA, L. T., BARCELLOS, N. M. S., DE SOUZA, J. and DE LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 3344-3348, 2012.
- DE ALMEIDA, E. A., SILVA, E. L., GUARIENTO, M. E. , AOKI, F. H. and DE PEDRO, R. J. Aetiological treatment with itraconazole or ketoconazole in individuals with *Trypanosoma cruzi*/HIV co-infection. *Ann Trop Med Parasitol*, 103, 471-476, 2009.

- DE PAULA, C. S., TEDESCO, A. C., PRIMO, F. L., VILELA, J. M. C., ANDRADE, M. S. and MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*, 49, 371-381, 2013.
- DES RIEUX, A., FIEVEZ, V., GARINOT, M., SCHINAIDER Y.J. and PREAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery system of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*, 116, 1-27, 2006.
- DE SOUZA, M. R., DE PAULA, C. A., PEREIRA DE RESENDE, M. L., GRABE-GUIMARÃES, A., DE SOUZA FILHO, J. D. and SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. *J Ethnopharmacol*, 142, 845-850, 2013.
- DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*, 1, 3, 2002.
- D'SILVA, C. and DAUNES, S. The therapeutic potential of inhibitors of the trypanothione cycle *Exp Opin Invest Drugs*, 11, 217-231, 2002.
- DEDA, D. K., UCHOA, A. F., CARITÃ, E., BAPTISTA, M. S., TOMA, H. E. and ARAKI, K. A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. *Int J Pharm*, 376, 76-83, 2009.
- DESOTI, V. C., LAZARIN-BIDÓIA, D., SUDATTI, D. B., PEREIRA, R. C., ALONSO, A., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V. and DE SILVA, S. O. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Mar Drugs*, 10, 1631-1646, 2012.
- DEVALAPALLY, H., CHAKILAM, A. and AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharm Sci*, 96, 2547-2565, 2007.
- DIAS E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 28, 1-110, 1934.
- DIAS, J.C.P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of Transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007 a.
- DIAS, J.C.P. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saúde Pública*, 23, 13-22, 2007 b.
- DIAS, J.C.P., PRATA, A. and CORREIA, D., Problems and perspectives for Chagas disease control: In search of a realistic analysis, *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(2), 193-196, 2008.
- DINIZ, L. D. F., CALDAS, I. S., GUEDES, P. M. D. M., CREPALDE, G., DE LANA, M., CARNEIRO, C. M., TALVANI, A., URBINA, J. A. and BAHIA, M. T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 2979-2986, 2010.
- DINIZ, L. F., URBINA, J. A., DE ANDRADE, I. M., MAZZETI, A. L., MARTINS, T. F., CALDAS, I. S., TALVANI, A., RIBEIRO, I. and BAHIA, M. T. Benznidazole and Posaconazole in

Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, 2013

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/>>, 2008

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

DOS SANTOS, A. O., VEIGA-SANTOS, P., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B. P., SUDATTI, D. B., BIANCO, E. M., PEREIRA, R. C. and NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar Drugs*, 8, 2733-2743, 2010,

DU, X., GUO, C., HANSELL, E., DOYLE, P.S., CAFFREY, C.R., HOLLER, T.P., MCKERROW, J.H., COHEN, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J Med Chem*, 45, 2695-2707, 2002.

ENSIGN, L. M., CONE, R. and HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 557-570, 2012.

ESMAEILI, F., GHAREMANI, M. H., ESMAEILI, B., KHOSHAYAND, M. R., ATYABI, F. and DINARVAND, R. PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm*, 349, 249-255, 2008.

ESPUELAS, S., PLANO, D., NGUEWA, P., FONT, M., PALOP, J. A., IRACHE, J. M. and SANMARTIN, C. Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. *Curr Med Chem*, 19, 4259-4288, 2012.

ESSA, S., RABANEL, J.M. and HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(*D-L-lactide*) (PLA) based nanoparticles. *E J Pharm Bioph*, 75 (2), 96-106, 2010.

FARIA, T.J., CAMPOS, A.M. and SENNA, E.L. Preparation and characterization of poly(*D-L-lactide*) (PLA) and poly(*D-L-lactide*)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. *Macromol Symp*, 229, 228-233, 2005.

FAURO, R., LO PRESTI, S., BAZAN, C., BAEZ, A., STRAUSS, M., TRIQUELL, F., CREMONEZZI, D., NEGRETE, O. S., WILLHUBER, G. C., PAGLINI-OLIVA, P. and RIVAROLA, H. W. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. *Parasitology*, 140, 917-927, 2013.

FERRARI, F. C., FERREIRA, L. C., SOUZA, M. R., GRABE-GUIMARÃES, A., PAULA, C. A., REZENDE, S. A. and SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha* spreng. (Brazilian Arnica). *Phytother Res*, 27, 384-389, 2013.

