UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto
5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) em
meio aquoso e em sistema de liberação de droga**

Zumira Aparecida Carneiro

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) em meio aquoso e em sistema de liberação de droga

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutora em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientada: Zumira Aparecida Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Victor Marcelo
Deflon

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Zumira Aparecida

Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditioicarbazato) em meio aquoso e em sistema de liberação de droga . Ribeirão Preto, 2014. 152p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Deflon, Victor Marcelo.

1. Ditiocarbazato. 2. Doença de Chagas. 3. Nanopartícula lipídica sólida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Zumira Aparecida Carneiro

Título do trabalho: Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) em meio aquoso e em sistema de liberação de droga

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientador: Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha filha **Karen Mansini** que encanta minha vida, florindo meus dias com seus sorrisos, tornando a minha vida mais bela e intensa. “Amo-te mais que tudo”

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Deus** por este trabalho que consegui desempenhar. *“o melhor agradecimento pela dádiva laboral é desempenhar nosso trabalho com integridade, com qualidade, inteiramente centrados nos instantes de sua realização.”*

Aos meus pais **Ângela** e **Sebastião**: meu eterno agradecimento, pois, se hoje obtenho esse título, é consequência direta de tudo que recebi de vocês. “Obrigada meus amores.”

Ao professor Dr. **Victor Marcelo Deflon** por ter me recebido, aberto às portas do seu laboratório e me orientado com tanto respeito e seriedade. Obrigada, pela sua confiança depositada em mim.

Ao professor Dr. **João Santana da Silva**, Dra. **Renata Sesti Costa** e Dra. **Carla Duque Lopes** pela valiosa coorientação. O convívio destes anos me ensinaram mais do que a realização desta pesquisa. Levarei por toda a vida!

Agradecimentos

A tese que se apresenta deve-se a um esforço contínuo de aprendizagem, dedicação e empenho pessoal, que sem apoio das seguintes pessoas não seria possível de concretizar:

Aos pós-graduandos do laboratório “Grupo de Química Inorgânica Estrutural e Biológica”, pelo companheirismo.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação da IQSC – USP, também pelo apoio no decorrer do desenvolvimento do doutorado.

Ao Prof. Dr. Pedro Ivo da Silva Maia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, pelo auxílio na síntese dos compostos orgânicos e inorgânicos.

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez e Me. Tatiana Aparecida Pereira pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos farmacotécnicos.

Dra. Valquíria Polisel Jabor pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos farmacocinéticos.

Funcionários da Seção de pós-graduação da FCFRP – USP, pelo apoio no decorrer do desenvolvimento do doutorado.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro ao projeto que culminou com o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Agradeço a todas as pessoas que me acompanharam durante a realização deste trabalho, por me proporcionarem um ambiente de estímulo, de amor e de partilha, respeito e seriedade. Por me ajudarem a converter toda a grandiosidade de cada minuto, cada dia, cada mês, cada ano, cada pensar e agir, nesta tese, que guarda mais que uma valiosa contribuição científica.

MUITO OBRIGADA!!!

Sem essa embriaguez singular de que zombam todos os que mantêm afastados da ciência, sem essa paixão, sem essa certeza de que “milhares de anos se escoaram antes de você ter acesso à vida e milhares se escoarão em silêncio” se você não for capaz de formular aquela conjectura; sem isso, você jamais possuirá a vocação de cientista e melhor será que se dedique a outra atividade.

Max Weber (em Ciências políticas)

RESUMO

CARNEIRO, Z. A. Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) em meio aquoso e em sistema de liberação de droga, 2014. 152f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o causador da doença de Chagas e continua sendo um grave problema de saúde pública, principalmente nas regiões mais pobres da América Latina. Na busca por novas drogas terapêuticas contra *T. cruzi*, nós avaliamos a atividade do composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) (H_2bdtc) tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta espécie foi caracterizada por análise elementar, espectroscopia UV-visível, infravermelho, RMN e espectrometria de massas. Nos experimentos biológicos, o composto H_2bdtc em suspensão e/ou encapsulado em nanopartícula lipídica sólida (NLS) foi comparado com um dos medicamentos empregados atualmente, o benzonidazol (BZN). Utilizando-se o composto H_2bdtc encapsulado em NLS observou-se: (a) redução de forma eficaz da parasitemia em camundongos, em concentração 100 vezes mais baixa do que aquela normalmente empregada para Benzonidazol (cl clinicamente aplicada a uma concentração de $400 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); (b) diminuição da inflamação e das lesões de fígado e do coração e (c) resultou em 100,0% de sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi* após 60 dias. Para fins de elucidação do possível mecanismo de ação do composto H_2bdtc , estudo de interação com o DNA e com a albumina do soro Humano (HSA) foram realizados. Baseado nos dados relacionados à atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto H_2bdtc , este pode ser tomado como potente agente tripanocida e o estudo desenvolvido neste projeto pode concorrer ao uso de H_2bdtc como possível nova droga a ser utilizada contra Doença de Chagas.

Palavras Chaves: Ditiocarbazato, Doença de Chagas, Nanopartículas lipídicas sólidas.

ABSTRACT

CARNEIRO, Z. A. *In Vitro* and *In Vivo* Trypanocidal Activity of 5-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-pyrazoline-1-(S-benzylthiocarbamate) (H₂bdtc) free and loaded in drug delivery system. 2014. 152f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The parasite *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease, which remains a serious public health concern and continues to victimize thousands of people, primarily in the poorest regions of Latin America. In the search for new therapeutic drugs against *T. cruzi*, here we have evaluated both the *in vitro* and the *in vivo* activity of 5-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-pyrazoline-1-(S-benzylthiocarbamate) (H₂bdtc). This compound was characterized by elemental analysis, UV-visible spectroscopy, infrared, NMR and mass spectrometry. Biological experiments were conducted with H₂bdtc as a free compound or encapsulated into solid lipid nanoparticles; we compared the results with those achieved by using the currently employed drug, benznidazole. H₂bdtc encapsulated into solid lipid nanoparticles (a) effectively reduced parasitemia in mice at concentrations 100 times lower than that normally employed for benznidazole (clinically applied at a concentration of 400 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); (b) diminished inflammation and lesions of the liver and heart; and (c) resulted in 100,0% survival of mice infected with *T. cruzi*. Biological mechanism elucidation of H₂bdtc compound was analyzed based on the interaction with DNA and Human Serum Albumin (HSA). Based on the data related to the *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of H₂bdtc it was taken as potent trypanocidal agent. Studies developed on this project allow concluding that H₂bdtc is a possible new drug to be used against Chagas Disease.

Keywords: Dithiocarbamate, Chagas Disease, Solid lipid nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FOTO ILUSTRATIVA DO TRIATOMÍNEO (BARBEIRO). FONTE: < HTTP://BESTPRACTICE.COM/ /MONOGRAPH/PATHOPHYSIOLOGY.HTML > ACESSADO EM: 08/09/2014.	27
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO BIOLÓGICO DO <i>T. CRUZI</i> NO INTERIOR DO INSETO VETOR E DO MAMÍFERO HOSPEDEIRO [2].....	28
FIGURA 3: A) SINAL DE ROMANÃ (<i>T. CRUZI</i> PENETRA ATRAVÉS DA CONJUNTIVA), (B) CHAGOMA INFECTANTE (<i>T. CRUZI</i> PENETRA ATRAVÉS DA PELE).....	30
FIGURA 4: (A) AUMENTO DO CORAÇÃO (IMAGEM À DIREITA) DESENCADEADO PELA DOENÇA DE CHAGAS EM RELAÇÃO A UM CORAÇÃO SADIO (IMAGEM À ESQUERDA). (B) TECIDO CARDÍACO HUMANO INFECTADO COM <i>T. CRUZI</i> . PARASITOS ESTÃO REPRESENTADOS POR PONTOS PRETOS. SETA INDICA UM NINHO, DE AMASTIGOTA (FORMA INTRACELULAR DO PARASITO) NO TECIDO CARDÍACO INFECTADO.	31
FIGURA 5: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS DISPONÍVEIS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: NFX E BZN.....	32
FIGURA 6: MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS BENZONIDAZOL E NIFURTIMOX. FONTE: [13].	33
FIGURA 7: TAUTOMERISMO DE DITIOCARBAZATO (TIONA E TIOL).	35
FIGURA 8: COMPOSTOS ORGÂNICOS: (A) H ₂ L1A (S-BENZIL-B-N (2-HIDROXIFENILETILIDINA) DITIOCARBAZATO), (B) H ₂ L1B S-4-NITROBENZIL-B-N-(2-HIDROXIFENILETILIDINA) DITIOCARBAZATO, (C) H ₂ L ^{2A} 5-HIDROXI-3-METIL-5-FENIL-1-PIRAZOLINA (S-BENZILDITIOCARBAZATO) E (D) H ₂ L ^{2B} 5-HIDROXI-3-METIL-5-FENILPIRAZOLINA-1 (S-4-NITROBENZILDITIOCARBAZATO) [18].....	37
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DA NLS [40].....	39
FIGURA 10: ESTRUTURA MOLECULAR PROPOSTA PARA O COMPOSTO H ₂ BDTC.....	42
FIGURA 11: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS DE MO NÃO INFECTADAS (A) E IMAGENS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS DE MO INFECTADAS COM <i>T. CRUZI</i> FORMA AMASTIGOTA (INTRACELULAR) (B).	49
FIGURA 12: DISPOSITIVO DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO AMICON ULTRA 4 (MILLIPORE).....	53
FIGURA 13: ESPECTRO DE ¹ H-RMN DO COMPOSTO H ₂ BDTC (400 MHz, CD ₂ CH ₂).	69
FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL PARA O COMPOSTO H ₂ BDTC, EM ACETONITRILA (1,0 x 10 ⁻⁴ M).....	71

FIGURA 15: DIAGRAMA DE ORBITAL MOLECULAR SIMPLIFICADO DEMONSTRANDO AS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS $N-\pi^*$ E $\pi-\pi^*$	72
FIGURA 16: REPRESENTAÇÃO DOS ORBITAIS HOMO E LUMO.	73
FIGURA 17: TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS CALCULADAS POR DFT PARA AO COMPOSTO H_2BDTC	74
FIGURA 18: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (cm^{-1}), REGIÃO DE 4000 – 2000 cm^{-1} , PARA O COMPOSTO H_2BDTC , (---) PASTILHA DE KBr E (---) EM SOLUÇÃO DE DICLOROMETANO.....	75
FIGURA 19: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (cm^{-1}), REGIÃO DE 2000 A 500 cm^{-1} , PARA O COMPOSTO H_2BDTC EM SOLUÇÃO DE DICLOROMETANO.....	76
FIGURA 20: ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO ELETRÔNICA NO MODO NEGATIVO, PARA O COMPOSTO H_2BDTC . OS ESPECTROS DE MASSAS FORAM OBTIDOS EM METANOL.	78
FIGURA 21: ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO ELETRÔNICA NO MODO POSITIVO, PARA O COMPOSTO H_2BDTC . OS ESPECTROS DE MASSAS FORAM OBTIDOS EM METANOL.	79
FIGURA 22: DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DAS NLSS CONTENDO O COMPOSTO H_2BDTC	82
FIGURA 23: MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DE $H_2BDT-NLS$ (A) 2 μm X 2 μm IMAGEM TRIDIMENSIONAL. (B) 2 μm X 2 μm IMAGEM PLANAR.	83
FIGURA 24: DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DAS NLSS LIOFILIZADAS CONTENDO H_2BDTC	85
FIGURA 25: A) PORCENTAGEM DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO COMPOSTO H_2BDTC LIVRE E ENCAPSULADO SOBRE A CEPA Y DO <i>T. CRUZI</i> , TESTADA COMO DESCRITO EM MATERIAIS E MÉTODOS. B) PORCENTAGEM DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO H_2BDTC LIVRE E ENCAPSULADO EM NPS SOBRE CÉLULAS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS. AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO E SUA VIABILIDADE FOI TESTADA 24 H APÓS PELA ADIÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO.....	86
FIGURA 26: ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO H_2BDTC LIVRE OU ENCAPSULADO EM NLS E BZN CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DA CEPA Y DE <i>T. CRUZI</i> , ANÁLISE QUANTITATIVA DE PARASITOS POR CÉLULAS DE MO.	88
FIGURA 27: AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA H_2BDTC LIVRE E $H_2BDTC-NLS$ (CONCENTRAÇÕES 4, 40 E 80MM) (___) TAXA DE PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> E TRATADOS COM PBS (___) TAXA DE PARASITEMIA DE	

CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> E TRATADOS DE H ₂ BDTC LIVRE. (____) TAXA DE PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> E TRATADOS COM H ₂ BDTC-NLS. A PARASITEMIA FOI MONITORADA NOS DIAS 7, 9, 11 E 13 APÓS A INFECÇÃO. A MÉDIA + EPM É MOSTRADA E É REPRESENTATIVA DE TRÊS EXPERIÊNCIAS INDEPENDENTES (N = 7). DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM O H ₂ BDTC LIVRE. O TRATAMENTO ESTATÍSTICO FOI DADO ATRAVÉS DO TESTE <i>T</i> STUDENT: ** P <0,01 E *** P <0,001.	90
FIGURA 28: PARASITEMIA (A) E SOBREVIDA (B) DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> E TRATADOS COM H ₂ BDTC E H ₂ BDTC-NLS. CAMUNDONGOS SWISS (7 POR GRUPO) FORAM INFECTADOS COM 2000 FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y DE <i>T. CRUZI</i> E A PARTIR DO 1º DIA DE PARASITEMIA PATENTE (5º DIA DE INFECÇÃO), OS CAMUNDONGOS FORAM TRATADOS POR GAVAGEM COM 4,0 µMOL/KG DOS COMPOSTOS H ₂ BDTC-LIVRE E H ₂ BDTC NLS DIARIAMENTE POR 10 DIAS. O CONTROLE NEGATIVO FOI TRATADO COM PBS. O BZN (4,0 E 400MMOL/KG) FOI USADO COMO O TRATAMENTO DE REFERÊNCIA. A PARASITEMIA FOI ACOMPANHADA NOS DIAS 7, 9, 11 E 13 APÓS A INFECÇÃO.	92
FIGURA 30: QUANTIFICAÇÃO DE NÚCLEOS CELULARES, POR 50 UM ² DO TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS NÃO TRATADOS E TRATADOS.	95
FIGURA 31: AVALIAÇÃO DA LESÃO CARDÍACA ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CK-MB.....	96
FIGURA 32: A QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE TECIDOS CARDÍACOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR PCR NA FASE AGUDA DA DOENÇA. .	97
FIGURA 33: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE TRANSAMINASE GLUTÂMICO PIRÚVICA - TGP (U/ML), PARA CAMUNDONGOS SWISS (7 POR GRUPO) INFECTADOS COM 2000 FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y DE <i>T. CRUZI</i> E TRATADOS POR GAVAGEM COM 4,0 µMOL/KG DO COMPOSTO H ₂ BDTC-LIVRE, H ₂ BDTC-NLS E BZN DIARIAMENTE POR 10 DIAS. O CONTROLE NEGATIVO FOI TRATADO COM PBS. CADA PONTO É A MÉDIA + SEM E É REPRESENTATIVA DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES (N = 7). DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS COM RELAÇÃO AO CONTROLE (P <0,05) SÃO INDICADOS POR	98
FIGURA 34: EFEITO DO H ₂ BDTC ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NA REDUÇÃO DOS DANOS NO FÍGADO CAUSADOS PELO PARASITA <i>T. CRUZI</i> (A) SECÇÕES REPRESENTATIVAS DO FÍGADO 21 DIAS APÓS A INFECÇÃO. (B) QUANTIFICAÇÃO DE	

NÚCLEOS CELULARES POR 50 μm^2 DE TECIDO DE ANIMAIS NÃO TRATADOS E TRATADOS. O CONTROLE NEGATIVO FOI TRATADO COM PBS.	99
FIGURA 35: HISTOPATOLÓGICA DE CORTE DE CORAÇÃO DE CAMUNDONGO SWISS INFECTADO PELO <i>T. CRUZI</i> NO 120º DIA PÓS-INFECÇÃO CORADO POR H&E. PODE SE OBSERVAR EXTENSO INFILTRADO INFLAMATÓRIO COM CÉLULAS MONONUCLEARES. AUMENTO DE 400 X. TRATAMENTO VIA ORAL DURANTE 30 DIAS CONSECUTIVOS COM 400 MMOL/KG/DIA (DOSE USADA CLINICAMENTE), 4,0 MMOL/KG/DIA DE BZN OU 4,0 MMOL/KG/DIA DO COMPOSTO H_2BDTC - LIVRE E H_2BDTC -NLS. (A) ANIMAL NAIVE (NÃO INFECTADO), (B) ANIMAL INFECTADO TRATADO APENAS COM SOLUÇÃO SALINA (PBS), (C) ANIMAL TRATADO COM BZN^+ 400,0 MMOL/KG/DIA, (D) ANIMAL TRATADO COM BZN^- 4,0 MMOL/KG/DIA, (E) ANIMAL TRATADO COM O COMPOSTO H_2BDTC -LIVRE 4,0 MMOL/KG/DIA E (F) ANIMAL TRATADO COM O COMPOSTO H_2BDTC -NLS 4,0 MMOL/KG/DIA.	102
FIGURA 36: QUANTIFICAÇÃO DE NÚCLEOS CELULARES, POR 50 μm^2 DO TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS NÃO TRATADOS E TRATADOS. * DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA COM RELAÇÃO AO GRUPO INFECTADO SEM TRATAMENTO ($P < 0,05$). ...	103
FIGURA 37: A QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE TECIDOS CARDÍACOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR PCR NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA.	104
FIGURA 38: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA HSA, DIVIDIDA EM TRÊS PRINCIPAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO O DOMÍNIO I ESTÁ EM TONS DE AMARELO E VERDE (IA E IB RESPECTIVAMENTE), O DOMÍNIO II EM TONS DE VERMELHO E ROSA (IIA A IIB RESPECTIVAMENTE) E O DOMÍNIO	107
FIGURA 39: ESPECTRO DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA HSA NA PRESENÇA DO COMPOSTO H_2BDTC A 310 K; $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ E $[\text{HSA}] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ E $[\text{H}_2\text{BDTC}] =$ 0,24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ - 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	110
FIGURA 40: CURVAS DE STERN-VOLMER DA SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA HSA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO H_2BDTC , COM $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ E $\lambda_{\text{em}} = 330$ NM, TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO 295, 300, 305 E 310 K.....	111
FIGURA 41: CURVAS DE STERN-VOLMER DA SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA HSA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO H_2BDTC , COM $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ E $\lambda_{\text{em}} = 330$ NM, TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO 305 K.	112

FIGURA 42: REGRESSÃO LINEAR PARA AS MENORES CONCENTRAÇÕES DA CURVA DE STERN-VOLMER. COM $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ NM}$ E $\lambda_{\text{EM}} = 330 \text{ NM}$, EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310 K).	113
FIGURA 43: REGRESSÃO LINEAR PARA AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DA CURVA DE STERN-VOLMER COM $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ NM}$ E $\lambda_{\text{EM}} = 330 \text{ NM}$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310 K).	114
FIGURA 44: GRÁFICO DO $\text{LOG}[(F_0-F)/F]$ VERSUS $\text{LOG}[\text{SUPRESSOR}]$ OBTIDO PARA AS MENORES CONCENTRAÇÕES, PARA $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ NM}$ $\lambda_{\text{EM}} = 330 \text{ NM}$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310 K).	116
FIGURA 45: GRÁFICO DO $\text{LOG}[(F_0-F)/F]$ VERSUS $\text{LOG}[\text{SUPRESSOR}]$ OBTIDO PARA AS MAIORES CONCENTRAÇÕES, PARA $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ NM}$ $\lambda_{\text{EM}} = 330 \text{ NM}$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310 K).	116
FIGURA 46: GRÁFICO DE VAN'T HOFF REFERENTE À INTERAÇÃO DA HSA COM H_2BDTC . ..	118
FIGURA 47: GRÁFICO DE VAN'T HOFF REFERENTE À INTERAÇÃO DA HSA COM H_2BDTC . ..	119
FIGURA 48: POSSÍVEIS PROCESSOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE ALBUMINA E H_2BDTC	121
FIGURA 49: PERFIL DE DECAIMENTO MONOEXPONENCIAL DA FLUORESCÊNCIA DA HSA, NA PRESENÇA DO COMPOSTO H_2BDTC , NA PROPORÇÃO (1:1-8) RESPECTIVAMENTE, $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ NM}$ E $\lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ NM}$	122
FIGURA 50: ESPECTRO DE DC DA HSA LIVRE, CONCENTRAÇÃO= $1,0 \times 10^{-6} \text{ MOL.L}^{-1}$ EM TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ MOL.L}^{-1}$, PH 7,4 E TEMPERATURA DE 25° C	124
FIGURA 51: ESPECTRO DE DC DA HSA NA PRESENÇA DO COMPOSTO H_2BDTC , RAZÃO MOLAR DE COMPOSTO H_2BDTC / PROTEÍNAS DE 10:1, A PH 7,4 , TEMPERATURA DE 25° C	125
FIGURA 52: TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO COMPOSTO H_2BDTC ($500 \mu\text{M}$) EM TAMPÃO TRIS-HCL, APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE CT-DNA $2,2 \times 10^{-4} \text{ MOL. L}^{-1}$ (10 EM $10 \mu\text{L}$).	127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VALORES DE IC_{50} DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS LIVRES E DOS SEUS COMPLEXOS SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS [18].....	36
TABELA 2: RESUME A PUREZA E PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS PARA PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	44
TABELA 3: SEQUÊNCIAS INDICADORAS DOS PRIMERS CRUZI 1, CRUZI 2 E CRUZI 3.	60
TABELA 4: SEQUÊNCIAS INDICADORAS DOS PRIMERS GAPDH FORWARD E REVERSE.	60
TABELA 5: VOLUME DE PRIMERS E SONDAS ADICIONADAS NA PREPARAÇÃO DO MIX UTILIZADO NA AMPLIFICAÇÃO DE T. CRUZI. * Mix (2x): TAQMAN PCR MASTER MIX CONTENDO DNA-POLIMERASE AMPLITAQ GOLD, GLICOSILASE DNA-URACIL E dTNPs COM dUTP.....	61
TABELA 6: VOLUME DE PRIMERS E SONDAS ADICIONADAS NA PREPARAÇÃO DO MIX UTILIZADO NA AMPLIFICAÇÃO DO NORMALIZADOR GAPDH. * Mix (2x): TAQMAN PCR MASTER MIX CONTENDO DNA-POLIMERASE AMPLITAQ GOLD, GLICOSILASE DNA-URACIL E dTNPs COM dUTP.	61
TABELA 7: RESULTADO DE ANÁLISE ELEMENTAR PARA O COMPOSTO H_2BDTC . OS VALORES OBTIDOS SÃO CONSISTENTES COM A ESTRUTURA PROPOSTA.	68
TABELA 8: DADOS DO ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO EM (cm^{-1}) PARA O COMPOSTO H_2BDTC EM DICLOROMETANO, TENTATIVAS DE ATRIBUIÇÕES.....	76
TABELA 9: ATIVIDADE TRIPANOCIDA, DO COMPOSTO H_2BDTC SOBRE AS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS PARA TRÊS CEPAS DIFERENTES, Y, CL BRENER E COLOMBIANA. ...	80
TABELA 10: CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO H_2BDTC ENCAPSULADO EM NLSS.	81
TABELA 11: REGRESSÃO LINEAR PARA AS MENORES CONCENTRAÇÕES DA CURVA DE STERN-VOLMER COM $\lambda_{exc} = 280$ NM E $\lambda_{em} = 330$ NM, EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310 K).....	113
TABELA 12: REGRESSÃO LINEAR PARA AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DA CURVA DE STERN-VOLMER COM $\lambda_{exc}=280$ NM E $\lambda_{em}=330$ NM, EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO (295, 300, 305 E 310K).....	114
TABELA 13: CONSTANTES DE LIGAÇÃO (K_B1 E K_B2) E NÚMEROS DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO DO SUPRESSOR (N)	117
TABELA 14: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS: VARIAÇÃO DE ENTALPIA (ΔH°); VARIAÇÃO DE ENTROPIA DO SISTEMA (ΔS°) E VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE (ΔG°).	119
TABELA 15: MOSTRA QUE O PROCESSO É BIEXPONENCIAL E O TEMPO DE VIDA DIMINUI EM FUNÇÃO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE H_2BDTC , CONFORME A FIGURA 49.	122

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1	48
EQUAÇÃO 2	52
EQUAÇÃO 3	53
EQUAÇÃO 5	64
EQUAÇÃO 6	108
EQUAÇÃO 7	109
EQUAÇÃO 8	115
EQUAÇÃO 9	117
EQUAÇÃO 10	118
EQUAÇÃO 11	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A_{em}	Absorbância no comprimento de onda de emissão
A_{ex}	Absorbância no comprimento de onda de excitação
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
BZN	Benznidazole (Benzonidazol)
CD	Circular Dichroism (Dicroísmo Circular)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT-DNA	Calf Thymus DNA (DNA de Timo de Bezerro)
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxirribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
ELL	Liquid-liquid Extraction (extração líquido-líquido)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
LP(S)	Lone pair electrons (par de elétrons desemparelhados)
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
F_o	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
FDA	Food and Drug Administration – USA
H_2bdtc	5-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-pyrazoline-1-(S-benzyl dithiocarbazate)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Albumina do soro humano
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular ocupado de mais alta energia)
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
KDa	Quilo Dalton
K_b	Constante de ligação aparente do supressor à HSA
K_q	Constante de velocidade de supressão bimolecular
K_{sv}	Constante de supressão bimolecular de Stern-Volmer
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital (Orbital molecular desocupado de mais baixa energia)
MO	Macrófago
MS/ESI	Espectrometria de massas com ionização por “ <i>electrospray</i> ”
mL	Mililitro

mg	Miligrama
n	Número de potenciais sítios de ligação à HSA
NFX	Nifurtimox
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)
R	Constante dos gases ($8,31447 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR (Transcriptase Reversa – PCR)
pmol	Picomol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio cultura)
T	Temperatura
DFT	Density Functional Theory (Teoria do funcional da densidade)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hydrochloride (Tris(Hidroximetil)aminometano hidrocloreto))
Trp	Triptofano
μmol	micromol
μL	microlitro
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WHO	World Health Organization
[Q]	Concentração dos complexos
ε	Absortividade molar
τ	Tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado na presença de supressor
τ_0	Tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado na ausência de supressor
λ	Comprimento de onda (nm)
π	Ligação PI
σ	Ligação sigma
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
T_0	Tempo de meia vida médio das moléculas na ausência do supressor
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Doença de Chagas.....	26
1.1.2. Transmissão da doença de Chagas.....	27
1.1.3. Patogênese da doença de Chagas	29
1.2. Tratamento da doença de Chagas	32
1.3. Ditiocarbazatos derivados de bases de Schiff como agentes tripanocida	35
1.4. Sistema de liberação nanoparticulado	38
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivos gerais.....	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Reagentes e solventes	44
3.2. Síntese e caracterização do composto H ₂ bdtc	45
3.2.1. Síntese do composto H ₂ bdtc.....	45
3.2.2. Análise elementar.....	45
3.3. Instrumentação para caracterização do H ₂ bdtc	46
3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear- RMN	46
3.3.2. Espectroscopia eletrônica UV-Visível.....	46
3.3.3. Espectroscopia na região do infravermelho	46
3.3.4. Espectrometria de massas em modo positivo e negativo (ESI-TOF)	47
3.4. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica <i>in vitro</i>	47
3.4.1. Cepa de <i>T. cruzi</i>	47
3.4.2. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra as formas tripomastigotas das cepas Y, Cl Brener e colombiana	48
3.4.3. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas amastigotas.....	49
3.4.4. Citotoxicidade dos fármacos <i>in vitro</i>	50
3.5. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)	50

3.5.1. Obtenção da NLS.....	51
3.5.2. Caracterização físico-química das NLSs.....	51
3.5.3. Coeficiente de Partição de H ₂ bdtc (K _{octanol/água})	54
3.6. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica <i>in vivo</i>	55
3.6.1. Toxicidade Aguda <i>in vivo</i>	55
3.6.2. Curva concentração e efeito	55
3.6.3. Inoculação dos animais e tratamento – Fase aguda e Fase Crônica.....	56
3.6.4. Parasitemia e mortalidade.....	57
3.6.5. Avaliação da lesão hepática — Dosagem da enzima transaminase glutâmica pirúvica (TGP).....	57
3.6.6. A atividade sérica da Creatina Quinase Isoforma MB (CK-MB)	58
3.6.7. Análise histopatológica.....	58
3.6.8. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa, qPCR	59
3.7. Interação do H ₂ bdtc com a albumina humana (HSA)	62
3.7.1. Interação do H ₂ bdtc : HSA, por meio da técnica de fluorescência	62
3.7.2 Medida de tempo de vida de fluorescência	62
3.7.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC) – Modificações na estrutura secundária da HSA	63
3.8. Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de Timo de Vitelo (bezerro)	64
3.9. Análise de dados	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1. Síntese e caracterização do composto H ₂ bdtc	67
4.1.1. Síntese do composto H ₂ bdtc.....	67
4.1.2. Caracterização do composto H ₂ bdtc.....	68
4.1.2.3. Espectroscopia na região do infravermelho para o composto H ₂ bdtc ...	74
4.1.2.4. Espectrometria de massas em modo positivo e negativo (ESI-MS) para o composto H ₂ bdtc.....	77

4.2. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica <i>in vitro</i>	80
4.2.1. Atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas de cepa Y, CL Brener e colombiana.	80
4.3. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)	81
4.3.1. Liofilização das NLSs	83
4.4. Atividade tripanocida e citotoxicidade <i>in vitro</i> para composto H ₂ bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas	85
4.4.1. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas Tripomastigotas.....	85
4.4.2. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas amastigotas.	87
4.5. Atividade tripanocida e citotoxicidade <i>in vivo</i> para composto H ₂ bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas sobre as formas tripomastigotas de cepa Y.....	88
4.5.1. Toxicidade aguda <i>in vivo</i>	88
4.5.2. Inoculação dos animais e tratamento – Fase aguda.....	91
4.5.3. Inoculação dos animais e tratamento – Fase crônica	101
4.6. Interação do composto H ₂ bdtc com a albumina humana (HSA)	105
4.6.1. Albumina sérica humana no processo de transporte de drogas	105
4.6.2 Interação da HSA e o composto H ₂ bdtc.....	108
4.6.3. Medidas de tempo de vida	120
4.6.4. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	123
4.7. Interação do composto H ₂ bdtc ao CT-DNA	126
CONCLUSÃO.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXOS.....	135

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas) é uma doença parasitária endêmica em 21 países nas Américas, embora a migração de pessoas infectadas possa transportar a doença para países não endêmicos da América e do mundo. A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae [1, 2]. A doença de Chagas recebeu esse nome em homenagem ao seu descobridor, que a descreveu em 1909, o cientista brasileiro Carlos Chagas.

Cento e cinco anos após a sua descoberta, a doença de Chagas, ainda, é um problema médico social grave, devido a sua alta morbidade. Estima-se que de 6 a 8 milhões de pessoas, nas Américas, estejam infectadas com a doença de Chagas e que mais de 65 milhões de pessoas vivam sob o risco de infecção, com aproximadamente 12.000 mortes anuais decorrente da doença¹.

A doença de Chagas é conhecida como doença negligenciada, embora um número crescente de pacientes tenha sido observado em regiões não endêmicas e em países desenvolvidos, como consequência da globalização [3]. Devido ao constante fluxo de imigrantes de áreas endêmicas para países não endêmicos, como a Austrália, Canadá, Espanha, Estados Unidos e partes da Europa, a doença de Chagas está se tornando um problema de saúde mundial [4, 5]. Uma estimativa revela que 300.000 pessoas infectadas vivam nos Estados Unidos, a maioria imigrante da América Latina [6].

¹ <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/>>

1.1.2. Transmissão da doença de Chagas

A transmissão vetorial é restrita ao continente americano e é a forma mais comum de contaminação por *T. cruzi* (80,0 - 90,0%). Esta ocorre por meio de fezes de insetos vetores hematófagos contaminados, da ordem Hemiptera (família Reduviidae). Esses triatomíneos são conhecidos popularmente como barbeiros (Figura 1).

Figura 1: Foto ilustrativa do Triatomíneo (barbeiro). Fonte: <[Http://bestpractice.com/monograph/pathophysiology.html](http://bestpractice.com/monograph/pathophysiology.html).> Acessado em: 08/09/2014.

A forma menos comum da transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer por transfusão de sangue e transplante de órgãos (atualmente quase eliminados no Brasil), ou transmissão congênita. Por meio de ingestão acidental do inseto triturado aos alimentos (contaminação por via oral) como o caldo de cana de açúcar, sucos de açaí e goiaba [7].

O *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre os estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico do *T. cruzi* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro [2].

O ciclo inicia-se com a contaminação do inseto vetor triatomíneo (barbeiro) (1) com as formas tripomastigotas sanguíneas (2) de um mamífero infectado. Os tripomastigotas são conduzidos ao lúmen do intestino do inseto, onde se diferenciam nas formas epimastigotas. As formas epimastigotas (3) começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (4) e se diferenciam, na porção final do intestino do barbeiro, em tripomastigota metacíclico (5), que é uma forma infectante, mas não replicativa [7].

Os tripomastigotas metacíclicos são, finalmente, eliminados pelas fezes do inseto durante o repasto sanguíneo (6). Os parasitos, presentes nas fezes, penetram a pele lesionada, ou mucosa (7), chegando à circulação sanguínea; tais parasitos

são capazes de invadir várias células nucleadas; por exemplo, macrófagos (8), células musculares e epiteliais. A forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago e ocorre a formação do vacúolo parasitóforo (9). No interior do vacúolo parasitóforo, o tripomastigota se diferencia para a forma amastigota, rompendo a membrana do vacúolo parasitóforo (10). No citoplasma, essa forma se multiplica, por meio de divisões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma (11). Após as sucessivas divisões, os amastigotas iniciam sua diferenciação, passando por uma forma de transição (12) e se diferenciando na forma tripomastigota, antes de a célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (13) [7]. A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação das amastigotas para tripomastigotas, o que gera o aparecimento de diferentes formas no meio externo (14). Por fim, no meio extracelular, os tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) podem infectar novas células².

1.1.3. Patogênese da doença de Chagas

Uma manifestação característica da contaminação por *T. cruzi* é a reação inflamatória no local da penetração do parasito. Se for a mucosa conjuntiva, o paciente desenvolve um edema unilateral e bpalpebral, denominado sinal de Romaña (Figura 3A) [8]. Se a penetração for pela pele, observa-se um nódulo furuncular com discreto edema central, conhecido como Chagoma infectante (Figura 3B).

² Atlas didático. **O ciclo de vida do T. cruzi- LabSpace**. Disponível em: <www.theopenuniversity.url>. Acessado em: 08/05/2014.

Figura 3: A) Sinal de Romanã (*T.cruzi* penetra através da conjuntiva), (B) Chagoma infectante (*T.cruzi* penetra através da pele).

Fonte: < <http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx>.> Acessado em: 08/09/2014.

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda, que se inicia imediatamente após a infecção, independentemente da forma de contaminação, e dura cerca de dois meses. A fase aguda pode ser assintomática (60,0 a 70,0% dos casos) ou sintomática, associada à febre, mal-estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia. Ademais, miocardite e meningoencefalite podem ocorrer durante essa fase, particularmente em crianças e pessoas imunossuprimidas. Esses sintomas representam, aproximadamente, 10,0% da taxa de mortalidade [3]. Os sinais e sintomas da fase aguda são, na maioria, não específicos, dificultando a detecção precoce da doença e, portanto, raramente as pessoas são diagnosticadas ou tratadas nessa fase.

A fase crônica chagásica se prolonga por toda a vida do hospedeiro. A maior parte dos pacientes chagásicos crônicos (20,0 – 50,0%) permanece assintomática por um longo período, o que caracteriza a forma indeterminada da doença; 8,0 – 10,0% dos pacientes desenvolvem megassíndrome (megaesôfago e megacolon) e 10,0 – 20,0% desenvolvem a forma cardíaca.

A forma digestiva é caracterizada por disfunção gastrointestinal, megaesôfago e/ou megacolon, devido à destruição das fibras musculares e neuronais no sistema digestivo; em casos graves, conduz à dilatação da estrutura digestiva e perda da motilidade do esôfago e intestino [9]. O megaesôfago causa disfagia (dificuldade ao engolir) com odinofagia (dor ao engolir), combinada com dor epigástrica,

regurgitação, ptialismo (hipersalivação) [4]. O megacólon pode afetar o segmento sigmoide, reto, e cólon descendente e causar severa constipação intestinal, distensão abdominal e, ocasionalmente, obstrução intestinal devido ao fecaloma ou volvo de sigmoide [4]. Pacientes com megaesôfago possuem uma maior prevalência para desenvolver câncer de esôfago. Entretanto, não há relatos de aumento na frequência de câncer em pacientes chagásicos crônicos com megacólon [4].

A forma cardíaca é a forma mais grave e frequente da fase crônica da doença de Chagas, atingindo 20,0 – 30,0% dos pacientes. O coração lesionado aumenta de tamanho (Figura 4A). O dano é mediado pela resposta imune, associada ao grande número de formas amastigotas nos miócitos cardíacos (Figura 4B), que degeneram as fibras cardíacas. A degeneração das fibras cardíacas leva a perda da função contrátil, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita, entre outras consequências. Nos estágios avançados da lesão cardíaca, o paciente desenvolve distúrbios de condução, disautonomia, cardiomegalia, fibrose, afinamento da parede ventricular e danos microvasculares [10]. A lesão cardíaca na doença de Chagas crônica é considerada a principal responsável pela morbidade e a mortalidade dessa fase [3, 11, 12].

Figura 4: (A) Aumento do coração (imagem à direita) desencadeado pela Doença de Chagas em relação a um coração sadio (imagem à esquerda). (B) Tecido cardíaco humano infectado com *T. cruzi*. Parasitos estão representados por pontos pretos. Seta indica um ninho, de amastigota (forma intracelular do parasito) no tecido cardíaco infectado.

Fonte: < www.jornalufgonline.ufg.br.> Acessado em: 08/09/2014.