FERRARI, F. C., GRABE-GUIMARÃES, A., CARNEIRO, C. M., DE SOUZA, M. R., FERREIRA, L. C., DE OLIVEIRA, T. T. and SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Lychnophora trichocarpha*, Brazilian arnica. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 1104-1110, 2012.

FERREIRA, J., COLOMA, J., FONES, E., LETELIER, M.E., REPETTO, Y., MORELLO, A. and ALDUNATE J. Effects of t-butyl-4-hidroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumurol cells and *Trypanosoma* parasites. *FEBS Lett.* 234, 485-488, 1988.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., AMMOURY, N. and BENITA, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm*, 55, R1-R4, 1989.

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

FRANCO-PAREDES, C., BOTTAZZI, M. E. and HOTEZ, P. J. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, 2009.

FRESTA, M., FONTANA, G., BUCOLO, C., CAVALLARO, G., GIAMMONA, G. and PUGLISI, G. Ocular tolerability and *in vivo* bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J Pharm Sci*, 90, 288-297, 2001.

FRAGATA FILHO, A.A., DA SILVA, M.A. and ABOAINAIN, E. Ethnologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease. *São Paulo Med J*, 113, 867-872, 1995.

FREDERICI, E.E., ABELMANN, W.H. and NEVAF, A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C₃H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Trop Med Hyg*, 13,272-280, 1964.

FREITAS, J.L.P., LION, M.F. and PARTARI, J.T.A. Resultados de um a investigação sobre Moléstia de Chagas realizad a no Município de arília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. *Rev Hosp Clínicas* (São Paulo), 8, 81-92, 1953.

FREYMAN, D.M., WENCK, M.A., ENGEL, J.C., FENG, J., FOCIA, P.J., EAKIN, A.E. and CRAIG, S.P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol*, 7, 957-968, 2000.

FUENTES, B., MARIO MATURANA, A. and ROLANDO DE LA CRUZ, M. Efficacy of nifurtimox for the treatment of chronic Chagas disease, 29, 82-86, 2012.

GAMBOA, J. M. and LEONG, K. W. *In vitro* and *in vivo* models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 800-810, 2013.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. A., ALLEMANN, E., FESSI, H. and DOELKER, E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of *in vivo* studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 22, 419-464, 2005.

GARCIA, E.S and AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 8, 240-244,1991.

GARCIA, E.S and AZAMBUJA, P. Infection of Triatomines with *Trypanosoma cruzi*, p. 143-155. In JM Crampton, CB Beard & Louis K (eds), *The Molecular Biology of Insector Disease Vectors: a Methods Manual*, Champ & Hall, London, 1996.

GARCIA, S.E., RAMOS, C.O., SENRA, J.F., VILAS-BOAS, F., RODRIGUES, M.M., CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. and SOARES, M.B. Treatment with

benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1521-1528, 2005.

GARZONI, L.R., CALDERA, A., MEIRELLES, M.D.N.L., DE CASTRO, S.L., DOCAMPO, R., MEINTS, G.A., OLDFIELD, E., ET AL. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*, 23(3), 273-285, 2004.

GHANTOUS, A., GALI-MUHTASIB, H., VUORELA, H., SALIBA, N. A. and DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today*, 15, 668-678, 2010.

GIBALDI, M. and PERRIER, D. *Pharmacokinetics*. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1982.

GIESBRECHT, A.M., DAVINO, S.C. NASSIS, C.Z., et al. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Química Nova*, 13, 312-314, 1990.

GOBBO-NETO, L., and LOPES, N. P. On-line identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and -MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. *J Agric Food Chem*, 56, 1193-1204, 2008.

GOMES, M.L., GALVÃO, L.M., MACEDO, A.M., PENA, S.D. and CHIARI, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*, 60, 205-210, 1998.

GONÇALVES, J.E., SOUZA, J. and STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In STORPIRTIS et al., *Biofarmacotécnica – Série Ciências Farmacêuticas*. Guanabara Koogan, 1ª Ed, Rio de Janeiro, 2009

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

GONZALEZ, M.S, AZAMBUJA, P. and GARCIA, E.S. The influence of triatomine hormonal regulation on the development of *Trypanosoma cruzi*, p.665-707. In Ru Carcavallo, I Galindez Giron, J Jurberg and H Lent (eds), *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the America*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1988.

GRAEL, C.F.F., ALBUQUERQUE, S. and LOPES, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76(1), 73-82, 2005.

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

GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MULLER, R.H., VERBAVATZ, J.M. and LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 16, 215-233. 1995.

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

GUEDES, P.M.M., FIETTO, J.L.R., LANA, M. and BAHIA, M.T. Advancens in Chagas Disease Chemotherapy. *Antiinfect Agents Med Chem*, 5(2), 175-185, 2006.

GUEDES, P. M. M., SILVA, G. K., GUTIERREZ, F. R. S. and SILVA, J. S. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 609-620, 2011.

GURTLER, R. E., DIOTAIUTI, L. and KITRON, U. Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *Int J Epidemiol*, 37, 698-701, 2008.