1.2. Tratamento da doença de Chagas

Apesar da doença de Chagas estar entre os seis maiores problemas de saúde pública dos países tropicais e subtropicais, pouca atenção tem sido dada para o desenvolvimento de tratamentos eficazes [1, 3]. De 1.556 novas drogas desenvolvidas entre 1975 e 2004 e registradas no *Food and Drug Administration* – USA (FDA), apenas 1,0% destas estavam associadas com doenças tropicais negligenciadas e nenhuma delas estava relacionada à doença de Chagas [12]. Sendo assim, desde a década de 1970, apenas duas drogas foram disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas: Nifurtimox (NFX) (Lampit® - Bayer®) e Benzonidazol (BZN) (Rochagan®, Rodanil® - Roche; LAFEPE- Benzonidazol – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) (Figura 5).

Figura 5: Estruturas químicas dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas: NFX e BZN.

Ambos os medicamentos, NFX e BZN, possuem o grupo nitro (-NO₂), o qual é reduzido ao grupo amino (-NH₂) pela ação de enzimas nitroredutases, que atuam em moléculas que contenham um grupo nitro (R-NO₂). Esse processo é iniciado pela reação catalisada pela NADPH-citocromo P450 redutase sobre as moléculas que contêm grupo nitro, as quais levam à formação de radicais intermediários aniônicos

radicalar ($R\text{-NO}_2^{\cdot-}$) com subsequente formação de hidroxilamina ($R\text{-NHOH}$) [13-16]. O efeito tripanocida do BZN se deve a ligações covalentes entre o radical nitro formado com macromoléculas de *T. cruzi* (DNA e citocromo P450). No caso do Nifurtimox, o radical reduz o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e regenerando o grupo $-\text{NO}_2$ em um processo conhecido como ciclo redox. O superóxido aniônico ($O_2^{\cdot-}$) é captado pela enzima superóxido dismutase e é transformado em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio e o superóxido aniônico, na presença de íons Fe^{III} (reação de Haber-Weiss), formam radicais livres hidroxilas. Esses radicais livres se ligam a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*, danificando a estrutura do parasito [13, 14] (Figura 6). Tais metabólitos (eletrofílicos), formados por meio do mecanismo de ação desses medicamentos, podem atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro humano, devido a sua alta reatividade. Essa baixa especificidade de ação contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes.

Figura 6: Mecanismo de ação dos compostos Benzonidazol e Nifurtimox. Fonte: [13].

Atualmente, apenas o BZN encontra-se disponível comercialmente na maioria dos países, incluindo o Brasil [15]. Independentemente do mecanismo de infecção, a administração de BZN no início da infecção resulta em cura

parasitológica em 60,0% dos casos. No entanto, o tratamento com BZN na fase crônica tem baixa eficiência (0,0 – 20,0%) [15]. O BZN causa toxicidade sistêmica com sérios efeitos colaterais, incluindo anorexia, vômito, dor de cabeça, vertigem, entre outros [12, 16]. Seus múltiplos efeitos colaterais levam à interrupção do tratamento em 20,0 – 30,0% dos casos. Contudo, nesse ponto, é importante ressaltar que não há drogas para a sua substituição. Desde a elucidação do genoma do *T. cruzi*, em 2005, pesquisas têm sido conduzidas no intuito de obter novas formas de combate ao parasito. Apesar disso, nenhum novo fármaco é esperado para os próximos 3-4 anos. A OMS (Organização Mundial da Saúde) apoia a criação de parcerias, para desenvolvimento de novos produtos sem fins lucrativos, as PDPs (Product Development Partnerships). Uma delas, a DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)³, está desenvolvendo um banco de dados sobre a doença de Chagas [3].

Desenvolvimentos de novos fármacos podem emergir das análises de compostos sintéticos ou naturais, de drogas com atividade reconhecida, de ensaios com os agentes já aprovados para outras doenças ou por meio da determinação de um alvo específico, identificando um caminho chave para o metabolismo do parasito. Recentes desenvolvimentos no estudo da bioquímica básica de *T. cruzi* permitiram a identificação de novos alvos para a quimioterapia, que incluem o metabolismo de esteróis, enzimas como a tripanotona redutase, cisteína proteinase, fosforibosiltransferase da hipoxantina-guanina, desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato, DNA topoisomerasas, diidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase [12, 17]. Dentre as possibilidades relacionadas aos alvos descritos anteriormente, podem-se destacar os complexos metálicos [18, 19] e compostos da classe dos ditiocarbazatos [18].

³ TRATE CHAGAS. DNDi. **Campanha: Acorde Agora! É Hora de Tratar a Doença de Chagas.** Disponível em:< www.treatchagas.org>. Acessado em: 08/09/2014.

1.3. Ditiocarbazatos derivados de bases de Schiff como agentes tripanocida

Ao longo das últimas décadas, ditiocarbazatos têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades físico-químicas, ação quimioterapêutica e sua relevância para os sistemas biológicos [20-22]. Os ditiocarbazatos existem sob duas formas tautoméricas, tiona (a) e tiol (b) (Figura 7). O grupo tiona ($C = S$) é relativamente instável na forma monomérica e tende a rearranjar-se para uma ligação simples $C - S$ estável por tioenolização, se houver, pelo menos, um átomo de hidrogênio adjacente à ligação $C = S$ [23, 24].

Figura 7: Tautomerismo de ditiocarbazato (tiona e tiol).

A semelhança estrutural desses compostos com algumas biomoléculas direcionou pesquisadores no sentido de observar possível atividade citotóxica e buscar relação estrutura/atividade. Dessa forma, os ditiocarbazatos têm sido amplamente utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de compostos de pronunciada atividade biológica. As características estruturais dessas moléculas permitiram usá-las, ainda como ligantes quelantes, em uma série de íons metálicos de transição, os quais os levaram a estudos relacionados à ação antimicrobiana, antimalárica, propriedades antivirais e anticancerígenas, entre outras [20, 25, 26]. A ação citotóxica pronunciada de compostos ditiocarbazatos levou ao desenvolvimento de fármaco de grande aplicação clínica. Em 2006, o N-(2-diethylaminoethyl)-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidene) methyl]-2,4-dimethyl-1H-

pyrrole-3-carboxamide (SU11248) foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos EUA para o tratamento de tumores do estroma gastrointestinal [27] e carcinoma avançado de células renais [28]. As atividades antitumorais dessa classe de compostos têm chamado muita atenção por esta estar envolvida em três tipos de mecanismos: (a) inibição da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, (b) lesão nas fitas do DNA e (c) capacidade de se ligarem as bases nitrogenadas do DNA e RNA, bloqueando a replicação [29, 30]. A similaridade entre as células tumorais e o *T. cruzi*, no metabolismo e na resposta às drogas, encorajou alguns pesquisadores a estudarem o efeito das drogas antineoplásicas sobre o parasito [31, 32]. Nesse contexto, nosso grupo sintetizou quatro novos derivados de ditiocarbazatos e seus complexos metálicos de platina (Pt) e paládio (Pd) [18]. A atividade tripanocida foi avaliada sobre as formas tripomastigota da cepa Tulahuen LacZ (uma cepa modificada que expressa o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* – *E. coli*) de *T. cruzi*. Os valores de IC₅₀ (concentração da droga capaz de eliminar 50,0% dos parasitos) variaram entre 0,6 e 69,3 μ M (Tabela1).

Tabela 1: Valores de IC₅₀ dos compostos orgânicos livres e dos seus complexos sobre formas tripomastigotas [18].

Compostos	IC _{50 try} (μ M)
H ₂ L ^{1a} (Figura 8A)	69.3
H ₂ L ^{1b} (Figura 8A)	41.2
H ₂ L ^{2a} (Figura 8B)	0.6
H ₂ L ^{2b} (Figura 8B)	9.6
[Pt(L ^{1a})(PPh ₃)	7.8
[Pd(L ^{1a})(PPh ₃)	11.5
[Pt(L ^{1b})(PPh ₃)	16.1
[Pd(L ^{1b})(PPh ₃)	18.7
[Pt(L ^{2a})(PPh ₃)	18.4
[Pd(L ^{2a})(PPh ₃)	13.2
[Pt(L ^{2b})(PPh ₃)	16.9
[Pd(L ^{2b})(PPh ₃)	15.1
BZN	2.5

Embora haja semelhança estrutural entre os ligantes ditiocarbazatos (Figura 8), a complexação a íons metálicos possibilitou observar resultados antiparasitários anômalos, relativos ao IC₅₀ (Tabela 1), o qual, neste momento, é de difícil racionalização estrutural quanto a atividade tripanocida observada.

Figura 8: compostos orgânicos: (A) H_2L^{1a} (S-benzil- β -N (2-hidroxifeniletildina) ditiocarbazato), (B) H_2L^{1b} S-4-nitrobenzilo- β -N-(2-hidroxifeniletildina) ditiocarbazato, (C) H_2L^{2a} 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-1-pirazolina (S-benzilditiocarbazato) e (D) H_2L^{2b} 5-hidroxi-3-metil-5-fenilpirazolina-1 (S-4-nitrobenzilditiocarbazato) [18].

No entanto, um dos compostos estudados, o composto H_2L^{2a} , se mostrou com atividade tripanocida surpreendente. O composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenilpirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato) – H_2L^{2a} - renomeado para H_2L^{2b} (figura 8) **mostrou-se 3 vezes mais potente como agente tripanocida (IC₅₀ = 0,6 μ M) do que o medicamento utilizado atualmente nas clínicas, o Benzonidazol. Os resultados *in vitro* observados [18] nos conduziram a avançar os estudos com outras cepas (Y, Cl Brener e Colombiana) bem como ensaios biológicos *in vivo* em modelo murino de doença de Chagas.**

1.4. Sistema de liberação nanoparticulado

A solubilidade dos compostos que podem ser utilizados na terapia clínica é um fator essencial para garantir a efetividade da resposta terapêutica. À vista disso, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de aumentar a solubilidade desses compostos, que, em geral, são hidrofóbicos.

Nesse contexto, vários sistemas de liberação de drogas têm sido desenvolvidos para modificar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e biológicas dos compostos bioativos [33]. O desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos tem contribuído para melhorar a sua liberação no organismo, modulando a (1) velocidade com que essas substâncias atravessam barreiras fisiológicas, (2) a sua penetração na circulação e (3) a forma de atingir o alvo farmacológico com o objetivo de diminuir o número de doses e aplicações. Tais sistemas ainda protegem o fármaco contra a degradação durante o armazenamento e sua deterioração *in vivo*. Além de possibilitar a administração de fármacos, pela via intravenosa [34, 35]. Dessa forma, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) são um potencial sistema de liberação de drogas [35] (Figura 9). As NLSs são sistemas de liberação de fármacos compostas, como o próprio nome diz, por partículas de tamanho nanométrico, compostas por uma matriz lipídica sólida, estabilizada por um tensoativo (Figura 9). Esses sistemas apresentam algumas vantagens em relação a outros sistemas de liberação como as nanoemulsões, lipossomos e nanopartículas poliméricas. Da mesma maneira que as nanoemulsões e os lipossomos, as NLSs são sistemas compostos por substâncias fisiologicamente bem toleradas, com aprovação para a aplicação farmacológica em seres humanos. Entre outras vantagens, está sua estabilidade física, proteção de fármacos lábeis contra a degradação, fácil preparação, baixo custo e baixa toxicidade [36]. Seu tamanho reduzido, variando de 50 a 1000nm, permite que as NLSs sejam administradas por todas as vias de inoculação (oral, venosa, intramuscular ou intradérmica) [37, 38]. Além disso, sua produção também pode ser realizada em larga escala, o que é um atrativo para a produção industrial [39]. Assim, o uso de novos compostos bioativos, como possíveis agentes antichagásicos, pode ter sua eficácia aumentada quando encapsulados em sistemas de liberação de drogas.

Figura 9: Representação da NLS [40].

As NLSs possuem matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal [40] (Figura 9). Essa solidez, característica dos lipídeos que formam as NLSs, confere menor mobilidade aos ativos neles incorporados, podendo sustentar, ou até controlar, a velocidade de liberação dessas substâncias [41]. As NLSs podem ser obtidas por diferentes métodos, por fusão-emulsificação, por emulsificação-evaporação do solvente, ou a partir de microemulsões [40], permitindo incorporar princípios ativos hidrossolúveis e lipossolúveis [42]. Diante do exposto, a natureza lipídica das NLSs é particularmente adequada para encapsular compostos apolares [42, 43].

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* de 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato), H₂bdtc (Figura 10), livre e carregado em nanopartículas lipídicas sólidas.

Figura 10: Estrutura molecular proposta para o composto H₂bdtc.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o composto H₂bdtc.
- Avaliar a atividade tripanocida do H₂bdtc através de ensaios diretos contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y, CL Brener e Colombiana).

- Avaliar a citotoxicidade do H₂bdtc no baço de camundongos.
- Encapsular o composto H₂bdtc em NLS.
- Avaliar a atividade tripanocida do H₂bdtc sobre formas amastigotas, através de ensaios com macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos infectados com o *T. cruzi* (Cepa Y).
- Determinar o potencial de cura parasitológica *in vivo* (na fase aguda e crônica da doença) do H₂bdtc, através da avaliação da parasitemia, sobrevivência /e histologia do coração.
- Avaliar a existência de alterações do marcador hepático (TGP) e cardíaco (CK-MB) decorrentes da infecção aguda.
- Investigar a interação do composto H₂bdtc com a albumina humana (HSA), analisando esta interação através da técnica de luminescência.
- Investigar a afinidade de interação do H₂bdtc ao CT-DNA, através de titulações espectrofotométricas do composto na presença e ausência de CT-DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Resume a pureza e procedência dos reagentes e solventes utilizados para procedimentos experimentais.

Reagentes / solventes	% de Pureza	Procedência
Acetonitrila (ACN)	Grau HPLC	Merck
Ácido acético glacial	Grau HPLC	Baker
Ácido esteárico	99,5%	Sigma-Aldrich
Benzonidazol	97,0%	Sigma
Diclorometano	99,0%	Vetec
Dimetilsufóxido – (DMSO)	99,0%	Sigma-Aldrich
Etanol	99,8%	Synth
4-fenil-2,4-butanodiona	99,0%	Sigma-Aldrich
Iodeto de propídio	94,0%	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Grau HPLC	Fisher Scientific
Lecetina de soja – Lipoid S100	Alta pureza	Lipoid
Metanol	Grau HPLC	Merck
Penicilina	95,0%	Gibco
Estreptamina	95,0%	Gibco
Taurodeoxicolato de sódio	99,0%	Sigma-Aldrich

Trietilamina	99,5%	Sigma
RPMI Medium 1640	Cultura celular	Gibco

3. 2. Síntese e caracterização do composto H₂bdtc

3.2.1. Síntese do composto H₂bdtc

O composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato), H₂bdtc, foi sintetizado, tomando-se como base o procedimento descrito anteriormente por Maia, et. al. [18]. Resumidamente, uma solução de 4-fenil-2,4-butadiona (I) (0,8110 g; 5,0 mmol) em metanol (10 mL) foi adicionada a uma solução de S-benzylidithiocarbazate (II) (0,9910 g, 5,0 mmol) metanol (10 mL). Em seguida, a mistura foi submetida a refluxo por um período de 2 h. Após o término da reação (5 h), a fase orgânica, de cor amarela, foi filtrada. O solvente foi evaporado lentamente, resultando em um produto cristalino incolor. Os cristais foram separados por filtração, lavados com n-hexano e seco ao ar. O rendimento médio foi de 80,0%.

3.2.2. Análise elementar

A determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio do composto H₂bdtc foi realizada, utilizando-se um analisador CHNS modelo EA 1108 da FISONs, localizado no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3. Instrumentação para caracterização do H₂bdtc

3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear- RMN

O espectro de RMN do composto foi adquirido usando-se um equipamento Agilent 400/54 Premium Shielded 9,4 T, operando a 399,8 MHz para ¹H. O espectro RMN do H₂bdtc foi feito em diclorometano deuterado (CD₂Cl₂). Este foi internamente referenciado em relação ao tetrametilsilano (TMS) ou em relação ao pico residual do solvente não deuterado. ¹H RMN (CD₂Cl₂, ppm): 2.10 (s, 3H, CH₃), 3.06 (d, J=16.0 Hz, 1H, CH₂), 3.44 (d, J=16.0 Hz, 1H, CH₂), 4.29 (d, J=12.0 Hz, 1H, SCH₂), 4.41 (d, J=12.0 Hz, 1H, SCH₂), 6.41 (s, 1H, OH), 7.23–7.42 (m, 10H, Ph).

3.3.2. Espectroscopia eletrônica UV-Visível

Os espectros na região do UV-Visível foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1.800, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e solventes adequados à dissolução dos compostos.

3.3.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram realizados em pastilha de KBr e em solução. Para os espectros obtidos em solução utilizou-se duas pastilhas de KBr e um espaçador de teflon, a solução contendo o composto foi colocado na pastilha e o espectro na região do infravermelho foi obtido. Os

espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige - 21, na região compreendida entre 600 a 4.000 cm^{-1} .

3.3.4. Espectrometria de massas em modo positivo e negativo (ESI-TOF)

Os espectros de massa foram medidos com um equipamento micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer, fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA. O aparelho é de alta resolução, necessitando de calibração interna antes de realizar as análises. Usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA (Ácido Trifluoracético de Sódio) a 10 mg/ml (TOF). Condições de análises do aparelho: temperatura de 180 °C, Fluxo de 4 L/min, pressão de 0,4 Bar, gás nitrogênio, bomba de infusão modelo cole PARMER. Condições do experimento: bomba de infusão, fluxo 300 $\mu\text{l/h}$; fase móvel para a solubilização: acetato de etila (retiraram-se 50 μL da solução, 1 mg/mL do composto e foram diluídos em MeOH:H₂O/80:20); o modo de detecção foi positivo e negativo. Todos os dados dos espectros de massa são apresentados na forma: m/z, atribuições

3.4. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica *in vitro*

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, no laboratório de Imunoparasitologia, sob a orientação do Professor Dr. João Santana da Silva e Dra. Renata Sesti Costa.

3.4.1. Cepa de *T. cruzi*

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizadas três cepas diferentes de *T. cruzi*, a cepa Y, CL Brener e colombiana. As células LLCMK₂ (linhagem de fibroblasto de rim de macaco) foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos e os tripomastigotas derivados da cultura foram usados nos ensaios *in vitro*.

3.4.2. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* contra as formas tripomastigotas das cepas Y, CL Brener e colombiana.

A atividade tripanocida *in vitro* do composto H₂bdtc sobre a forma tripomastigota e amastigota da cepa Tulahuen *LacZ* foi muito promissora [18]. Dessa forma; nesse trabalho, avaliou-se a atividade tripanocida *in vitro* do composto H₂bdtc contra a cepa Y, CL Brener e colombiana de *T. cruzi*. A avaliação *in vitro* contra as diferentes cepas foi realizada da maneira descrita a seguir. As culturas das formas tripomastigotas *in vitro* foram estabelecidas em células LLCMK₂ a partir da infecção com as formas tripomastigotas sanguíneas de camundongos infectados. As formas tripomastigotas da cultura foram centrifugadas e ressuspensas na concentração de $6,5 \times 10^6$ parasitos/mL em meio RPMI suplementado com 10,0% de soro fetal bovino. As triplicatas foram plaqueadas em placas com 96 poços e tratadas com diversas concentrações do composto. As culturas foram mantidas a 37,0 °C por 24 h, e a viabilidade do parasita foi posteriormente testada por meio da determinação do número de formas móveis em câmara de Neubauer [44], e o percentual da atividade tripanocida (% TA) foi calculado da seguinte forma (Equação 1):

$$\% TA = \left[1 - \frac{(LDt)}{(LCt)} \right] \times 100$$

Equação 1

Em que LDt é a média do número de formas móveis em poços, contendo as drogas no tempo t, e LCt é a média do número de formas móveis em poços na

ausência de qualquer composto no tempo t_0 (controle negativo). O IC_{50try} foi determinado por meio das concentrações do composto capaz de inativar 50,0% da viabilidade das formas tripomastigotas [45].

3.4.3. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas amastigotas

Para avaliar o efeito do H_2bdtc sobre a forma amastigota da cepa Y, os macrófagos (MO) (Figura 11A) foram plaqueados em lamínulas em uma concentração de $5,0 \times 10^6/ml$ e cultivados em placas com 24 poços por 24 h. As formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram adicionadas na cultura em uma razão de 5:1 (*T. cruzi*: MO) e, após 6h, os parasitos no sobrenadante foram retirados por lavagens sucessivas [53]. Após a lavagem para retirar os parasitos do sobrenadante (forma tripomastigota), permaneceram apenas as células contendo a forma amastigota (parasito intracelular) (Figura 11B). Dessa forma, o H_2bdtc e BZN foram adicionados em diferentes concentrações (250 - 12,5 μM , por meio de diluições seriadas) e permaneceram em cultura por 48h. Em seguida, as lamínulas foram lavadas e coradas com Giemsa.

Figura 11: Imagens representativas de células de MO não infectadas (A) e imagens representativas de células de MO infectadas com *T. cruzi* forma amastigota (intracelular) (B).

A quantidade de células infectadas e de *T. cruzi* dentro das células foi determinada em 100 células totais por lamínula, pela visualização em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão). O BZN foi utilizado como controle positivo do experimento, enquanto o controle negativo correspondeu às células infectadas com os parasitos.

3.4.4. Citotoxicidade dos fármacos *in vitro*

As células do baço de camundongos C57BL6 foram isoladas, macerando-se o tecido em meio RPMI 1640 (Gibco) sobre um filtro com poro de 100 µm. As células isoladas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos e as hemácias foram lisadas com tampão de lise por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas, contadas e ressuspensas a $6,5 \times 10^6$ células/mL em RPMI, contendo 5,0% de soro fetal bovino [46]. Em uma placa de 96 poços, as células do baço foram plaqueadas em triplicata e incubadas por 24 h com os diferentes compostos em distintas concentrações. O BZN foi usado como droga de referência e Tween-20, empregado como controle positivo para a mortalidade das células. Após o período de incubação, as células foram lavadas e incubadas com iodeto de propídio na concentração de 10 µg/mL. A aquisição das células foi realizada dentro de 15 minutos, utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCantoll - BD) e a análise dos dados foi feita por meio do programa FLOWJO (Tree Star).

3.5. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)

O sistema de liberação NLS foi obtido e caracterizado no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de ciências Farmacêuticas, sob a supervisão da Professora Doutora Renata Fonseca Vianna Lopez.

3.5.1. Obtenção da NLS

As NLSs foram obtidas baseadas no método descrito na literatura [39, 40]. A fase oleosa composta por 0,4000 g de ácido esteárico e 0,2000 g de lecitina de soja a fase aquosa composta (0,0500 g de taurodeoxicolato de sódio e 1,25 mL de água) foram aquecidas separadamente em chapa aquecedora a 90,0 °C, com agitação constante até a completa fusão da fase oleosa. Após a fusão, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e o sistema foi mantido sob agitação constante até a formação da microemulsão (ME). A ME foi vertida em água gelada (2,0 – 5,0 °C) na proporção de 1:40, sob vigorosa agitação (Ultra-Turrax T-25) a 20.000 rpm, por 10 minutos, e submetida à homogeneização à alta pressão (homogeneizador de alta pressão Emulsiflex® C3-Avestin) a 500 bar por 10 minutos.

3.5.2. Caracterização físico-química das NLSs

3.5.2.1. Tamanho de partícula e índice de polidispersividade (Pdl)

Espectroscopia de correlação de fótons foi utilizada para determinar o tamanho médio das partículas e o Pdl das NLSs. As amostras foram diluídas (1:10) em água destilada e mantidas sob agitação, até o momento da análise, no equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK) a 25,0 °C. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5.2.2. Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado baseado na mobilidade eletroforética das NLSs, utilizando-se Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas (1:10) em água destilada e analisadas em triplicata.

3.5.2.3. Determinação da quantidade total e porcentagem de perda do composto H_2bdtc

Para a determinação da quantidade de H_2bdtc perdida nas várias etapas do processo de obtenção das NLS, o H_2bdtc total presente na dispersão final de NLS foi determinado a partir da dissolução da NLS em Dimetilsufóxido, em diluição apropriada. Nesse caso, a quantificação do H_2bdtc foi realizada por espectrofotometria UV em um espectrofotômetro Agilent Technologies 8453, no comprimento de onda de 412 nm. A porcentagem de perda do fármaco foi, então, determinada com base na equação 2 [42, 43]:

$$\% \text{ Perda} = 100 - \frac{\text{Quantidade total de } H_2bdtc \text{ na NLS} \times 100}{\text{Quantidade total de } H_2bdtc \text{ adicionado}}$$

Equação 2

Em que: % perda é a quantidade de fármaco perdida durante o processo de obtenção das NLSs em relação à quantidade de H_2bdtc , adicionada no início do processo.

3.5.2.4. Eficiência de encapsulação (% EE)

Os estudos para determinar a eficiência da encapsulação do composto H_2bdtc foram realizados nos dispositivos de ultracentrifugação AMICON Ultra 4 (Millipore,

100 Kda) (Figura 12). Esse dispositivo dispõe de dois compartimentos separados por uma membrana de filtração com porosidade de 100 Kda, de modo que a fração do composto H₂bdtc encapsulado ficou retida na membrana e a fração livre foi coletada no compartimento inferior do dispositivo, conforme metodologia padronizada por Taveira [40].

Figura 12: Dispositivo de ultracentrifugação Amicon Ultra 4 (Millipore).

Na parte superior do dispositivo, foi adicionado 1,0 mL da dispersão de NLS, contendo o ligante H₂bdtc e, em seguida, realizou-se a centrifugação a 6.000 rpm, por 40 minutos, a 25,0 °C. A fração do ligante H₂bdtc livre foi, então, coletada no compartimento inferior para a análise por espectrofotometria de UV-Vis no comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se, assim, a quantidade de fármaco livre na dispersão. A quantidade encapsulada do fármaco (Q encapsulada) foi determinada a partir da diferença entre a quantidade total (Q total) e a quantidade livre (Q livre) do fármaco na dispersão (Q encapsulada = Q total – Q livre). A eficiência de encapsulação foi calculada com base na equação 3 [40, 43]:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade total de H}_2\text{bdtc na NLS} - \text{Quantidade de H}_2\text{bdtc livre}}{\text{Quantidade total de H}_2\text{bdtc na NLS}} \times 100$$

Equação 3

3.5.2.5. Liofilização da NLS

As dispersões de H₂bdtc-NLS foram liofilizadas na presença do crioprotetor sacarose (8,0% p/p) [47]. Para a realização do processo, a sacarose foi adicionada à dispersão, a qual foi mantida sob agitação manual com um bastão até a completa solubilização do crioprotetor. As dispersões de NLSs foram, então, divididas em alíquotas de 1,0 mL em eppendorfs e congeladas a -80,0 °C por aproximadamente 12h [47]. O processo de liofilização foi realizado a -40,0 °C, em um liofilizador (Liobras L 101), à pressão de 13 Pa por 8 h. As NLSs liofilizadas foram reconstituídas em água deionizada sob leve agitação. O tamanho médio das partículas, Pdl e potencial zeta foram determinados antes e após a reconstituição das NLSs.

3.5.3. Coeficiente de Partição de H₂bdtc (K_{octanol/água})

O coeficiente de partição para o H₂bdtc foi determinado em triplicata, por meio do sistema de n-octanol / água, segundo o procedimento publicado [48]. A medida do coeficiente de partição n-octanol/água para H₂bdtc foi realizada utilizando-se o método do frasco agitado. O H₂bdtc foi dissolvido em solução aquosa saturada com n-octanol em uma concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. As amostras foram agitadas durante 30 minutos, separadas em duas fases e centrifugadas, durante 10 minutos, a 2.000 rpm. A quantidade de H₂bdtc na fase aquosa foi determinada por espectroscopia de UV-visível. O H₂bdtc presente na fase aquosa foi quantificado antes (C1) e depois da partilha (C2), e K_{octanol/água} foi determinado pela equação 4:

$$K_{o/a} = \frac{C1 - C2}{C2}$$

3.6. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica *in vivo*

Os experimentos *in vivo* também foram realizados no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, no laboratório de Imunoparasitologia, sob a orientação do Professor Dr. João Santana da Silva e Dra. Renata Sesti Costa. Os estudos *in vivo* foram aprovados e realizados em acordo com o Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto (nº 006/2011).

3.6.1. Toxicidade Aguda *in vivo*

Trinta camundongos divididos em dez grupos ($n = 3/\text{grupo}$) foram tratados por via oral, com H₂bdtc em suspensão e H₂bdtc-NLS, nas doses de 100, 150, 200 e 250 µmol/kg. Os grupos de controle, por sua vez, foram tratados com veículo Tampão fosfato - PBS (veículo utilizado para formar suspensão do H₂bdtc) e NLS vazia (usada para encapsular o H₂bdtc). A nanopartícula contendo o H₂bdtc foi liofilizada e, posteriormente, ressuspensa de forma a obter a concentração desejada. Os animais foram monitorados por 14 dias, várias vezes ao dia.

3.6.2. Curva concentração e efeito

Para a determinação da dose mais eficaz na eliminação dos parasitas, os animais foram divididos em sete grupos de 5 camundongos cada. Cada grupo foi colocado em jejum por 12h e recebeu o H₂bdtc em suspensão (ou H₂bdtc-NLS), por via oral, nas doses de 4, 40, 80 e 100 µmol/kg (três doses) [49]. A diminuição da parasitemia foi comparada com o grupo que recebeu PBS (grupo controle). A

parasitemia foi observada após 7, 9, 11 e 13 dias de infecção. A contagem de 100 campos foi feita por observação direta ao microscópio óptico, em um aumento final de 400 vezes, a partir de 5 µl de sangue fresco — coletado de um pequeno corte na ponta da cauda dos animais —, o qual foi colocado sobre uma lâmina e recoberto por uma lamínula com dimensões de 22 x 22 cm, segundo a técnica descrita por Brener [44].

3.6.3. Inoculação dos animais e tratamento – Fase aguda e Fase Crônica

Fase aguda: Os camundongos Swiss fêmeas de 6 a 8 semanas foram infectados intraperitonealmente com 2.000 formas de tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y. Os camundongos foram tratados por via oral a partir do primeiro dia de parasitemia patente (5º dia de infecção) [50] e durante 10 dias consecutivos com 4,0 µmol/kg/dia de BZN ou 4,0 µmol/kg/dia do composto H₂bdtc (composto selecionado para experimento *in vivo*) em suspensão e ou encapsulado em NLS.

Fase crônica: Para determinar a atividade tripanocida do H₂bdtc em suspensão e H₂bdtc-NLS na fase crônica da doença de Chagas, foram utilizados 60 camundongos (fêmeas) da linhagem Swiss, pesando aproximadamente 25 g cada. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram infectados intraperitonealmente com apenas 100 formas de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, para que eles sobrevivessem à fase aguda da doença e chegassem à fase crônica. Os animais foram mantidos sem tratamento por um período de 90 dias para que a doença de chagas se tornasse crônica, como proposto por Toledo [50]. Após esse período, o tratamento com H₂bdtc em suspensão e H₂bdtc-NLS foi administrado por 30 dias consecutivos.

3.6.4. Parasitemia e mortalidade

A parasitemia foi observada nos 7º, 9º, 11º e 13º dias após a infecção. Segundo a técnica descrita por Brener [51], a contagem de 100 campos foi feita por observação direta ao microscópio óptico, (em um aumento final de 400 vezes) a partir de 5 µl de sangue fresco coletado de um pequeno corte na ponta da cauda dos animais, colocado sobre uma lâmina e recoberto por lamínula com dimensões de 22 x 22 cm. A sobrevivência foi observada por 60 dias consecutivos.

3.6.5. Avaliação da lesão hepática — Dosagem da enzima transaminase glutâmica pirúvica (TGP)

A lesão hepática dos camundongos infectados com *T. cruzi*, tratados e não tratados na fase aguda, foi avaliada por meio da dosagem da transaminase glutâmica pirúvica (TGP), com o auxílio do kit (BIOCLIN) segundo as instruções do fabricante. O teste colorimétrico determinou a quantidade de piruvato formado em função da atividade enzimática. Resumidamente, as amostras de soro foram incubadas com o substrato da TGP (reagente número 1) por 30 minutos a 37,0 °C. Após essa incubação, ocorreu a formação de piruvato, proporcionalmente à quantidade da enzima contida na amostra. Essa amostra foi, então, incubada por 5 minutos, a 56,0 °C, com 2,4-dinitrofenilhidrazina (reagente número 2), que reage com o piruvato. O último passo foi uma incubação de 5 minutos, à temperatura ambiente, com o hidróxido de sódio (reagente número 3), pois, em meio alcalino, essa reação produz uma cor característica que é lida em um espectrofotômetro a 505 nm. Os valores de TGP em U/mL são calculados por meio de uma curva padrão, que vai de 0 a 150 U/mL.

3.6.6. A atividade sérica da Creatina Quinase Isoforma MB (CK-MB)

As lesões cardíacas de camundongos infectados com o *T. cruzi*, tratados e não tratados na fase aguda, foram avaliadas a partir da dosagem de creatina quinase isoforma MB (CK-MB). A atividade de CK-MB foi medida 22 dias após a infecção, usando-se Granutest CK-MB kit (Merck, Darmstadt, Alemanha), como descrito na literatura [52]. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de microplaca (VersaMax™; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A cor produzida a partir dessa reação foi medida no comprimento de onda de 340 nm, expressando o resultado em U / l.

3.6.7. Análise histopatológica

Seis animais de cada grupo foram sacrificados 20 e 120 dias após a infecção, na fase aguda e na fase crônica, respectivamente. As amostras de tecidos cardíacos e fígado foram, então, coletadas. Os tecidos foram fixados em formol tamponado (PBS - formol 10,0%) e, após 24 h, desidratados em soluções de etanol com concentrações sucessivamente crescentes, diafanizados com xilol e emblocados em parafina. Posteriormente, os blocos de parafinas foram cortados com a ajuda de um micrótomo (Leica) a 5 µm de espessura. As lâminas com os cortes foram coradas com hematoxila e eosina (H&E) para a avaliação morfológica do tecido, a quantificação do infiltrado inflamatório e a contagem dos ninhos de amastigota do parasito.

3.6.8. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa, qPCR

O tecido do coração coletado dos animais tratados e não tratados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas, foram analisados por PCR.

Fase aguda: O DNA foi purificado a partir de 25 mg de tecido do coração, usando-se QIAamp® Mini Kit DNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação de PCR continha 40 ng de DNA genômico, 0,3 µM do iniciador específico de *T. cruzi* TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', H = A ou C (Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA) e TCZ-R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' [53], que amplificam um produto de 182bp, 7,65 mL GoTaq qPCR Master Mix ® (Promega), e H₂O para um volume total final de 15 µL. As reações foram realizadas, utilizando-se o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O programa de ciclos empregado foi de um ciclo de desnaturação de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de três passos de fase de amplificação: 95 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 15 segundos. A fase de fusão foi realizada em 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto com 0,3 °C, rampa de 95 °C e durante 15 segundos. Durante a fase de fusão, a configuração foi fixada a cada aquisição. Os dados foram analisados com StepOne Software version 2.2.2.

Fase crônica: O DNA foi purificado a partir de 20 mg de tecido do coração, usando-se o *kit* comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). O DNA, em seguida, foi quantificado (GeneQuant – RNA/DNA calculators of Amersham Biosciences) e ajustado para a concentração de 20 ng/µL com água MilliQ autoclavada.

Foram adotados dois primers para *T. cruzi*, com sequências indicadoras distintas, *Cruzi 1* e *cruzi 2* (Tabela 3), ambos na concentração de 6,25 µM – (Applied Biosystems) [54, 55] .

Tabela 3: Sequências indicadoras dos Primers Cruzei 1, Cruzei 2 e Cruzei 3.

Primers ou sonda	Sequência	Marcação	Posição dos indicadores	[Pmol]
Cruzei 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA		27 - 46	10.000
Cruzei 2 (reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		172 - 192	10.000
Cruzei 3 (sonda)	CACACACTGGACCCAA	5' FAM e 3'MGB	143 - 159	6.000

Para excluir as possíveis diferenças de peso causadas durante a pesagem do tecido cardíaco para a extração do seu DNA, foi utilizado o normalizador interno Gliceraldeído 3-GAPDH – reverse, ambos na concentração de 10 µM. A sonda empregada foi a TagMan[®] Rodent GAPDH Control Reagents - VIC na concentração de 20 µM (Applied Biosystems) [56] (ver a Tabela 4).

Tabela 4: Sequências indicadoras dos Primers GAPDH forward e reverse.

Primers	Sequência	Concentração Pmol
GAPDH	5'- GACTTCAACAGCAACTCCCAC – 3'	10
GAPDH	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3'	10
Sonda	VIC	20

As reações foram realizadas em duplicatas para cada amostra com volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de DNA (20 ng) e 7,5 µL de mix (Tabelas 5 e 6). As alíquotas foram distribuídas em placas de 96 poços, centrifugadas a 5.000 rpm por 1 minuto, seladas com adesivos e encaminhadas ao termociclador – Mastercycler real-time PCR system – (Eppendorf). Além das amostras em duplicatas, cada placa continha uma duplicata de cada controle de *T. cruzi* e GAPDH.

Tabela 5: Volume de primers e sondas adicionadas na preparação do mix utilizado na amplificação de *T. cruzi*. * Mix (2x): TaqMan PCR Master Mix contendo DNA-polimerase AmpliTaq Gold, glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.

Componentes <i>T. cruzi</i>	Volume adicionado
Primer – cruzi	1,2 µL
Primer - cruzi	1,2 µL
Primer – cruzi	1,2 µL
Mix (2X)	5,0 µL

Tabela 6: Volume de primers e sondas adicionadas na preparação do mix utilizado na amplificação do normalizador GAPDH. * Mix (2x): TaqMan PCR Master Mix contendo DNA-polimerase AmpliTaq Gold, glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.

Primers	Sequência
GAPDH	5'- GACTTCAACAGCAACTCCCAC – 3'
GAPDH	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3'
Sonda	VIC

Foi utilizado o programador de ciclo de temperaturas da amplificação em um ciclo de desnaturação de 95 °C, durante 10 minutos; em seguida, foram empregados 40 ciclos de três passos de fase de amplificação: 95°C, durante 15 segundos; 55°C durante 30 segundos; 72 °C, durante 15 segundos. A fase de fusão foi realizada a 95 °C, durante 15 segundos; 60 °C, durante 1 minuto com 0,3 °C, rampa de 95 °C e durante 15 segundos. Durante a fase de fusão, a configuração foi fixada a cada aquisição. O programador computacional Realplex do termociclador após a amplificação, forneceu valores de Ct (Threshold cycle – ciclo limiar), o qual correspondente ao ciclo que a amostra começou a emitir o sinal de amplificação. As médias foram empregadas para obter o número de cópias do *T. cruzi* por amostra de tecido.