GUTERRES, S.S., FESSI, H., BARRATT, G., DEVISSAGUET, J. P. and PUISIEUX, F. Poly (D, L-lactide) nanocapsules contaning diclofenac: formulations and stability study. *Int J Pharm*, 113, 57-63, 1995.

HAAS, S. E., BETTONI, C. C., DE OLIVEIRA, L. K., GUTERRES, S. S. and DALLA COSTA, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. *Int J Antimicrob Agents*, 34, 156-161, 2009.

HALL, I.H., STARNES, C.O., LEE, K.H. and WADDELL, T.G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Sci*, 69, 537-543, 1979.

HALL, B.S., MEREDITH, E.L. and WILKINSON, S.R. Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop antitrypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 5821-5830, 2012.

HANS, M.L. and LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 6, 319-327, 2002.

W.HERZ *et al.*,(eds.), *Prog Chem Org Nat Prod Springer-Verlag*, 38, 47-390, 1979.

HIGUCHI, M.D., BRITO, T.D. and REIS, M.M. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Path*, 2, 101-106, 1993.

HIGUCHI, M.D., RIES, M.M., AIELLO, V.D., BENVENUTI, L.A., GUTIERREZ, P.S., BELLOTTI, G. and PILEGGI, F. Association of an increase in CD8⁺T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*, 56, 485-489, 1997.

HOTEZ, P.J., MOLYNEUX, D.H., STILLWAGGON, E., BENTWICH, Z. and KUMARESAN J. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet*, 368, 1865-1866, 2006.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, International Conference on Harmonisa- tion of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q29(R1), ICH Steering Committee, Geneva, Switzerland,1-13, 2005.

IRIGOÍN, F., CIBILS, L., COMINI, M. A., WILKINSON, S. R., FLOHÉ, L. and RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*, 45, 733-742, 2008.

ISACCHI, B., ARRIGUCCI, S., MARCA, G. L., BERGONZI, M. C., VANNUCCHI, M. G., NOVELLI, A. and BILIA, A. R. Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: Preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice. *J Liposome Res*, 21, 237-244, 2011.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., VEIGA JÚNIOR, V. F. and NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: A review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep*, 28, 809-823, 2011.

JABOR, V. A. P., DOS SANTOS, M. D., BONATO, P. S., GOUVEA, D. R. and LOPES, N. P. A new high-performance liquid chromatography assay for the determination of sesquiterpene lactone 15-deoxygoyazensolide in rat plasma. *Analytica Chimica Acta*, 601, 212-217, 2007.

KANO, E.K. Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos *in vitro e in vivo* (bioequivalência). *Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo*. São Paulo, 233p., 2002.

KANWAR, J.R., MAHIDHARA, G. and KANWAR, R.K. Foundation review: Antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system. *Drug Discov Today*, 16 (5/6), 188-202, 2011.

KHALIL, N. M., NASCIMENTO, T. C. F. D., CASA, D. M., DALMOLIN, L. F., MATTOS, A. C. D., HOSS, I., ROMANO, M. A. and MAINARDES, R. M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 101, 353-360, 2013.

KUMARI, A., YADAV, S.K. and YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B*, 75, 1-18, 2010.

LAI, S. K., WANG, Y. Y. and HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 158-171, 2009.

LANA, M., LOPES, L. A., MARTINS, H. R., BAHIA, M. T., MACHADO-DE-ASSIS, G. F., WENDLING, A. P., MARTINS-FILHO, O. A., MONTOYA, R. A., DIAS, J. C. P., ALBAJAR-VIÑAS, P. and COURA, J. R. Clinical and laboratory status of patients with chronic chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1139-1147, 2009.

LANA, M AND MACHADO, E. M. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity (Chapter XIV). In: *Jenny Telleria and Michel Tibayrenc. (Org.). American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of reserach*. 1ed. London, England: ELSEVIER. 339-356. 2010.

LAMAS, M. C., VILLAGGI, L., NOCITO, I., BASSANI, G., LEONARDI, D., PASCUTTI, F., SERRA, E. and SALOMÁN, C. J. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int J Pharm*, 307, 239-243, 2006.