3.7. Interação do H₂bdtc com a albumina humana (HSA)

3.7.1. Interação do H₂bdtc : HSA, por meio da técnica de fluorescência

Os estudos envolvendo a interação do composto H₂bdtc com a HSA foram realizados por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano [57]. Para isso, foi empregada uma solução 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA em tampão Tris (Tris-hidroximetilaminometano), um tampão biológico comum, com pH 7,4. Os espectros de fluorescência foram obtidos a partir de um espectrofluorofotômetro da marca Shimadzu. Em uma cubeta, adicionaram-se 3,0 ml da solução de HSA ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), depois acrescentaram-se sucessivas alíquotas de uma solução do composto H₂bdtc ($1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) também em tampão Tris. Medidas foram feitas em quatro temperaturas de incubação (22, 27, 32 e 37 °C, ou seja, 295, 300, 305 e 310 K) a fim de se entender como se dá o mecanismo de supressão desse sistema. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm. O primeiro espectro obtido foi da albumina livre, após isso, foram adicionadas sucessivas alíquotas de 1,00 μL do composto com tempo de incubação de 5 minutos.

3.7.2 Medida de tempo de vida de fluorescência

Medidas do decaimento da intensidade de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseando-se no método de correlação temporal de fótons únicos (TCSPC), no Departamento de Física da FFCLRP-USP. O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, em que os fótons da excitação são correlacionados temporalmente com os emitidos pela amostra. A fonte de excitação foi um *laser* de titânio-safira (Tsunami 3950 - Spectra Physics), bombeado pelo segundo harmônico de um *laser* de diodo um *laser* de estado sólido

de Vanadato de Ítrio dopado com Neodímio (Nd:YVO₄) (Millenia Spectra Physics) e com frequência dobrada para 465 nm em um cristal LBO (GWN-23PL - Spectra Physics). Para realizar-se o experimento de tempo de vida, foi utilizada uma cubeta de quartzo, fez-se uma solução estoque de HSA em tampão fosfato (pH = 7,4) de concentração conhecida, em que se adicionaram alíquotas de uma solução, contendo o composto (supressor), nas proporções de HSA: H₂bdtc (1: 0); (1:1), (1:2); (1:3); até (1:10). O experimento de medida de tempo de vida de fluorescência foi realizado a temperatura ambiente.

3.7.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC) – Modificações na estrutura secundária da HSA

Nesse estudo, utilizou-se a espectroscopia de dicroísmo circular. Os espectros de CD da HSA, na presença do composto H₂bdtc, foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 810, na região de 190 - 300 nm (que corresponde à região de ligação peptídica), à temperatura ambiente. Os espectros foram registrados com velocidade de varredura de 100 nm/minutos e tempo de resposta de 1 s. Cada espectro foi obtido com acúmulo de três varreduras (scans). Foram empregadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm. Para isso, foi empregada uma solução da HSA de 1,0 µmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4. Na cubeta, foram adicionadas concentrações que permitiram obter as proporções de HSA: H₂bdtc: (1: 0); (1:1), (1:2); (1:3); até (1:10).

3.8. Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de Timo de Vitelo (bezerro)

Os estudos envolvendo a interação do composto H₂bdtc com o DNA foram realizados por meio da medida de espectroscopia na região do UV-vis. As titulações foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1, foram adicionados 1.800 µL de tampão Tris e 200 µL de DMSO, correspondendo ao branco e na cubeta 2 foram adicionados 1.800 µL de tampão Tris e 200 µL da solução do composto H₂bdtc em DMSO (250 µM). Feito isso, foram realizadas sucessivas adições de 20 µL de CT-DNA (10⁻⁵ para 10⁻³ em adições sucessivas) em ambas cubetas, em temperatura ambiente. As soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto e, em seguida, registrou-se o espectro.

De acordo com esse estudo, é possível determinar a afinidade que o composto apresenta para interagir com o DNA, por meio da determinação da constante de ligação (K_b) entre o composto e o DNA [58]. Essa constante é determinada com base nos máximos de absorção para o composto, empregando a equação 5:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]}$$

Equação 5

Em que: ϵ_a = é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorbância medida e a concentração do composto; ϵ_f = absortividade molar do composto livre (sem adição de DNA); ϵ_b = absortividade molar do composto ligado ao DNA; K_b = constante de ligação.

A determinação das constantes foi efetuada com base nos máximos de absorção em torno de 415 nm.

3.9. Análise de dados

Foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey-Kramer para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, utilizando-se um $P < 0.05$. Esses testes foram realizados pelo programa estatístico INSTAT (Graph Pad[®]). Para avaliar a sobrevida, foi usado o método de Kaplan Meyer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados experimentais apresentados a seguir envolvem aspectos químicos e biológicos relacionados com a atividade tripanocida do composto H₂bdtc. Toda a discussão busca interligar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* desse composto, com possíveis processos químicos. Aparentemente, o composto age em um sítio específico do *T. cruzi*, porém, no tempo e disponibilidade das técnicas utilizadas neste trabalho, não nos foi possível atribuir o mecanismo de ação do composto H₂bdtc. Dessa maneira, para se entender todo o processo, a discussão foi baseada em dados espectroscópicos, medida de tempo de vida de fluorescência, e avaliação tripanocida *in vitro* e *in vivo* do composto H₂bdtc.

4.1. Síntese e caracterização do composto H₂bdtc

4.1.1. Síntese do composto H₂bdtc

O composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato), H₂bdtc, foi sintetizado a partir da condensação de 4-fenil-2,4-butanodiona (I) com o respectivo ditiocarbazato (II) na razão molar 1 : 1 (esquema 1).

Esquema 1: Rota sintética simplificada para obtenção do composto H₂bdtc.

4.1.2. Caracterização do composto H₂bdtc

O composto H₂bdtc foi caracterizado por análise elementar (Tabela 7), espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia UV-Visível, espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas (ESI-Tof). O H₂bdtc apresenta-se como escassamente solúvel em meio aquoso, porém solúvel em solventes orgânicos, tais como acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsufóxido, entre outros.

Tabela 7: Resultado de análise elementar para o composto H₂bdtc. Os valores obtidos são consistentes com a estrutura proposta.

H ₂ bdtc	% C Teórico / experimental	% H Teórico / experimental	% N Teórico / experimental
C ₁₈ H ₁₈ N ₂ OS ₂	63,13 / 64,86	5,30 / 5,71	8,18 / 8,27

4.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto H_2bdtc

A técnica RMN foi utilizada no intuito de comprovar se a estrutura molecular do composto H_2bdtc determinada no estado sólido se mantinha em solução. O RMN de próton (1H -RMN) foi realizado em solução de diclorometano deuterado e é apresentado na figura 13. Os picos observados foram caracterizados baseados na estrutura do composto e comparados com compostos semelhantes descritos na literatura [18, 25] ou através da simulação do espectro, utilizando-se o software Chemdraw 12, figura 1 (anexo). A atribuição dos picos se encontra na parte experimental.

Figura 13: Espectro de 1H -RMN do composto H_2bdtc (400 MHz, CD_2Cl_2).

O pico relativo ao grupo $-CH_3$ é observado como um singleto em δ 2,10 ppm, não sendo observado acoplamento com o grupo CH_2 do anel. Por outro lado, os átomos de hidrogênio do grupo CH_2 do anel cíclico não são magneticamente equivalentes, aparecendo como dois dubletos em δ 3,06 e 3,46 ppm com constante de acoplamento 16 Hz. O mesmo ocorre com os átomos de hidrogênio do grupo SCH_2 , os quais também são observados como dois dubletos mais desblindados devido à ligação ao enxofre com δ 4,29 e 4,41 ppm. O grupo hidroxila ligado ao anel pirazolínico apresenta-se como um singleto em 6,41 ppm. Os prótons aromáticos são observados na região característica de 7,23 – 7,42 ppm como um multipeto. Evidencia-se, ainda, na figura 13, pico na região de 5,32 ppm, o qual foi atribuído ao solvente residual CH_2Cl_2 .

A atribuição por RMN do composto H_2bdtc descrita neste trabalho é consistente com aquela descrita para a estrutura de raios X do monocristal do mesmo composto [25], confirmando que a estrutura do estado sólido se mantém em solução. O espectro RMN dessa espécie é reprodutível por pelo menos 24 h, o que pode servir um indício de estabilidade da espécie em solução de diclorometano.

4.1.2.2. Espectroscopia UV- Vis para o composto H_2bdtc

O espectro eletrônico do composto H_2bdtc em acetonitrila está representado na figura 14.

Figura 14: Espectro de absorção na região do UV-visível para o composto H_2bdtc , em acetonitrila ($1,0 \times 10^{-4}$ mol. L^{-1}).

Considerando-se a estrutura molecular cíclica, é possível observar a possibilidade de transições eletrônicas procedentes dos pares de elétrons sobre átomos de nitrogênio e enxofre para os orbitais de natureza π^* [59], além de transições do tipo $\pi-\pi^*$, conforme diagrama simplificado (figura 15).

Figura 15: Diagrama de orbital molecular simplificado demonstrando as transições eletrônicas $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$.

Experimentalmente, as bandas $n-\pi^*$ apresentam coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de baixa intensidade (cerca de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) enquanto a transição $\pi-\pi^*$ é da ordem de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [59]. O composto H_2bdtc , em acetonitrila, mostrou bandas em 243 nm ($\epsilon = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 290 nm ($\epsilon = 4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e 415 nm ($\epsilon = 8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A afirmativa sobre a natureza das bandas foi comprovada por cálculos teóricos, utilizando-se DFT (Teoria do Funcional da densidade). A composição dos orbitais de fronteira do composto H_2bdtc é mostrada na figura 16, o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO; highest occupied molecular orbital) e o orbital não ocupado de mais baixa energia (LUMO; lowest unoccupied molecular orbital). No caso do HOMO, é possível ver uma composição majoritária dos elétrons desemparelhados dos átomos de enxofre, enquanto que, no LUMO, é observada uma maior contribuição dos orbitais π^* presentes nos anéis fenílicos [$\pi^*\text{C}=\text{C}$].

LUMO

HOMO

Figura 16: Representação dos orbitais HOMO e LUMO.

Empregando a DFT, foi possível interpretar a transferência de carga no espectro do UV-Vis, como pode ser visto na figura 17. Examinando os resultados dos métodos DFT, observa-se que a banda em 415 nm é referente a uma transição eletrônica do orbital HOMO-1 para o LUMO. No entanto, a banda em 300 nm representa a transição do orbital HOMO-2 para o LUMO. O HOMO-1 apresenta uma composição majoritária dos elétrons desemparelhados (Lone pair electrons - lp(S) e uma minoritária da ligação π C-S. No caso do HOMO-2, este é representado por uma contribuição dos elétrons desemparelhados do nitrogênio lp(N), π do lp(S) e da ligação π^* entre o carbono e o nitrogênio [π^* C=N].

Figura 17: Transições eletrônicas calculadas por DFT para o composto H₂bdtc

Baseado nestes dados e, em função do espectro eletrônico observado (Figura 15), pode-se concluir que as bandas de baixa energia (415 e 290 nm) tem, essencialmente característica $n-\pi^*$, enquanto a de mais alta energia (243 nm) seria melhor atribuída como sendo $\pi-\pi^*$.

4.1.2.3. Espectroscopia na região do infravermelho para o composto H₂bdtc

O espectro de infravermelho do composto H₂bdtc, em pastilha de KBr (Figura 18A - traçado preto), mostrou uma banda intensa na região 3.350 cm^{-1} , a qual, por comparação à literatura [60], foi atribuída ao estiramento vibracional ν_{OH} . O experimento conduzido em solução de diclorometano, desse mesmo composto, apresentou banda na mesma região (Figura 18B - traçado vermelho), porém com

largura de meia banda cerca de 3 vezes maior àquela obtida em pastilha de KBr. Isso, provavelmente, deve-se a ligações de hidrogênio inter e intramolecular envolvendo a molécula H_2bdtc . Outra análise importante e pertinente a esta discussão, deve-se à manutenção da estrutura cíclica do composto em solução, observado pelo assinalamento de ν_{OH} . Além disso, os espectros de infravermelho em pastilha de KBr, figura 2 (anexo) e em solução (figura 19), não apresentaram bandas na região de 1.700 cm^{-1} , cuja região é atribuída ao estiramento vibracional $\nu_{C=O}$. O composto caracteriza-se, ainda, por apresentar banda na região de 1.630 cm^{-1} , a qual foi atribuída à vibração ν_{CN} . Tentativas de atribuição de todas as bandas observadas no espectro infravermelho do composto H_2bdtc podem ser vistas na tabela 8.

Figura 18: Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}), região de $4000 - 2000\text{ cm}^{-1}$, para o composto H_2bdtc , (---) pastilha de KBr e (---) em solução de diclorometano.

Figura 19: Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}), região de 2000 a 500 cm^{-1} , para o composto H_2bdtc em solução de diclorometano.

Tabela 8: Dados do espectro na região do infravermelho em (cm^{-1}) para o composto H_2bdtc em diclorometano, tentativas de atribuições.

Tentativas de atribuições	Estiramento	ν (cm^{-1})
H_2bdtc	O-H	3359
	C=N	1629
	C-C	1494
	CH_2	1441
	N-N-C	1375
	C=S	1125
	S-C-S	983
	C-S	853

Os dados relativos ao infravermelho em KBr são semelhantes àqueles descritos na tabela 8.

4.1.2.4. Espectrometria de massas em modo positivo e negativo (ESI-MS) para o composto H₂bdtc

A espectrometria de massas por ionização eletrônica (ESI-Tof) foi usada para caracterizar os processos relacionados à fragmentação do composto H₂bdtc. As figuras 3 e 4 (anexo) apresentam alguns desses espectros de massas obtidos de experimentos realizados, tanto no modo positivo, quanto no negativo. O íon molecular do composto H₂bdtc apresenta a massa molecular monoisotópica de 342,0860. O experimento, cujo resultado é apresentado na figura 20, realizado no modo negativo, apresentou $m/z = 341,0776$. Esse valor é consistente à estrutura {H₂bdtc – 1H}⁻, calculada teoricamente,⁶ a qual apresenta o valor de massa monoisotópica de 341,0782. Semelhante experimento desenvolvido no modo positivo apresentou espectro de massas $m/z = 365,0760$, o que é relativo à espécie {H₂bdtc + Na}⁺ $m/z = 365,0760$ (Figura 21).

⁶< www.chemcalc.org/analyse>

Figura 20: Espectrometria de massas por ionização eletrônica no modo negativo, para o composto H₂bdtc. Os espectros de massas foram obtidos em metanol.

Figura 21: Espectrometria de massas por ionização eletrônica no modo positivo, para o composto H₂bdtc. Os espectros de massas foram Obtidos em metanol.

Após a síntese e caracterização do composto H₂bdtc, os estudos *in vitro* sobre *T. cruzi* foram realizados.

4.2. Atividade tripanocida e avaliação citotóxica *in vitro*

4.2.1. Atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas de cepa Y, CL Brener e colombiana.

Visando aos ensaios *in vivo*, foi avaliada a atividade tripanocida *in vitro* do composto H₂bdtc em cepa Y, CL Brener e colombiana de *T. cruzi*. A atividade tripanocida do composto H₂bdtc foi avaliada sobre a forma tripomastigota. A concentração de droga que inibiu 50,0% do crescimento (IC_{50try}) variou de 0,5 a 3,6 μ M (Tabela 9). Além disso, o composto H₂bdtc não apresentou citotoxicidade em células do baço de camundongos (Figura 25B - Item 4.4.1).

Tabela 9: Atividade tripanocida, do composto H₂bdtc sobre as formas tripomastigotas para três cepas diferentes, Y, CL Brener e colombiana.

Compostos	IC _{50try} (μ M)		
	Y	CL Brener	Colombiana
BZN	0,5 $\pm$ 0,39	12,6 $\pm$ 0,41	20,0 $\pm$ 0,18
H ₂ bdtc livre	0,5 $\pm$ 0,12	2,1 $\pm$ 0,32	3,6 $\pm$ 0,50

A importância desse experimento se deve às diferenças na resposta à terapêutica medicamentosa com BZN, que está associada a características genéticas das cepas de *T. cruzi*. A baixa eficácia (0,0 – 19,0%) do tratamento etiológico da doença de Chagas com BZN, na fase crônica tardia da doença [61, 62] e a discrepância do índice de cura obtido em diferentes regiões, provavelmente, ocorrem devido às diversas características genéticas entre as populações de *T. cruzi* [63]. Pode-se observar, na tabela 9, que o composto H₂bdtc foi mais ativo que o BZN para as cepas CL Brener e colombiana. No entanto, para a cepa Y ambos os compostos apresentaram a mesma atividade tripanocida de 0,5 μ M. Dessa forma, sabendo-se que a cepa Y é considerada uma cepa mais resistente [64], ela foi

selecionada para os estudos *in vivo*. Entretanto, para os estudos serem conduzidos *in vivo*, houve a necessidade do desenvolvimento de um sistema de liberação. Uma vez que o composto H₂bdtc se apresentou insolúvel em água.

4.3. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)

Recentemente, uma grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento de sistemas de liberação com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade e, consequentemente, a eficácia terapêutica de fármacos, em razão da baixa solubilidade em água, que grande parte apresenta. Nos últimos anos, houve um maior interesse nas nanopartículas lipídicas sólidas, uma vez que tais sistemas são biocompatíveis e podem controlar a liberação de fármacos. Diante do exposto, o composto H₂bdtc foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, devido a seu caráter hidrofóbico, visando a uma melhor biodisponibilidade, por meio da administração oral [65]. As características físico-químicas das NLSs obtidas podem ser visualizadas na tabela 10.

Tabela 10: Caracterização do composto H₂bdtc encapsulado em NLSs.

Tamanho médio (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação	Perda (%) EE%
119,8 ± 14,8	0,229 ± 0,130	-53,00 ± 6,75	89,35 ± 7,31	41,17 ± 9,29

O composto H₂bdtc mostrou um caráter lipofílico ($\log P(o/w) = 2.6960 \pm 03$) e foi eficientemente encapsulado em NLSs. O tamanho apresentado pelas NLSs contendo o composto H₂bdtc foi de 119,8 nm (Figura 23), tamanho adequado ao objetivo proposto, uma vez que o tamanho de partícula (50 – 200 nm) é o fator

principal na absorção das NLSs pelo sistema linfático, presente no trato gastrointestinal [66]. O índice de polidispersividade (PDI) encontrado foi de $0,229 \pm 0,130$, caracterizando o sistema como monodisperso (Figura 23). As NLSs são sistemas termodinamicamente instáveis de modo que, para a estabilidade desses sistemas, um valor de potencial zeta igual ou maior que 30 mV em módulos são desejados [65]. O potencial zeta das NLSs contendo H₂bdtc foi igual a $-53,00 \pm 6,75$, sugerindo a estabilidade termodinâmica das NLSs. Imagens de microscopia de força atômica revelaram que as NLSs contendo H₂bdtc eram esféricas, com um diâmetro médio de 180 nm (Figura 22), concordando com os PCS resultados (Figura 23).

Figura 22: Distribuição granulométrica das NLSs contendo o composto H₂bdtc.

Figura 23: Microscopia de Força Atômica de H₂bdt-NLS (A) 2 μm X 2 μm imagem tridimensional. (B) 2 μm X 2 μm imagem planar.

A eficiência de encapsulação é definida como a porcentagem de fármaco incorporado dentro das NLSs em comparação com o total de fármaco adicionado. Apesar da alta eficiência de encapsulação das NLSs $89,35 \pm 7,31$, a quantidade de fármaco que é perdida durante o seu processo de obtenção por microemulsão é muito grande: $41,17 \pm 9,29$. Essa perda está diretamente relacionada a dois fatores: ao recipiente utilizado para dispersão da microemulsão (ME) e à ponteira usada para gotejamento desta na água gelada. Porém, podemos considerar a perda do fármaco pequena, já que se trabalhou com baixas concentrações das NLSs produzidas em laboratório.

4.3.1. Liofilização das NLSs

Um dos maiores obstáculos no uso de nanopartículas está relacionado à instabilidade física (agregação/ fusão das partículas) ou química (hidrólise, expulsão do fármaco da partícula, reações químicas do fármaco durante o período de armazenamento) quando esses sistemas são armazenados na forma de dispersão aquosa. A liofilização, que consiste em remover a água a partir de uma amostra

congelada por sublimação ou dessorção a vácuo, tem sido relatada como método para melhorar a estabilidade desses sistemas [67]. No entanto, durante o processo de liofilização, ocorre a agregação das nanopartículas quando esse processo ocorre na ausência de substâncias, chamadas crioprotetores, que têm a função de prevenir a agregação das partículas após sua ressuspensão. Na maioria das vezes, sacarídeos são utilizados como crioprotetores, de modo que os dissacarídeos sucrose, maltose e trealose são crioprotetores mais efetivos que os monossacarídeos glucose e galactose.

O mecanismo proposto para a prevenção da agregação é a formação de ligações de hidrogênio entre o açúcar e o lipídeo da matriz das NLSs, de modo que essa interação parece ser mais forte com os dissacarídeos [68]. Nesse estudo, o tamanho de partícula (Figura 24), índice de polidispersividade e potencial zeta das NLSs após o processo de liofilização foi de $305,9 \pm 19,4$; $0,441 \pm 0,039$ e $60,23 \pm 2,65$ respectivamente. Esse aumento no tamanho das partículas pode ser decorrente do processo de liofilização. Embora, na presença de crioprotetor, favoreça um pequeno aumento no tamanho das partículas e no índice de polidispersividade, esse aumento é mais acentuado em processos que ocorrem na ausência do crioprotetor [69].

Figura 24: Distribuição granulométrica das NLSs liofilizadas contendo H₂bdtc

Porém, esses sistemas encontram-se fora da faixa nanométrica adequada para uma eficiente absorção pelo trato gastrointestinal. Por segurança, o composto H₂bdtc foi encapsulado em NLSs sempre que houve tratamento oral.

4.4. Atividade tripanocida e citotoxicidade *in vitro* para composto H₂bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas

4.4.1. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas Tripomastigotas

O composto H₂bdtc apresentou um IC₅₀ de 0,5 µM sobre a cepa Y, além de não ser citotóxico *in vitro*, por isso os experimentos *in vivo* se tornaram de grande interesse. No entanto, o composto H₂bdtc apresentou-se insolúvel em água e com o intuito de aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade *in vivo*, o composto foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Dessa forma, o composto H₂bdtc pôde ser avaliado *in vivo* em modelo experimental murino. Entretanto, antes dos experimentos *in vivo*, foi avaliada a capacidade tripanocida e a citotoxicidade do composto H₂bdtc encapsulado em NLSs. Os experimentos foram feitos *in vitro* da mesma forma que foram feitos para o composto H₂bdtc livre. Na figura 25A, pode-se observar que o composto H₂bdtc livre, o composto H₂bdtc encapsulado em NLS e o BZN apresentaram atividade tripanocida muito semelhante e que essa atividade não foi associada a uma citotoxicidade geral (Figura 25B), mas, sim, à atividade específica contra o parasito.

Figura 25: A) Porcentagem de atividade tripanocida do composto H₂bdtc livre e encapsulado sobre a cepa Y do *T. cruzi*, testada como descrito em materiais e métodos. B) Porcentagem da citotoxicidade do composto H₂bdtc livre e encapsulado em NPS sobre células do baço de camundongos. As células foram incubadas com diferentes concentrações do composto e sua viabilidade foi testada 24 h após pela adição de iodeto de propídeo.

Após avaliar a atividade tripanocida do composto H₂bdtc sobre a forma tripomastigota (forma infectante) da cepa Y, avaliou-se também a atividade tripanocida do composto sobre a forma amastigota (forma replicativa).

4.4.2. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas amastigotas

A atividade tripanocida do H₂bdtc-NLS sobre a forma amastigota (forma replicativa intracelular do parasito) da cepa Y mostrou uma alta eficiência na redução da replicação intracelular do *T. cruzi*, quando comparada com H₂bdtc livre e o BZN, apresentando IC_{50try} de 7, 46 e 22 µmol, respectivamente (Figura 26). Possivelmente, o H₂bdtc encapsulado em NLSs apresentou uma maior facilidade de transposição da membrana do MO, permitindo, assim, uma melhor atividade *in vitro* comparada com H₂bdtc livre. A importância de avaliar a atividade do H₂bdtc sobre a forma amastigota se deve ao fato de que essa forma do parasita está envolvida em parte com a cardiomiopatia e também com a manutenção da infecção durante a fase indeterminada da doença de Chagas. Há, ainda, evidências de que a forma amastigota também é capaz de infectar células [70].

Figura 26: Atividade tripanocida do H₂bdtc livre ou encapsulado em NLS e BZN contra formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, análise quantitativa de parasitos por células de MO.

4.5. Atividade tripanocida e citotoxicidade *in vivo* para composto H₂bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas sobre as formas tripomastigotas de cepa Y

4.5.1. Toxicidade aguda *in vivo*

Os resultados obtidos *in vitro* com composto H₂bdtc livre e/ou encapsulado foram promissores, de forma que nos incentivou a testar seus efeitos de toxicidade agudas *in vivo*, em modelo experimental murino.

Segundo a ANVISA [71], “estudos de toxicidade aguda” são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por um fármaco quando este é administrado em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 h, seguido de observações dos animais por 14 dias após a administração. Devem-se utilizar duas vias de administração, a que se pretende administrar em humanos, que, no caso do H₂bdtc, foi a via oral (a administração do H₂bdtc para os animais foi realizada por gavagem), e a via endovenosa. Porém, somente a via oral foi testada neste trabalho. Após a administração oral *in vivo* do H₂bdtc livre e H₂bdtc-NLS, para as doses de 10, 50, 100 µm/kg, observou-se que não houve nenhuma alteração significativa da massa corpórea dos animais. O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância [72]. Também não foram observados quaisquer outros sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada no período de 14 dias. Esses dados ilustram o quanto o composto H₂bdtc pode ser eficaz no controle da doença de Chagas.

Após avaliar a toxicidade aguda do composto H₂bdtc, fez-se uma curva de concentração *versus* efeito. Essa curva possibilitou a definição da dose de tratamento dos animais infectados com *T. cruzi*, na fase aguda da doença de Chagas.

Durante o tratamento para determinar a concentração *versus* efeito (dose do H₂bdtc livre e H₂bdtc-NLS capaz de reduzir 100,0% da parasitemia), foi observada a redução da parasitemia em função do tipo de droga aplicada, relativa ao tempo. Para tanto, foi medido o número de parasitos por microlitro de sangue. Esse experimento foi conduzido tanto para H₂bdtc livre, quanto encapsulado (H₂bdtc-NLS). Esses dados estão ilustrados na figura 27.

Figura 27: Avaliação in vivo da atividade tripanocida H₂bdtc livre e H₂bdtc-NLS (concentrações 4, 40 e 80 μM) (___) taxa de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com PBS.. (___) taxa de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados de H₂bdtc livre. (___) taxa de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com H₂bdtc-NLS. A parasitemia foi monitorada nos dias 7, 9, 11 e 13 após a infecção. A média + EPM é mostrada e é representativa de três experiências independentes (n = 7). Diferença estatisticamente significativa em comparação com o H₂bdtc livre. O tratamento estatístico foi dado através do Teste *t* Student: ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

No gráfico anterior, podemos observar reduções de 90,0, 86,0 e 80,0% para os animais que receberam H₂bdtc-NLS nas doses de 4, 40 e 80 μmol/kg, respectivamente. Observou-se que a diminuição da atividade tripanocida ocorreu com o aumento da concentração da droga encapsulada. Isso foi relacionado à agregação da nanopartícula, a qual, posteriormente, foi constatada também em solução. O grupo de animais que recebeu H₂bdtc livre apresentou uma redução de 25,0% da parasitemia em todas as concentrações administradas, 4, 40 e 80 μmol/kg, quando comparado com o grupo controle (figura 27 - traços vermelhos) de animais que receberam PBS.

Examinando a concentração *versus* efeito, também não foi observada para H₂bdtc livre o aumento da atividade tripanocida com o aumento da dose. Isso ocorre, provavelmente, devido à limitação da sua solubilidade em água, a qual foi determinada por espectroscopia UV-visível ($1,50 \times 10^{-6}$ M). Diante do exposto, e, buscando entender a maior eficiência tripanocida observada, quando o composto H₂bdtc foi encapsulado em NLS, determinou-se o coeficiente de partição. O resultado encontrado mostrou uma característica lipofílica para H₂bdtc ($\text{Log } P(o/a) = 2,69 \pm 0,03$). De certa forma, isso explica a maior eficiência do H₂bdtc quando encapsulado em NLS.

4.5.2. Inoculação dos animais e tratamento – Fase aguda

Os resultados obtidos com o tratamento *in vitro* e *in vivo* (toxicidade aguda e concentração *versus* efeito) com o composto H₂bdtc, em suspensão e/ ou encapsulado, foram animadores, de forma que nos incentivou a testar seu efeito tripanocida *in vivo* em modelo experimental murino de infecção por *T. cruzi* (fase aguda). O tratamento de camundongos Swiss infectados com 2.000 formas da cepa Y de *T.cruzi* se iniciou no 5º dia de infecção e se prolongou por 10 dias consecutivos. A dose utilizada foi de 4,0 µmol/kg do composto H₂bdtc em suspensão e H₂bdtc-NLS diariamente. Enquanto que o BZN foi administrado na dose de 400,0 µmol/kg (dose clinicamente utilizada), e 4,0 µmol/kg a fim de comparação com o composto H₂bdtc. Após o início do tratamento, a parasitemia foi observada nos dias 7, 9, 11 e 13 após a infecção. A parasitemia é avaliada por ser um parâmetro importante para o estudo da doença de Chagas, pois nos permite diferenciar a fase aguda e crônica da infecção [73]. Dessa forma, observamos que a parasitemia (Figura 28A) foi significativamente reduzida após o tratamento dos camundongos com H₂bdtc-NLS, o que não foi observado após o tratamento com o composto não encapsulado. Além disso, a sobrevivência dos animais tratados com H₂bdtc-NLS foi significativamente melhorada, não apresentando nenhuma morte dos camundongos tratados até dois meses após a infecção (Figura 28B), assim como o BZN na dose clínica figura 5 (anexo). É importante notar que esses efeitos foram observados após

o tratamento dos animais com uma dose do composto H₂bdtc-NLS em uma concentração 100 vezes menor que a concentração normalmente utilizada no tratamento com BZN, resultado extremamente promissor.

Figura 28: Parasitemia (A) e sobrevivência (B) de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com H₂bdtc e H₂bdtc-NLS. Camundongos Swiss (7 por grupo) foram infectados com 2000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e a partir do 1º dia de parasitemia patente (5º dia de infecção), os camundongos foram tratados por gavagem com 4,0 μmol/kg dos compostos H₂bdtc-livre e H₂bdtc-NLS diariamente por 10 dias. O controle negativo foi tratado com PBS. O BZN (4,0 e 400 μmol/kg) foi usado como o tratamento de referência. A parasitemia foi acompanhada nos dias 7, 9, 11 e 13 após a infecção.

4.5.2.1 . Inflamação e lesão cardíaca de camundongos Swiss infectados com *T. cruzi* tratados e não tratados

Durante a infecção por *T. cruzi*, há uma grande produção de quimiocinas que leva a um intenso infiltrado inflamatório principalmente no coração. Esses infiltrados inflamatórios são caracterizados pela presença de grande número de leucócitos e

intensa resposta inflamatória na fase aguda da doença. Acredita-se que os parasitos desempenham um papel importante na determinação das lesões cardíacas, e que drogas específicas poderiam reduzir o dano do miocárdio em seres humanos [74]. Os dados da literatura também indicam a reversibilidade da fibrose cardíaca em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi*, quando tratados com quimioterapia específica [75]. Nesse contexto, o tecido cardíaco de animais infectados e submetidos a tratamento com H₂bdtc-livre, H₂bdtc-NLS e BZN foram avaliados pelo método de H&E (Figura 29).

Figura 29: Histopatológica de corte de coração de camundongo Swiss infectado pelo *T. cruzi* no 21º dia pós-infecção corado por H&E. Pode se observar extenso infiltrado inflamatório com células mononucleares. Aumento de 400 x. Tratamento via oral durante 10 dias consecutivos com 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ de BZN ou 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ do composto H₂bdtc- livre e H₂bdtc-NLS. (A) Animal naíve (não infectado), (B) Animal infectado tratado apenas com solução salina (PBS), (C) animal tratado com BZN 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$, (D) animal tratado com o composto H₂bdtc-livre 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ e (E) animal tratado com o composto H₂bdtc-NLS 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$.

Após quantificação do infiltrado inflamatório (Figura 30), foi observado que todos os grupos de camundongos tratados com H₂bdtc livre, H₂bdtc-NLS e BZN tiveram uma diminuição dos níveis de inflamação em comparação com o grupo tratado com PBS (controle negativo). Porém, os camundongos que receberam H₂bdtc-NLS mostraram uma maior redução na inflamação cardíaca, em comparação com camundongos tratados com H₂bdtc livre ou BZN.

Figura 30: Quantificação de núcleos celulares, por 50 μm^2 do tecido cardíaco de animais não tratados e tratados.

Os níveis plasmáticos de CK-MB, indicador de lesão cardíaca [52, 76], foram medidos (Figura 31).

Figura 31: Avaliação da lesão cardíaca através da quantificação enzimática CK-MB.

Os camundongos tratados com H₂bdtc livre mostraram uma diminuição de 50,0% nos níveis de enzimas de CK-MB, quando comparados com os grupos de camundongos tratados com BZN ou PBS. No entanto, os camundongos tratados com H₂bdtc-NLS não apresentaram níveis sanguíneos dessa enzima, mostrando-se mais eficaz do que o BZN no controle da infecção com *T. cruzi* ao evitar danos cardíacos. Sabendo-se que o processo inflamatório está associado com a presença de *T. cruzi* nos tecidos, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para quantificar o DNA do parasito no coração (Figura 32).

Figura 32: A quantificação da carga parasitária em amostras de tecidos cardíacos de camundongos infectados por PCR na fase aguda da doença.

Pode ser visto, na figura 32, que o H₂bdtc-NLS foi mais eficaz na redução da carga parasitária em relação aos outros grupos, o que mostra que a redução do infiltrado inflamatório e a ausência de lesão cardíaca se devem a uma queda no parasitismo tecidual provocada pelo composto.

4.5.2.2. Avaliação da lesão hepática - Dosagem da enzima transaminase glutâmico pirúvica (TGP)

Visto que o fígado e coração são os principais órgãos afetados pela infecção com *T. cruzi*, nós avaliamos a capacidade das drogas em diminuir a lesão hepática. Quando os hepatócitos sofrem algum dano, eles liberam, no sangue, enzimas que podem ser medidas como indicadores de lesão celular. A transaminase glutâmica

pirúvica (TGP ou ALT) é uma dessas enzimas. Tal enzima é significativamente elevada na hepatite e em outras causas de lesões hepáticas agudas. Quando o fígado é ferido ou inflamado, os níveis de TGP no sangue normalmente aumentam [77, 78]. Observamos que os níveis séricos de TGP (Figura 33) foram significativamente maiores nos grupos infectados e não tratados quando comparados aos grupos dos animais tratados com o composto H₂bdtc-NLS. Por outro lado, os animais tratados com H₂bdtc livre e BZN não apresentaram nenhuma melhora. Esses dados indicam que o H₂bdtc-NLS confere uma proteção ao órgão, o que possivelmente contribui para melhora na sobrevivência desses animais.

Figura 33: Representação gráfica dos valores de transaminase glutâmico pirúvica - TGP (U/mL), para Camundongos Swiss (7 por grupo) infectados com 2000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratados por gavagem com 4,0 μ mol/kg do composto H₂bdtc-livre, H₂bdtc-NLS e BZN diariamente por 10 dias. O controle negativo foi tratado com PBS. Cada ponto é a média + SEM e é representativa de três experimentos independentes (n = 7). Diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (P < 0,05) são indicados por

Outro experimento realizado com o objetivo de avaliar a capacidade do composto H₂bdtc em reduzir os danos do fígado causados pelo parasita *T. cruzi* foi por hematoxilina-eosina (H&E) (Figura 34A). Por meio da análise por H&E, foi possível quantificar o infiltrado inflamatório (Figura 34B). A partir dessas análises, notou-se que o H₂bdtc-NLS revelou-se mais eficaz na redução do infiltrado inflamatório no fígado, assim como na diminuição da toxicidade hepática.

Figura 34: Efeito do H₂bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas na redução dos danos no fígado causados pelo parasita *T. cruzi* (A) secções representativas do fígado 21 dias após a infecção. (B) Quantificação de núcleos celulares por 50 μm^2 de tecido de animais não tratados e tratados. O controle negativo foi tratado com PBS.

Os resultados promissores *in vitro* nos levaram a realizar estudos *in vivo*, em modelo murino de doença de Chagas aguda. O tratamento foi iniciado com uma dose oral relativamente baixa de H₂bdtc livre ou encapsulado (4,0 µmol/ kg/ dia, ou seja, 10 mg/ Kg/ dia), quando comparada com outros compostos da literatura estudados para este modelo [79]. O H₂bdtc-NLS foi capaz de diminuir a presença de parasitos no sangue dos camundongos, mantendo a sobrevivência de 100,0%, enquanto que 43,0% dos animais tratados com composto H₂bdtc livre, assim como BZN, na mesma concentração, sucumbiram. Provavelmente, a diferença de atividade tripanocida entre o H₂bdtc livre e H₂bdtc-NLS deve-se ao aumento da biodisponibilidade oral do composto, quando encapsulado. Diversos estudos têm relatado a melhora na absorção intestinal e biodisponibilidade oral de fármacos encapsulados em NLS [80-83].

Fatores como estabilidade e solubilidade do fármaco, além de tempo de residência e permeabilidade na membrana, limitam a taxa e extensão da absorção oral de fármacos [80]. As NLSs mostram-se como uma alternativa para superar essas limitações. Além disso, tem sido proposto que o transporte linfático é o principal mecanismo de absorção de fármacos encapsulados em NLSs com tamanho na faixa de 20-500 [84, 85], reduzindo o metabolismo de primeira passagem. Esses fatores, em conjunto, provavelmente resultaram em maior absorção e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade oral do composto, melhorando sua atividade *in vivo*.