- LAURIA-PIRES, L., DE CASTRO, C.N., EMANUEL, A. and PRATA, A. Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*, 21, 79, 1988.
- LECLERCQ, E., VORAGEN, A.G.J., BRUGGING, L.M. and PILNIK, W. Effect of light, solvents and commercial enzymes on the solubility and stability of sesquiterpene lactones from chicory roots. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 187, 440-443, 1988.
- LE DROUMAGUET, B., NICOLAS, JULIEN., BRAMBILLA, D., MURA, S., MAKSIMENKO, A., KIMPE, L., SALVATI, E., ZONA, C., AIROLDI, C., CANOVI, M., GOBBI, M., NOIRAY, M., LA FERLA, B., NICOTRA, F., SCHEPER, W., FLORES, O., MASSERINI, M., ANDRIEUX, K. and COUVREUR, P. Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease. *ACS NANO*, 6, 7, 5866–5879, 2012.
- LEE, K.J., HALL, I.H., MAR, E.C., STARNES, C.O., ETGEBALBY, S., WADDEL, T.G.,HADGRAF, R.I., RUFFNER, C.G. and WEIDNER, I. Sesquiterpene Antitumor Agents: Inhibitors of Celular Metabolism. *Science*, 196, 533-536, 1977.
- LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V.C.F., FESSI, H. and DEVISSAGUET, J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *STP Pharma Sci*, 9, 411-418, 1999.
- LEITE, E. A., VILELA, J. M. C., MOSQUEIRA, V. C. F. and ANDRADE, M. S. Poly-ε-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. *Microsc Microanal*, 11, 48-51, 2005.
- LEITE, E. A., GRABE-GUIMARÃES, A., GUIMARÃES, H. N., MACHADO-COELHO, G. L. L., BARRATT, G. and MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences*, 80, 1327-1334, 2007.
- LI, H., SONG, J.H., PARK, J.S. and HAN, K. Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. *Int J Pharm*, 258,11-19, 2003.
- LI, S. D. and HUANG, L.Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*, 5, 496-504, 2008.
- LI, S. and PALMER, A.F. Structure of small actin-containing liposomes probed by atomic force microscopy: effect of actin concentration and liposome size. *Langmuir*, 19, 7917-7925, 2004.
- LIENDO, A.; LAZARDI, K.; URBINA, J.A. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41(2), 197-205, 1998.
- LO PRESTI MS, RIVAR, H.W., BUSTAMANTE, J.M., FERNDEZ, A.R., ENDERS, J.E., FRETES, R., GEA, S. and PAGLINI-OLIVA, P.A. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Int J Antimicrob Agents*, 23, 634-636, 2004.
- LOPES, N.P. A essência da arnica. *Rev. Fapesp Pesquisa* 64, 42-44, 2001.
- LOPES, C. M., MARTINS-LOPES, P. and SOUTO, E. B. Nanoparticulate carriers (NPC) for oral pharmaceuticals and nutraceuticals. *Pharmazie*, 65, 75–82, 2010.

LOSA, C., MARCHAL-HEUSSLER, L., ORALLO, F., VILA JATO, J.L. and ALONSO, M.J. Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm Res*, 10 (1), 80-87, 1993.

LUIZE, P. S., TIUMAN, T. S., MORELLO, L. G., MAZA, P. K., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., DE MELLO, J. C. P. and NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 85-94, 2005.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F., SILVA, A. R., DO BEM, V. A. L., BAHIA, M. T., MARTINS-FILHO, O. A., DIAS, J. C. P., ALBAJAR-VIÑAS, P., TORRES, R. M. and LANA, M. Posttherapeutic cure criteria in chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 1283-1291, 2012.

MAGENHEIM, B. and BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharm Scie*, 1, 221-241, 1991.

MAHIDHARA, G., KANWAR, R. K. and KANWAR, J. R. Novel nanoplatform for oral delivery of anti-cancer biomacromolecules. *Int J Nanotechnol*, 9, 942-960, 2012.

MALVERN Instruments. Zetasizer 1000/2000/3000 PCS Theory Manual n. 0152, Inglaterra, 1996. (Manual do equipamento).

MARIZ, S. R., CERQUEIRALL, G. S., ARAÚJO, W. C., DUARTE, J. C., MELO, A.F. M., SANTOS, H. B., OLIVEIRA, K. O., DINIZ, M. F. F. M. and MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 372-378, 2006.

MARRETTO, J. P. M. and ANDRADE, S. G. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev Soc Bras Med Trop*, 27, 209-215, 1994.

MARTIN, M.B., GRIMLEY, J.S., LEWIS, J.C., HEATH, H.T., III, BAILEY, B.N., KENDRICK, H., YARDLEY, V., CALDERA, A., LIRA, R., URBINA, J.A., MORENO, S.N., DOCAMPO, R., CROFT, S.L. and OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J Med Chem*, 44, 909-916, 2001.

MARTINS, H. R., FIGUEIREDO, L. M., VALAMIEL-SILVA, J. C. O., CARNEIRO, C. M., MACHADO-COELHO, G. L. L., VITELLI-AVELAR, D. M., BAHIA, M. T., MARTINS-FILHO, O. A., MACEDO, A. M. and LANA, M. Persistence of PCR-positive tissue in benzimidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J of Antimicrob Chemotherapy*, 61, 1319-1327, 2008.

MAYA, J.D., CASSELS, B.K., ITURRIAGA-VASQUEZ, P., FERREIRA, J., FAUNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A*, 146, 601-620, 2007.

MAYA, J.D., MORELLO, A., REPETTO, Y., RODRIGUEZ, A., PUEBLA, P., CABALLERO, E., MEDARDE, M., NUNEZ-VERGARA, L.J., SQUELLA, J.A., ORTIZ, M.E., FUENTEALBA, J. and SAN, F.A. *Trypanosoma cruzi*: inhibition of parasite growth and respiration by

oxazolo(thiazolo).pyridine derivatives and its relationship to redox potential and lipophilicity. *Exp Parasitol*, 99, 1-6, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília, 149 p., 1ª ed., 2006.

MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C. and MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Reviews*, 53(2), 283-318, 2001.

MOHANRAJ, V.J. and CHEN, Y. Nanoparticles-a review. *Trop J Pharm Res*, 5(1), 561-573, 2006.

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

MOLINA, J., URBINA, J., GREF, R., BRENER, Z. and RODRIGUES JUNIOR, J.M. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. *J Antimicrob Chemother*, 47, 101-104, 2001.

MOLINA, I. International Congress of Tropical Medicine, disponível em http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/program_25_sept.html; Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene November 2013

MONTALVETTI, A., BAILEY, B.N., MARTIN, M.B., SEVERIN, G.W., OLDFIELD, E. and DOCAMPO, R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J Biol Chem*, 276, 33930-33937, 2001.

MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H. and ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, 385, 113-142, 2010.

MORILLA, M. J., MONTANARI, J. A., PRIETO, M. J., LOPEZ, M. O., PETRAY, P. B. and ROMERO, E. L. Intravenous liposomal benzimidazole as trypanocidal agent: Increasing drug delivery to liver is not enough. *Int J Pharm*, 278, 311-318, 2004.

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

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

MOSQUEIRA, V. C. F., LOISEAU, P. M., BORIES, C., LEGRAND, P., DEVISSAGUET, J. P. and BARRATT, G. Efficacy and Pharmacokinetics of Intravenous Nanocapsule Formulations of Halofantrine in *Plasmodium berghei* Infected Mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 1222-1228, 2004.

MOSQUEIRA, V. C. F., LEITE, E. A., BARROS, C. M., VILELA, J. M. C. and ANDRADE, M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: Characterization by atomic force microscopy. *Microsc Microanal*, 11, 36-39, 2005.

MOSQUEIRA, V. C. F., LEGRAND, P. and BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulations for parenteral delivery of halofantrine. *J Nanosci Nanotechnol*, 6, 3193-3202, 2006.

MUÑOZ, M. J., MURCIA, L. and SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 5-7, 2011.

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

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. and SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, 66, 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J. and CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 70, 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J. and CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75, 311-335, 2012

NITZ, N., GOMES, C., DE CASSIA, R.A., D'SOUZA-AULT, M.R., MORENO, F., LAURIA-PIRES, L., NASCIMENTO, R.J. and TEIXEIRA, A.R. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. *Cell*, 118,175-186, 2004.

OLIVEIRA, A.B., SAÚDE, D.A., PERRY, K.S.P., DUARTE, D.S., RASLAN, D.S., BOAVENTURA, M.A.D. and CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytother Res*, 10(4), 292-295, 1996.

OLIVEIRA, L. T., GARCIA, G. M., KANO, E. K., TEDESCO, A. C. and MOSQUEIRA, V. C. F. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: Application in pharmacokinetic and biodistribution studies. *J Pharm Biomed Anal*, 56, 70-77, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. OECD OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 1-14, 2001.

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

PACHECO, M.G., SILVA, C.F., SOUZA, E.M., BATISTA, M.M., SILVA, P.B., KUMAR, A., STEPHENS, C.E., BOYKIN, D.W. and SOEIRO, M.D.E.N. *Trypanosoma cruzi*: Activity of heterocyclic cationic molecules *in vitro*. *Exp Parasitol*, 123(1), 73-80, 2009.

PARKER, E. R. and SETHI, A. Chagas disease: Coming to a place near you. *Dermatol Clin*, 29, 53-62, 2011.