Na tentativa de elucidar a cura parasitológica causada pelo H₂bdtc-NLS, cortes histológicos dos tecidos cardíacos dos camundongos tratados e não tratados foram avaliados e o infiltrado inflamatório quantificado. O infiltrado inflamatório estava diminuído para todos os grupos tratados, porém os camundongos tratados com H₂bdtc-NLS tiveram uma redução bem maior, o que ocorre provavelmente devido à redução da parasitemia [86]. Ademais, quando a lesão cardíaca foi analisada pelo ensaio enzimático de CK-MB, pôde-se observar que o tecido cardíaco dos camundongos tratados com o composto H₂bdtc encapsulado estava totalmente preservado. Infiltrados inflamatórios estão, na maioria das vezes, relacionados a processos em que existe alta carga parasitária, a qual induz lesão tecidual. Os estudos de PCR mostraram que a carga parasitária, nos tecidos cardíacos dos camundongos tratados com H₂bdtc encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, apresentou-se estatisticamente menor em relação aos outros

grupos. Dessa forma, a redução do parasitismo pelo H₂bdtc-NLS resultou na preservação do tecido cardíaco dos camundongos infectados com *T. cruzi*. A partir dos resultados citados, podemos sugerir que o composto H₂bdtc é um potente agente tripanocida. Aparentemente, a nanopartícula desenvolvida nesse trabalho constitui, para o composto utilizado, um sistema eficaz de administração por via oral. Portanto, com esses resultados promissores na fase aguda da doença de Chagas, estudo *in vivo*, na fase crônica da doença, tornou-se imprescindível.

4.5.3. Inoculação dos animais e tratamento – Fase crônica

Durante a infecção por *T. cruzi*, os camundongos apresentam lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíacos, muito semelhantes às causadas pela doença em humanos [87]. Dessa forma, os animais foram infectados com a cepa Y de *T. Cruzi*; esperaram-se 90 dias para que a doença se tornasse crônica e fez-se o tratamento por 30 dias consecutivos, conforme descrito no item 3.6.3.

Quando avaliamos o tecido cardíaco (por H&E) dos grupos de animais tratados por via oral (Figura 35), observamos que não houve redução do infiltrado inflamatório (Figura 36), exceto para o grupo que recebeu BZN na dose clínica (400 µmol /kg/dia). Vale ressaltar que o BZN (dose clínica), na dose 100 vezes maior que o H₂bdtc, foi capaz de reduzir apenas 15,0% em relação ao grupo de animais infectados e não tratados (receberam apenas PBS).

Figura 35: Histopatológica de corte de coração de camundongo Swiss infectado pelo *T. cruzi* no 120º dia pós-infecção corado por H&E. Pode se observar extenso infiltrado inflamatório com células mononucleares. Aumento de 400 x. Tratamento via oral durante 30 dias consecutivos com 400 $\mu\text{mol/kg/dia}$ (dose usada clinicamente), 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ de BZN ou 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ do composto H_2bdtc -livre e H_2bdtc -NLS. (A) Animal naive (não infectado), (B) Animal infectado tratado apenas com solução salina (PBS), (C) animal tratado com BZN⁺ 400,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$, (D) animal tratado com BZN⁻ 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$, (E) animal tratado com o composto H_2bdtc -livre 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$ e (F) animal tratado com o composto H_2bdtc -NLS 4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$.

Figura 36: Quantificação de núcleos celulares, por 50 μm^2 do tecido cardíaco de animais não tratados e tratados. * Diferenças estatisticamente significativa com relação ao grupo infectado sem tratamento ($P < 0,05$).

No entanto, uma outra metodologia que foi utilizada para detectar parasito em tecidos cardíacos dos camundongos foi a detecção do DNA, por meio do PCR. Os resultados obtidos com a metodologia por PCR mostram sensibilidade entre 96,5% e 100,0% [88, 89]. Assim, pode-se observar que todos os grupo tratados e não tratados apresentaram resultados positivos para *T. Cruzi* (Figura 37). O grupo que recebeu PBS apresentou uma carga parasitária de $1,7 \times 10^3$ parasitos por mg de tecido cardíaco. Enquanto que os grupos que receberam os compostos H₂bdtc-livre, H₂bdtc-NLS e BZN⁻ (4,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$) na mesma concentração apresentaram também uma alta carga parasitária, na mesma ordem de grandeza do grupo controle (PBS). O BZN⁺ (dose clínica - 400,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$) , aparentemente, reduziu o infiltrado inflamatório em 15,0%, porém não apresentou uma redução da carga parasitária significativa em relação ao grupo de animais infectados e não tratados.

Figura 37: A quantificação da carga parasitária em amostras de tecidos cardíacos de camundongos infectados por PCR na fase crônica da doença.

A partir dos resultados mostrados na figura 37, pode-se observar que não houve redução do parasitismo para nenhum dos grupos tratados. O H₂bdtc-NLS mostrou-se um potente agente tripanocida na fase aguda, no entanto, na fase crônica da doença, não foi capaz de reduzir a carga parasitária. A promissora atividade tripanocida do composto H₂bdtc, na fase aguda, e a ausência da atividade, na fase crônica da doença, levaram-nos a investigar a interação do composto com biomoléculas. O estudo de interação do composto com a biomolécula albumina representa um importante modelo *in vitro*, para se entender possível mecanismo de transporte de droga.

4.6. Interação do composto H₂bdtc com a albumina humana (HSA)

Os dados de atividade tripanocida observada para o H₂bdtc nos permitiram verificar que a sua atividade *in vivo*, principalmente para a fase aguda, pode estar relacionada ao mecanismo de transporte da “droga” [90, 91]. Devido à abundância da albumina sérica humana (HSA) no plasma sanguíneo, esta tem sido postulada, para vários fármacos, como um dos principais mecanismos de transportes de drogas. Dessa forma, a albumina foi considerada, neste trabalho, a principal transportadora do composto H₂bdtc no processo de atividade tripanocida e suas propriedades de interação, com os compostos em estudo, foram discutidas. Por ser um tópico específico, uma breve introdução do sistema é abordada a seguir.

4.6.1. Albumina sérica humana no processo de transporte de drogas

O estudo da interação entre uma droga e HSA tem sido uma área de interesse na pesquisa em biologia química e farmacologia [92]. A ligação de uma droga com a HSA resulta em um aumento da solubilidade da droga no plasma, diminuindo sua toxicidade e, ainda, protege a droga ligada contra a oxidação [93]. Por outro lado, a afinidade da droga pela proteína influencia diretamente na concentração da droga no sangue e nos locais de ligação e, conseqüentemente, contribui para a sua efetividade nas ações biológicas *in vivo*. Geralmente, uma fraca ligação da droga à proteína pode conduzir a um tempo de vida curto e ou à má distribuição, enquanto uma ligação forte pode diminuir a concentração de fármaco livre no plasma. Dessa forma, o estudo de interação droga/albumina pode proporcionar informações sobre a característica estrutural que determina a eficácia terapêutica dos medicamentos [94, 95]. Diante do exposto, o estudo de interação de drogas com a HSA *in vitro* tem sido considerado um modelo para o estudo do comportamento de ligação a proteínas plasmáticas.

A HSA tem como principal função a manutenção da pressão osmótica coloidal no sangue e também desempenha um papel chave no transporte, na distribuição e no metabolismo de várias substâncias endógenas e exógenas tais como ácidos graxos, esteroides, nutrientes, íons metálicos, hormônios, enzimas e grande variedade de fármacos através do sangue para o seu alvo molecular [96, 97]. A análise por cristalografia de raios X revelou que a HSA é um monômero de 66 kDa e contém 585 resíduos de aminoácidos. A HSA possui três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B) (Figura 38) e 67,0% da estrutura secundária são formados por α -hélice. A HSA possui apenas um resíduo de cisteína livre, a Cys-34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto, ajudando a manter a estrutura terciária. A HSA contém dois principais sítios de ligação de droga, Sítio-I e Sítio-II, e apenas um resíduo de triptofano (Trp-214) no domínio sub IIA, que é capaz de se ligar, principalmente, a drogas por fortes interações hidrofóbicas [98].

Figura 38: Representação da Estrutura Terciária da HSA, dividida em três principais sítios de ligação. O domínio I está em tons de amarelo e verde (IA e IB respectivamente), o domínio II em tons de vermelho e rosa (IIA a IIB respectivamente) e o domínio

A HSA apresenta três resíduos de aminoácidos que absorvem na região do UV e também emitem fluorescência, são eles: Fenilalanina, tirosina e triptofano. O resíduo de triptofano (Trp-214) é o mais estudado quando se deseja obter parâmetros físico-químicos da interação HSA e drogas. Mudanças conformacionais nesses microambientes, induzidos pela interação entre biomolécula, compostos e ou complexos metálicos, alteram significativamente o processo de fluorescência da albumina e permitem avaliar a ação dos fármacos no organismo. Uma maneira de monitorar essa interação e, conseqüentemente, obter parâmetros físico-químicos é o acompanhamento da supressão de fluorescência da albumina em presença dos compostos de interesse. Quando a HSA é excitada em 280 nm, a emissão de fluorescência ocorre em aproximadamente 330 nm [100].

A supressão da fluorescência envolve a interação direta entre duas espécies, o fluóroforo, responsável pela emissão de fluorescência, e o supressor, o qual causa a diminuição da intensidade desta. Geralmente, os processos de supressão de fluorescência são classificados principalmente como dinâmico e estático, os quais podem ser diferenciados por meio da dependência com a temperatura e, preferencialmente, com o tempo de meia vida. A supressão dinâmica, também chamada colisional, é causada por encontros entre o fluóroforo e o supressor, já a supressão estática resulta da formação de um composto estável entre o supressor e o fluóroforo.

4.6.2 Interação da HSA e o composto H₂bdtc

A interação da HSA com H₂bdtc foi analisada por espectroscopia de fluorescência, visto que alterações estruturais da espécie fluorescente – HSA – podem ser influenciadas quando de sua associação a outra molécula. Geralmente, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência, acompanhada, ou não, de deslocamento do máximo de absorção da banda, quando interações específicas ocorrem. Os mecanismos — estático ou dinâmico — de supressão de fluorescência são apontados como aqueles possíveis entre a “droga” e a HSA. No mecanismo estático, pressupõe-se interação no estado fundamental, enquanto o dinâmico é relacionado a processos colisionais. Geralmente, a diferenciação desses mecanismos é dada pela dependência dos valores de constantes de supressão com a temperatura. O processo pelo qual essas interações são avaliadas é conhecido como processo de Stern-Volmer.

Em termos quantitativos, a fluorescência é dada pela equação de Stern-Volmer (Equação 6) [101].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q]$$

Equação 6

Em que: F_0 e F = intensidade de fluorescência na ausência e na presença de agente supressor (nesse caso, o composto H_2bdtc), respectivamente;

k_{sv} = a constante de Stern-Volmer (eficiência supressora do composto H_2bdtc);

$[Q]$ = concentração do composto H_2bdtc .

Portanto, o gráfico (F_0/F) versus $[Q]$ propicia a determinação da constante K_{sv} .

Os dados de supressão de fluorescência permitem, ainda, determinar a constante cinética K_q , obtida a partir da constante a seguir (equação 7).

$$K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0}$$

Equação 7

Em que: τ_0 = tempo de vida no estado excitado das biomoléculas na ausência do agente supressor, para a HSA, $\tau_0 = 10^{-8} s$ [102];

K_q = constante cinética bimolecular a supressão.

Observações experimentais [101, 102] mostram que, no processo estático, a constante de supressão (K_{sv}) é diminuída com o aumento da temperatura. Já para o mecanismo dinâmico ocorre o inverso, os valores de K_{sv} aumentam com o elevação da temperatura [103].

Em nosso trabalho, os espectros de emissão da HSA, em função da concentração de H_2bdtc , foram obtidos nas temperaturas de 295, 300, 305 e 310 K (Figura 39). Nas condições experimentais desse trabalho, a HSA apresentou uma banda relativamente intensa e alargada na região de 330 nm, quando excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução do composto H_2bdtc levou a uma diminuição gradativa da intensidade dessa banda, conforme ilustrado na figura 39. Essa variação de intensidade pode ser atribuída às mudanças conformacionais do microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano [104].

Figura 39: Espectro de supressão de fluorescência da HSA na presença do composto H_2bdtc a 310 K; $\lambda_{exc} = 280$ nm e $[HSA] = 1,0 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ e $[H_2bdtc] = 0,24$ μ mol. L $^{-1}$ - 500 μ mol. L $^{-1}$.

Os gráficos de F_0/F em função da concentração do composto H_2bdtc estão ilustrados na figura 40 (em diferentes temperaturas). Em todos os processos, observa-se comportamento não linear para o estudo conduzido, se tomada toda a faixa de concentração de H_2bdtc estudada. Avaliação minuciosa desses gráficos permitiu observar que, de fato, o processo global pode ser tomado como devido a duas retas (Figura 41).

Figura 40: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do composto H₂bdtc, com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm, temperaturas de incubação 295, 300, 305 e 310 K.

Figura 41: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do composto H_2bdtc , com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm, temperaturas de incubação 305 K.

A separação em duas retas é atribuída como devida à acessibilidade as formas isoméricas da HSA [105], pela molécula de ataque. Assim, em baixas concentrações ($< 2,0 \times 10^{-6}$ M), obteve-se o primeiro acesso da HSA pelo H_2bdtc , o que permitiu definir K_{sv1} e k_{q1} , para várias temperaturas (Figura 42 e Tabela 11).

Figura 42: Regressão linear para as menores concentrações da curva de Stern-Volmer. com $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$, em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310 K).

Tabela 11: Regressão linear para as menores concentrações da curva de Stern-Volmer com $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$, em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310 K).

T (K)	$Ks_v (\text{M}^{-1})$	$K_q (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
295	$3,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^{12}$
300	$3,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{12}$
305	$4,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^{12}$
310	$4,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^{12}$

Similares experimentos foram conduzidos em concentrações maiores, o que nos permitiu obter Ks_v e kq_2 (Figura 43 e Tabela 12).

Figura 43: Regressão linear para as maiores concentrações da curva de Stern-Volmer com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310 K).

Tabela 12: Regressão linear para as maiores concentrações da curva de Stern-Volmer com $\lambda_{exc}=280$ nm e $\lambda_{em}=330$ nm, em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310K)

T(K)	$Ks_v(M^{-1})$	$K_q(10^{12}M^{-1}S^{-1})$
295	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{12}$
300	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{12}$
305	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{12}$
310	$2,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{12}$

Para ambas as faixas de concentrações ocorre um aumento de Ksv e kq, em função da temperatura. Esse comportamento é típico de processo colisional, o que caracterizaria esse sistema como sendo dinâmico. No entanto, os altos valores de kq

($>10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), o qual é maior que a velocidade difusional, mostra que o sistema seria mais bem tratado como estático. Baseando-se nesses dados e, em comparação a sistemas similares descritos na literatura, a interação da HSA com H₂bdtc consiste de um misto dinâmico e estático.

A supressão da fluorescência da albumina em função da concentração de H₂bdtc permite, ainda, determinar a constante de ligação (k_b) e o número de sítios (n), conforme equação 8, denominada de Equação de Scatchard [106].

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log k_b + n \log[Q]$$

Equação 8

Em que: F e F_0 = intensidades de fluorescência na presença e ausência do supressor, respectivamente.

K_b = constante de ligação Aparente do supressor a HSA;

n = número de potenciais sítios de ligação a HSA;

$[Q]$ = a concentração do supressor.

Os dados de k_{b1} baixas concentrações ($< 2 \times 10^{-6} \text{ M}$) e k_{b2} altas concentrações ($> 2 \times 10^{-6} \text{ M}$) e n foram obtidos por meio do gráfico da figura 44 e 45, respectivamente, e estão listados na tabela 13.

Figura 44: Gráfico do $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{supressor}]$ obtido para as menores concentrações, para $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310 K).

Figura 45: Gráfico do $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{supressor}]$ obtido para as maiores concentrações, para $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310 K).

Tabela 13: Constantes de ligação (k_{b1} e k_{b2}) e números de sítios de ligação do supressor (n)

T(K)	$k_{b1}(M^{-1})$	$k_{b2}(M^{-1})$	$n (kb_1)$	$n (kb_2)$
295	$1,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	1,1	1,2
300	$1,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	1,0	1,2
305	$2,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	1,1	1,0
310	$2,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	1,0	1,0

Os valores de K_b são semelhantes a espécies previamente descritas na literatura ($K_b \cong 10^5 M^{-1}$) atribuídas como uma ligação de moderada à forte, que ocorre entre fármacos e albumina [107].

O número de sítios de ligação (n) para as quatro temperaturas de incubação é aproximadamente um (1).

A dependência da constante de ligação (K_b) e a temperatura permitiram definir os parâmetros termodinâmicos de variação de energia livre (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°) e variação de entropia (ΔS°), na formação do complexo H_2bdtc/HSA . Para tanto, utilizou-se a equação de Van't Hoff (Equação 9) [91].

$$\ln K_b = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Equação 9

Em que:

K_b = constante ligação;

T = temperatura em Kelvin;

R = constante dos gases ($8,31447 Jmol^{-1}K^{-1}$);

ΔH° = variação de entalpia;

ΔS° = variação de entropia do sistema.

A variação de energia livre foi calculada de acordo com a equação 10, a seguir:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_b$$

Equação 10

Em que:

T = temperatura em Kelvin;

R = constante dos gases;

K_b = constante ligação.

Os resultados relacionados aos cálculos termodinâmicos podem ser observados por meio das figuras 46 (K_{b1}) e 47 (K_{b2}), respectivamente, os valores de ΔH° , ΔS° e ΔG° estão listados na tabela 14.

Figura 46: Gráfico de Van't Hoff referente à interação da HSA com H_2 bdtc.

Figura 47: Gráfico de Van't Hoff referente à interação da HSA com H₂bdtc.

Tabela 14: Parâmetros termodinâmicos: variação de entalpia (ΔH°); variação de entropia do sistema (ΔS°) e variação de energia livre (ΔG°).

T(K)	ΔH° (Jmol ⁻¹)	ΔS° (Jmol ⁻¹)	ΔG° (KJmol ⁻¹)
	-209,19 / -814, 81	- 32,50 / -50,38	
295			-29,0 / -29,9
300			-30,3 / -30,3
305			-31,5 / -31,5
310			-32,1 / -32,1

Esses parâmetros são as principais evidências para determinar o modo de ligação. ΔG° descreve a espontaneidade do processo, enquanto ΔH° e ΔS° caracterizam a força ou tipo de ligação que estão sendo formados [108]. Se ΔH° e

$\Delta S^\circ > 0$ indicam interação hidrofóbica entre o fármaco e a proteína; ΔH° e $\Delta S^\circ < 0$ sugerem forças de van der Waals e/ou ligação de hidrogênio se $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ estão associados às forças eletrostáticas [109, 110]. Analisando esses resultados, é possível observar que todos os valores são menores que zero, mostrando que o processo de ligação entre a HSA e composto H₂bdtc é espontâneo ($\Delta G^\circ < 0$) em todas as temperaturas, tanto para as menores quanto para as maiores concentrações.