- PEREIRA, M. A., MOSQUEIRA V. C. F., CARMO, V. A. S., FERRARI C. S., REISA, E. C. O., RAMALDES, G. A. and CARDOSO, V. N. Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with ^{99m}Tc -HMPAO. *Nucl Med Commun*, 30(9), 749-755, 2009.
- PEREIRA, M. A., MOSQUEIRA, V. C. F., VILELA, J. M. C., ANDRADE, M. S., RAMALDES, G. A. and CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc -HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*, 33, 42-51, 2008.
- PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., BARBOSA, R.L., GUARALDO, A.M., FRANCO, R.M., DIAS, V.L. and PASSOS, L.A. Transmission of Chagas disease (American Trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res*. 59, 63-85, 2010.
- PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol*, 14, 225-281, 1986.
- PIÑÓN-SEGUNDO, E., GANEM-QUINTANAR, A., ALONSO-PÉREZ, V. and QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int J Pharm*, 294, 217-232, 2005.
- PINTO-ALPHANDARY, H., ANDREMONT, A. and COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. *Int J Antimicrob Agents*, 13, 155-168, 2000.
- PLAPIED, L., DUHEM, N., DES RIEUX, A. and PRÁT, V. R. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 16, 228-237, 2011.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, 1, 92-100, 2001.
- PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E. and ALONSO, M.J. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *Journal of Controlled Release*, 111, 299-308, 2006.
- PROKOP, A. and DAVIDSON, J. M. Nanovehicular intracellular delivery systems. *J Pharm Sci*, 97, 3518-3590, 2008.
- RAMACHANDRAN, R.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Synthesis and characterization of PEGylated calcium phosphate nanoparticles for oral insulin delivery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 88 (1), 41-48, 2009.
- RAMESAN, R. M. and SHARMA, C. P. Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery. *Expert Rev Med Devices*, 6, 665-676, 2009.
- RAO, G. C. S., SATISH KUMAR, M., MATHIVANAN, N. and RAO, M. E. B. Advances in nanoparticulate drug delivery systems. *Indian Drugs*, 41, 389-395, 2004.
- RASKIN, I., RIBNICKY, D. M., KOMARNYTSKY, S., ILIC, N., POULEV, A., BORISJUK, N., BRINKER, A., MORENO, D. A., RIPOLL, C., YAKOBY, N., O'NEAL, J. M., CORNWELL, T., PASTOR, I. and FRIDLINDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, 20, 522-531, 2002.

- RASSI, A., LUQUETTI, A.O, RASSI, A. JR., RASSI, G.G., RASSI, S.G., DA SILVA, I.G. and 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* 76(1), 58-61, 2007.
- RASSI A, JR., RASSI, A. and MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402, 2010.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613, 2001.
- RAWAT, M., SINGH, D. and SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biol Pharm Bull*, 29, 1790-1798, 2006.
- RAWAT, M., SINGH, D. and SARAF, S. Development and *in vitro* evaluation of alginate gel-encapsulated, chitosan-coated ceramic nanocores for oral delivery of enzyme. . *Drug Dev Ind Pharm*, 34, 181-188, 2008.
- REITHINGER, R., TARLETON, R. L., URBINA, J. A., KITRON, U. and GURTLER, R. E. Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap. *BMJ*, 338, 1044-1046, 2009.
- REIS, C.P., NEUFELD, R.J., RIBEIRO, A.J. and VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2, 8-21, 2006.
- REISENMAN, C. E., LAWRENCE, G., GUERENSTEIN, P. G., GREGORY, T., DOTSON, E. and HILDEBRAND, J. G. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerg Infect Dis*, 16, 400-405, 2010.
- REN, Y., ACUÑA, U.M., JIMÉNEZ, F., GARCÍA, R., MEJÍA, M., CHAI, H., *et al.*, Cytotoxic and NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*. *Tetrahedron*, 68, 2671-2678, 2012.
- RICHARD, J.V. and WERBOVETZ K.A. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Opin Chem Biol*. 14(4):447-455, 2010.
- RIVAROLA, H.W., PAGLINI-OLIVA, P.A. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 2, 43-52, 2002.
- RODRIGUEZ, E., TOWERS, G. H. N. and MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573-158, 1976.
- ROGER, E., LAGARCE, F., GARCION, E., BENOIT, J-P. Biopharmaceutical Parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine*, 5 (2), 287-306, 2010.
- ROMAÑA C. A area de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. *MEPRA*, 22, 16-30, 1935.
- ROMERO, E. L. and MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 576-588, 2010.

RÜNGELER, P., CASTRO, V., MORA, G., GÖREN, N., VICHNEWSKI, W., PAHL, H.L., MERFORT, I. and SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg Med Chem*, 7, 2343-2352, 1999.

SAEIDNIA, S., GOHARI, A. R. and HADDADI, A. Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: Lead compounds to design future trypanocidal drugs - A mini review. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 2013.

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

SANTOS, F.R, PENA, S.D.J and EPPLIN, J.T. Genetic & population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetic*, 90, 655-656, 1993.

SANTOS, S.M.B.P. Lactonas sesquiterpênicas-aplicações farmacológicas e quimiotaxonômicas. *Boletim SPQ*, 36, 41-43, 1989.

SANTOS, P. A., CASANOVA TURATI, I. C., TOMAZ, J. C. and PEPORINE LOPES, N. Quantification of furanoheliangolides by HPLC and GC, *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(3), 341-345, 2003.

SANTOS, M.D., GOBBO-NETO, L., ALBARELLA, L., SOUZA, G.E.P. and LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da Serra). *J Ethnopharmacol*, 96, 545-549, 2005.

SANTOS., POULIN, S. and HILDGEN, P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 87(4), 885-95, 2008.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. and MOSQUEIRA, V. C. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 560-575, 2010.

SARAF, S. Process optimization for the production of nanoparticles for drug delivery applications. *Emerg Infect Dis*, 6, 187-196, 2009.

SARDESAI, V. M. Herbal medicines: Poisons or potions? *J Lab Clin Med*, 139, 343-348, 2002.

SHARGEL, L., WU-PONG, S. AND YU, A.B.C. One-Compartment Open Model: Intravenous Bolus Administration. in: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 6^a, ed. ed. Stamford: Appleton & Lange, 768 p. 2012.

SAÚDE D.A. Estudo químico e atividade tripanossomicida de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. *Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 136 p., 1994.

SAÚDE, D. A., RASLAN, D. S., DE SOUZA FILHO, J. D. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpa*. *Fitoterapia LXIX*, 69(1), 90-91, 1998.

SAÚDE, D.A., BARRERO, A.F., OLTRA, J.E., JUSTÍCIA, J., RASLAN, D.S., SILVA, E.A. Atividade antibacteriana de furanoelíngolidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1), 7–10, 2002.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. E. and FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3), 455-465, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A., RASLAN, D.S and OLIVEIRA, A.B. *In Vitro* Antitumor Activity of Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha*. *Rev Bras Plant Med. In Press*. Maio 2014

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*, 26(5), 726-737, 2003.

SCHENK, M. and MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 22, 391-409, 2008.

SCHMIDT, T. J. Helenanolide-type sesquiterpene lactones - III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorg Med Chem*, 5, 645-653, 1997.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. *Curr Org Chem*, 3, 577–608, 1999.

SCHMIDT, T. J., NOUR, A. M., KHALID, S. A., KAISER, M. and BRUN, R. Quantitative structure--antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules*, 14, 2062-2076, 2009.

SCHNEIDER, B. H., DICKINSON, E. L., VACH, M. D., HOIJER, J. V. and HOWARD, L. V. Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum. *Biosens Bioelectron*, 15, 13-22, 2000.

SCHOFIELD, C.J., JANNIN, J. and SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 22, 583-588, 2006.

SCHOLES, P.D., COOMBES, A.G.A., ILLUM, L., DAVIS, S.S., VERT, M. and DAVIES, M.C. The preparation of sub-200 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Release*, 25, 145-153, 1993.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot Rev* 48(2), 121-594, 1982.

Secretaria de Vigilância Sanitária do Brasil, 2010. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaochagas.pdf>. acesso em maio 2013.

SEGURA, M.A., MOLINA, de R.E. and BASOMBRI, M.A. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89, 213-216, 1994.

SILVA, L.H.P., and NUSSENZEWEIG, V. Sobre uma cepa de *T.cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin Biol*, 20, 191-208, 1953.

SILVEIRA, A.C. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América: história de uma iniciativa internacional. In: OPAS, O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma Iniciativa Internacional, Organização Pan-Americana da Saúde, p.15-42, 2002.

SINHA, V.R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R. and TREHAN, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm*, 278, 1-23, 2004.

SOEIRO, M. N. C., DANTAS, A. P., DALIRY, A., DA SILVA, C. F., BATISTA, D. G. J., DE SOUZA, E. M., OLIVEIRA, G. M., SALOMÃO, K., BATISTA, M. M., PACHECO, M. G. O., DA SILVA, P. B., SANTA-RITA, R. M., MENNA BARRETO, R. F. S., BOYKIN, D. W. and DE CASTRO, S. L. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 301-310, 2009.

SOEIRO, M. N. C. and DE CASTRO, S. L. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *In Vitro* and *In Vivo* studies. *Open Med Chem J*, 5, 21-30, 2009.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R. and RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70 (1-2), 1-20, 2001.

SOUZA, W., SANT'ANNA, C. and CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 67-124, 2009.

SULSEN, V. P., FRANK, F. M., CAZORLA, S. I., ANESINI, C. A., MALCHIODI, E. L., FREIXA, B., VILA, R., MUSCHIETTI, L. V. and MARTINO, V. S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2415-2419, 2008.

SULSEN, V. P., FRANK, F. M., CAZORLA, S. I., BARRERA, P., FREIXA, B., VILA, R., SOSA, M. A., MALCHIODI, E. L., MUSCHIETTI, L. V. and MARTINO, V. S. Psilostachyin C: A natural compound with trypanocidal activity. *Int J Antimicrob Agents*, 37, 536-543, 2011.

STOPPANI, A. O. M. The chemotherapy of Chagas disease. *Quimioterapia de la enfermedad de Chagas*, 59, 147-165, 1999.

STORM, G., BELLLOT, S. O., DAEMEN, T. and LASIC, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Deliv Rev*, 17, 31-48, 1995.

SUASNÁBAR, S.A., ARIAS, E., STREIGER, M. PIACENZA, M., INGARAMO, M., DEL BARCO, M. and AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 42 (2), 99-109, 2000.

SWARBRICK J, BOYLAN J. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 2002.

TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*, 19, 447-451, 2003.

TOBÍO, M., SÁNCHEZ, A., VILA, A., SORIANO, I., EVORA, C., VILA-JATO, J. L. and 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*, 18, 313-323, 2000.

TOLEDO, M. J., GUILHERME, A. L. F., DA SILVA, J. C., DE GASPERI, M. V., MENDES, A. P., GOMES, M. L. and DE ARAUJO, S. M. *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 39, 283-290, 1997

TOLEDO, M. J., BAHIA, M. T., CARNEIRO, C. M., MARTINS-FILHO, O. A., TIBAYRENC, M., BARNABÉ, C., TAFURI, W. L. and LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 223-230, 2003.

TOLEDO, M.J., BAHIA, M.T., CARNEIRO, C.M., MARTINS-FILHO, O.A., TIBAYRENC, M., BARNABÉ, C., TAFURI, W.L. and LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 223-230, 2003.

TORCHILIN, V. P. and TRUBETSKOY, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv Drug Deliv Rev*, 16, 141-155, 1995.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*, 11, S81-S91, 2000.

TORCHILIN, V. P., LUKYANOV, A. N., GAO, Z. and PAPAHADJOPOULOS-STERBERG, B. Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6039-6044, 2003.

UCHIYAMA, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *J Health Science*, 55, 31-39, 2009.

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

URBINA, J. A., MORENO, B., VIERKOTTER, S., OLDFIELD, E., PAYARES, G., SANOJA, C., BAILEY, B. N., YAN, W., SCOTT, D. A., MORENO, S. N. J. and DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *J Biol Chemistry*, 274, 33609-33615, 1999.

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

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

URBINA, J.A. New advances in the management of a long-neglected disease. *Clin Infect Dis* 49(11), 1685-1687, 2009.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115, 55-68, 2010.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, 2001.

VALLI, M., PIVATTO, M., DANUELLO, A., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D. H. S., CAVALHEIRO, A. J., ARAÚJO, A. R., FURLAN, M., LOPES, M. N. and DA SILVA BOLZANI, V. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quimica Nova*, 35, 2278-2287, 2012.

VAUTHIER, C. and BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res*, 26(5),1025-1058, 2009.

VAUTHIER, C. and COUVREUR, P. Developing nanoparticle drug carriers. *Drugs Made Ger*, 19, 35-42, 2007.

VEIGA, JR. V. F., PINTO, A. C. AND MACIEL, M. A. M., Medicinal plants: Safe cure? Plantas medicinais: *Cura segura?* 28 (3),519-528, 2005.

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

VIOTTI, R., VIGLIANO, C., LOCOCO, B., BERTOCCHI, G., PETTI, M., ALVAREZ, M.G., POSTAN, M. and ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*, 144, 724-734, 2006.

VIOTTI, R., VIGLIANO, C., LOCOCO, B., ALVAREZ, M.G., PETTI, M., BERTOCCHI, G. and ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(2):157-163,2009.

VICHNEWSKI, W., TAKAHASHI, A.M., TUCCITURCO NASI, A.M., RODRIGUES, D.C., GONCALVES, G., DIAS, D.A., *et al.*; Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelii*, *E. Goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. *Phytochemistry*, 28, 1441-1451,1989.

VOLLER, A., BIDWELL, D.E and BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ*, 53, 55-65,1976.

WHO. World Health Organization. *Chagas disease (Americatrypanosomiasis)Chagas'Disease*. http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/index.html. 01/04/2012. 2010

WHO. World Health Organization. *Chagas disease (American trypanosomiasis).Fact sheet N°340*. Updated March, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2012.

WILKINSON SR, TAYLOR MC, HORN D, KELLY JM and CHEESEMAN I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(13):5022-5027, 2008.

- WOODRUFF, M.A. and HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*, 35, 1217-1256, 2010.
- YAMANAKA, Y.J. and LEONG, K. W. Engineering strategies to enhance nanoparticle mediated oral delivery. *J Biomater Sci Polym Ed*, 19 (12), 1549-1570, 2008.
- YANG, X., SU, J., HE, Y., LIU, H., LI, H. and ZHANG, W. Simultaneous determination of three sesquiterpene lactones from Herba Inula extract in rat plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 903, 40-45.
- YARDLEY, V. and CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Am J Trop Med Hyg*, 61(2), 193-197, 1999.
- YOSHIHARA, E., TACHIBANA, H. and NAKAE, T. Trypanocidal activity of the stearylamine-bearing liposome in vitro. *Life Sci*, 40, 2153-2159, 1987.
- ZAKERI-MILANI, P., LOVEYMI, B.D., JELVEHGARI, M. and VALIZADEH, H. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 174-181, 2013.
- ZHANG, Q., SHEN, Z., NAGAI, T. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int J Pharm*, 218 (1-2), 75-80, 2001.
- ZELEDON, N. R. and SILVA, S. Attempts to culture the parasitic stage of *Dermatobia hominis* (L.Jr.) *in vitro* (Diptera: Cuterebridae), *J Parasitol*, 73(5), 907-909, 1987.
- ZILI, Z., SOUAD, S., FESSI, H. Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm*, 294, 261-267, 2005.

10.0 Anexos