A existência de interação química entre o composto H₂bdtc e a HSA deve influenciar marcadamente o tempo de vida de fluorescência. Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo de tempo de vida de fluorescência, no intuito de obter subsídio imprescindível para afirmação do processo envolvido.

4.6.3. Medidas de tempo de vida

Um dos aspectos importantes, nos experimentos relacionados à adição do composto H₂bdtc à albumina, que poderia agir como carreador da droga relaciona a alteração das propriedades de fluorescência da proteína. Embora possam-se observar processos de transferência de energia entre a albumina e H₂bdtc, constatados pela diminuição da intensidade de fluorescência em função da concentração da droga, estes poderiam acontecer por processo inter ou intramolecular [111], conforme descrito no esquema 48, a seguir:

Figura 48: Possíveis processos de transferência de energia entre albumina e H₂bdtc.

No primeiro processo da figura 48 ocorre transferência de energia intramolecular e no segundo, intermolecular. Ambos deveriam influenciar no decaimento da intensidade de fluorescência, da mesma forma. No entanto, os tempos de vida de fluorescência entre os processos seriam diferentes, uma vez que no primeiro caso, em função da concentração do composto H₂bdtc, o tempo de vida variaria. Para o processo intermolecular, não deveria ser constatado esta variação, pois a espécie no estado fundamental seria a mesma. Os dados desta medida estão demonstrados na figura 49 e tabela 15.

Figura 49: Perfil de decaimento monoexponencial da fluorescência da HSA, na presença do composto H_2bdtc , na proporção (1:1-8) respectivamente, $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 340$ nm, temperatura ambiente.

Tabela 15: Mostra que o processo é biexponencial e o tempo de vida diminui em função do aumento da concentração de H_2bdtc , conforme a figura 49.

[Albumina]	[H_2bdtc]	Tempo de vida
$1,0 \times 10^{-6}$	0,00	4,87
$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$	4,31
$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	2,50
$1,0 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	2,50
$1,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	2,50
$1,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	3,34
$1,0 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$	1,78

Baseando-se nesses dados, pode-se inferir a formação de interação química entre a albumina e o composto H_2bdtc . Os tratamentos matemáticos baseados no modelo de Stern-Volmer indicaram que há o envolvimento dos dois processos

(estático e dinâmico). No experimento de medida de tempo de vida (Figura 49), na concentração equimolar de H₂bdtc, em comparação com a albumina livre, em geral, houve uma diminuição do tempo de vida (Tabela 15). O aumento sucessivo nas concentrações de H₂bdtc possibilita observar variação no tempo de vida, porém não consistente somente com a diminuição (Tabela 15). Esse comportamento anômalo deve corroborar com a afirmativa de mistura de processo relacionada à supressão. Ou seja, também, por análise de tempo de vida, o processo supressional da fluorescência da albumina deve ser dinâmico e estático. Apesar da observação da interação da proteína com o composto H₂bdtc, não foi possível coletar informações sobre a alteração do aspecto estrutural da albumina. Desta forma, a análise por dicroísmo circular (DC) foi realizada, uma vez que, esta técnica de DC permite obter informações sobre o efeito da interação do composto H₂bdtc na estrutura da biomolécula (HSA).

4.6.4. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível para monitorar a mudança estrutural secundária da proteína sobre a interação com composto. A técnica baseia-se em detectar a absorção diferencial da luz circularmente polarizada, à esquerda ou à direita, à medida que esta incide sob grupamentos cromóforos. A radiação absorvida em determinado comprimento de onda resulta em transições eletrônicas específicas, que são responsáveis pelas características observadas nos espectros de dicroísmo [112]. Alteração estrutural provocada por interação “droga”-proteína pode concorrer com alteração no DC. Como a albumina possui centros opticamente ativos, que apresentam assimetrias tanto do tipo configuracional como conformacional [113], pode sofrer variação estrutural em função de interação com um composto, ocasionando alterações no DC. A interação com a albumina (Figura 38) pode ocorrer em diversos centros e, geralmente, a técnica DC permite inferir tratar-se de região α -hélice ou β -folha.

Dessa forma, para verificar uma possível influência da ligação do composto H₂bdtc na estrutura secundária de HSA, foram realizadas medidas em DC na ausência (Figura 50) e na presença do composto (Figura 51), em diferentes concentrações de H₂bdtc. O espectro de DC da HSA livre apresenta duas bandas negativas em 208 e 222 nm, que é atribuído às transições $n \rightarrow \pi^*$ característica de estrutura helicoidal [114] (Figura 50).

Figura 50: Espectro de DC da HSA livre, concentração= $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4 e temperatura de 25 °C.

Na figura 51, pode ser observado que, em presença do composto H₂bdtc, o sinal do DC para a HSA sofreu alterações que, em comparação à literatura, é condizente com interação do H₂bdtc na região α -hélice da albumina.

Figura 51: Espectro de DC da HSA na presença do composto H₂bdtc, razão molar de Composto H₂bdtc/ proteínas de 10:1, a pH 7,4 e temperatura de 25 ° C.

Foi observado que, em presença do composto H₂bdtc, o sinal do DC da HSA aumentou. Conforme dados da literatura [115], o aumento do sinal do DC indica diminuição do conteúdo da estrutura secundária helicoidal. No entanto, os espectros de DC da HSA na presença ou ausência do composto H₂bdtc possui um perfil semelhante, o que indica que a estrutura do conjugado HSA é também predominantemente α -helicoidal. A análise quantitativa da influência do composto H₂bdtc na estrutura secundária helicoidal da HSA foi obtida e o resultado foi expresso em termo de elipticidade residual média (MRE), que é definida como (Equação 11):

$$(\theta) = \frac{CD(mdeg)}{10 \times n \times l \times C_p}$$

Em que: CD é o valor obtido em miligraus, n é o numero de resíduos de aminoácidos que, no caso da HSA é 585, l é o caminho óptico da cubeta e Cp é a concentração da proteína [116].

O resultado mostrou uma redução na estrutura da α -hélice de 58,29% (HSA livre) para 53,62% em uma razão molar do composto H₂bdtc:HSA de 10:1, pH 7,4 e temperatura de 25 °C. A α -hélice diminui gradualmente na presença do composto, o qual revela que a interação entre o composto H₂bdtc e a HSA leva a uma mudança da estrutura secundária da proteína.

Todas as informações obtidas por meio dos estudos de interação do composto H₂bdtc com a HSA fazem concluir-se que o composto pode ser transportado pela albumina de forma eficiente. No entanto, estudos farmacocinéticos, provalvemente, acrescentarão informações quanto à forma que o composto é distribuído no organismo.

Antes, porém, de iniciarmos os estudos farmacocinético, foi avaliada a capacidade do composto H₂bdtc em interagir com o DNA, uma vez que este poderia ser um potencial alvo de ação para o composto em estudo.

4.7. Interação do composto H₂bdtc ao CT-DNA

A maioria dos compostos da classe dos ditiocarbazatos tem chamado a atenção por sua atividade antitumoral e por essa relação com a sua capacidade de interagir com DNA [29, 30]. Essa proposição citotóxica contra células cancerígenas tem sido usada como explicação para os resultados observados desses mesmos compostos contra o *T. cruzi* [117]. Apesar dessa alusão verificada em alguns trabalhos [118, 119], evidência científica de tal interação tem sido pouco explorada para espécies que apresentam atividade tripanocida. Portanto, o mecanismo de ação do composto H₂bdtc como agente tripanocida pode também ocorrer por meio

da interação com o DNA. Essa possibilidade foi verificada em nossos trabalhos, avaliando-se a interação do composto H₂bdtc com o CT- DNA (Calf thymus DNA).

Assim, foram feitas titulações espectrofotométricas da espécie H₂bdtc com o CT-DNA, conforme previamente descrito [120], à temperatura de 25 °C. Alterações espectroscópicas, tais como hipercromismo e/ou hipsocromismo indicaria o rompimento da estrutura secundária do DNA. Processos relacionados à ligação química, tais como ligação do composto ao DNA, ocasionada por interação eletrostática ou via intercalação, seria evidenciado por mudança hipocrômica ou batocrômica. Esses efeitos sugerem estabilização da dupla hélice do DNA [121, 122]. Adições sucessivas de CT-DNA ao composto H₂bdtc foram conduzidas em meio tamponado Tris-HCl (pH 7,4). Esse estudo teve por objetivo verificar se o composto H₂bdtc seria capaz de interagir com o DNA de uma maneira que pudesse ser medida por meio da titulação espectrofotométrica, monitorando-se a banda no comprimento de onda em 415 nm (Figura 52).

Figura 52: Titulação espectrofotométrica do composto H₂bdtc (500 µM) em tampão Tris-HCl, após adições sucessivas de CT-DNA $2,2 \times 10^{-4}$ mol. L⁻¹ (10 em 10 µL).

O mesmo experimento descrito foi realizado usando somente o fator diluente Tris-HCl, figura 6 (anexo). O resultado mostrou que não houve nenhuma alteração espectroscópica. Isso nos permitiu concluir que não há, pela análise espectroscópica, interação entre H₂bdtc e CT-DNA. A atividade tripanocida do H₂bdtc não ocorre por interação com DNA, no entanto outros alvos serão futuramente explorados.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho o composto 5-hidroxi-3-metil-5-fenil-pirazolina-1-(S-benzilditiocarbazato), H₂bdtc, foi sintetizado com sucesso. A pureza do composto foi confirmada por meio dos resultados de análise elementar (C, H, N) e RMN de ¹H.

O composto H₂bdtc apresentou atividade tripanocida *in vitro* para as formas tripomastigota e amastigota da cepa Y de *T. cruzi*, sendo ativo também para outras cepas (CL Brener e Colombiana) e não produziu toxicidade.

Os resultados obtidos *in vitro* com composto H₂bdtc foram promissores, de forma que nos incentivou os estudos *in vivo*, em modelo experimental murino da doença de Chagas. Visando uma melhor biodisponibilidade, por meio da administração oral, o composto foi encapsulado em NLSs. O tamanho apresentado pelas NLSs contendo o composto H₂bdtc foi de 119,8 nm, tamanho adequado para absorção pelo sistema linfático, presente no trato gastrointestinal.

O composto H₂bdtc-NLS mostrou-se eficiente em reduzir a parasitemia dos camundongos tratados com uma concentração 100 vezes menor que a concentração normalmente utilizada no tratamento com o benzonidazol, droga padrão. Além disso, o tratamento por 10 dias com esse composto foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos camundongos infectados, mostrando ainda melhora na inflamação cardíaca e hepática.

O composto H₂bdtc foi também avaliado quanto à interação com as biomoléculas HSA e DNA, na tentativa de avaliar o possível mecanismo de ação do mesmo. A partir dos estudos de supressão de fluorescência da HSA, foi possível determinar que o mecanismo de interação do composto com esta proteína ocorre através da contribuição tanto do processo dinâmico quanto do processo estático. Além disso, observou-se que a interação HSA:H₂bdtc é uma interação moderada, com constantes k_b da ordem de 10⁵. Os parâmetros termodinâmicos obtidos foram importantes para ajudar a elucidar o mecanismo de interação do composto com a HSA. Com base nos resultados de ΔG° (negativos) foi possível inferir que a interação é espontânea e pode-se dizer ainda que as forças de interação do composto com a HSA são do tipo forças de van der Waals e/ou ligação de hidrogênio.

devido aos valores negativos de ΔH° e ΔS° . O composto H_2bdtc não apresentou nenhuma interação com o DNA, provavelmente o mecanismo de ação deste composto seja por outra via.

Por fim, os resultados abrem perspectivas para inúmeras abordagens para entender como o composto H_2bdtc age como agente tripanocida. Quanto mais abordagens progredirem na investigação de candidatos a novas drogas, melhores serão as chances do surgimento de um novo tratamento para esta infecção frequentemente fatal estarem disponíveis em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [1] ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. *Trends Parasitology*, v. 22, p. 363-366, 2006.
- [2] GELB, MH.; HOL, W. G. Drugs to combat tropical protozoan parasites. *Science Parasitology*, v. 297, p. 343-344, 2002.
- [3] CLAYTON, J. Chagas Disease 101. *Nature*, v. 465, p. s4 – s5, 2010.
- [4] RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388–1402, 2010.
- [5] SCHUMUNIS, G. A. The globalization of Chagas disease. *ISBT Science Series*, v. 2, p. 6–11, 2007.
- [6] BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 236-242, 2012.
- [7] FRANCO-PAREDES, C.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.3, p.470, 2009.
- [8] PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: Coming to a place near you. *Dermatologic Clinics*, v. 29, p. 53-62, 2011.
- [9] DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.; VILLANI, F. N. A.; et. al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune response in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, 208-218, 2009.
- [10] HIDRON, A.; VOGENTHALER, N.; SANTOS-PRECIADO, J. I.; et.al. Cardiac Involvement with parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, p.324-349, 2010.
- [11] RENLSO, A. R.; MCKERROW J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nature Chemical Biology*, v. 2, p. 701-710, 2006.

- [12] CHIRAC, P.; TORRELE E. Global framework on essential health R&D. *Lancet*, v. 13, p. 1560-1561, 2006.
- [13] MAYA, D. J.; CASSELS, B. K.; VÁSQUEZ-ITURRIAGA, P.; et. al. Mode and action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.146, p. 601-620, 2007.
- [14] DESSOY, A. M.; DIAS, L. C.; SILVA, J. J. N.; et.al. Quimioterapia da doença de chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, p. 2444-2457, 2009.
- [15] COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA R. Z.; et. al. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal Immunology*, v. 177, p. 3193–3200, 2006.
- [16] DIAS, J. C. Chagas' disease and its control in Latin America: an analysis of possibilities]. *Caderno de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 9, p. 201-209, 1993.
- [17] RODRIGUES, C. J.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review On Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.
- [18] MAIA, P. I. S.; FERNANDES, A. G. A.; SILVA, J. J. N.; et. al. Dithiocarbamate complexes with the $[M(PPh_3)]_2^+$ ($M=Pd$ or Pt) moiety Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Jornal Inorganic Biochemistry*, v.104, p. 1276–1282, 2010.
- [19] VEITES, M.; SMIRCICH, P.; PARAION-COSTA, B.; et. al. Potente *in vitro* anti trypanossoma cruzi activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having and inhibitory effect on parasite-specific fumaryl reductase. *Journal Biological Inorganic Chemistry*, v.13, p. 723-735, 2008.
- [20] RAGNARSSON, U. Synthetic methodology for alkyl substituted Hydrazines. *Chemical Society Reviews*, v. 30, p. 205, 2001.
- [21] CHATURVEDI, A. K.; CHATURVEDI, D.; MISHRA N.; MISHRA, V. An Efficient One-Pot Synthesis of Carbazates and Dithiocarbazates through the Corresponding Alcohols Using Mitsunobu's Reagent. *Journal of the Iranian Chemical Society*, V. 8, p. 396-400, 2011.

- [22] PEDRAS, M. S. C.; JHA, M. Toward the control of *Leptosphaeria maculans*: Design, syntheses, biological activity, and metabolism of potential detoxification inhibitors of the crucifer phytoalexin brassinin. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 4958, 2006.
- [23] MANAN, M. A. F. A.; TAHIR, M. I. M.; CROUSE, K. A.; et. al. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of SchiffBase Derived from S-Methyldithiocarbazate and Methylisatin. *The Journal of Chemical Crystallography*, v. 42, p. 173–179, 2012.
- [24] TSAI, M. D.; WEINTRAUB, H. J.; BYRN, S. R.; et. al. Conformation-reactivity relationship for pyridoxal Schiff's bases. Rates of racemization and alpha-hydrogen exchange of the pyridoxal Schiff's bases of amino acids. *Biochemistry*, v. 8, p. 3183-3188, 1978.
- [25] PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S.R. A.; et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *European Journal Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 1898–1905, 2010.
- [26] MAURYA MR, KUMAR A, BHAT AR, AZAM A, BADER C, et al. Dioxo- and Oxovanadium(V) Complexes of Thiohydrazone ONS Donor Ligands: synthesis, Characterization, Reactivity, and Antiamoebic Activity. *Journal Inorganic Chemistry*, v. 45, p. 1260–1269, 2006.
- [27] FAIVRE, S.; DELBALDO, C.; VERA, K.; et. al. Safety Pharmacokinetic, and Antitumor Activity of SU11248, a Novel Oral Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, 125-135, 2006.
- [28] MOTZER, ROBERT. J.; MICHAELSON, M. D.; REDMAN, B. G.; et. al. Activity of SU11248, a Multitargeted Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Platelet-Derived Growth Factor Receptor, in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *American Society of Clinical Oncology*, v. 24, p. 16-24, 2006.
- [29] BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, v. 27, p. 461-471, 2004.
- [30] SAETOLLI, A. C.; AGRAWAL, K. C.; TSIFITSOCLOU, A. S.; et. al. Characterization of the biochemical mechanism of action of α -(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 15, p. 117-139, 1977.

- [31] KRAUS, J. M.; ATIPAKA, H. B.; MCGUFFIN, S. A.; et. al. Second generation analogues of the cancer drug clinical candidate tipifarnib for anti-chagas disease drug discovery. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 3887-3898, 2010.
- [32] BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; et. al. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, p. 303–312, 2011.
- [33] KANG, K. W.; CHUN, M. K.; KIM, O.; et. al. Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, p. 210-213, 2010.
- [34] MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 161-77, 2000.
- [35] MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.
- [36] MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 34, p. 1394-1405, 2008.
- [37] ZHANG, J.; SMITH, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, p. 896-903, 2011.
- [38] WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1257-1272, 2004.
- [39] SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; et. al. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. *Química Nova*, v. 34, p. 1762-1769, 2011.
- [40] TAVEIRA, S. F.; ARAÚJO, L. M. P. C.; SANTANA, D. C. A. S.; et. al. Development of cationic solid lipid nanoparticles with factorial design-based studies for topical administration of Doxorubicin. *Developments in Biomedical Nanotechnology. Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 219-228, 2012.

-
- [41] GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent, p. 250-236, 1993.
- [42] SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; et. al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 189-196, 1997.
- [43] TAVEIRA, S. F. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele, 141 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- [44] BRENER Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 63, p. 215–220, 1969.
- [45] SARAIVA, J.; VEJA, C.; ROLON, M.; et. al, *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 100, p. 791–795, 2007.
- [46] MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CAMPO, V. L.; BIONDO, M.; et. al. α -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 1978-1987, 2013.
- [47] SCHWAERZ, C., MEHNERT, W. Freeze-drying of drug free and drug- loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*. v. 157, p. 171-179, 1997.
- [48] LOPES, R. F.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 200, p. 127-132, 2000.
- [49] GUEDES PMM, OLIVEIRA FS, GUTIERREZ FRS, SILVA GK et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN4)NO] + as a possible therapeutic approach for Chagas' disease, *British Journal of Pharmacology*, v. 160, p. 270–282, 2010.
- [50] TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; VELOSO, V. M.; et. al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 1045-1053, 2004.

- [51] BRENER, Z. Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi* and subjected to treatment. *Revista Instituto Medicina Tropical*, v. 4, p. 119–123, 1962.
- [52] MAEKAWA, M.; SUGIURA, A.; IWAHARA, K.; et. al. Effect of the Inhibition of mitochondrial Creatine Kinase Activity on the Clinical Diagnosis of Suspected Acute Myocardial Infarction. *The open clinical chemistry journal*, v. 5, p. 1-6, 2012.
- [53] CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemistry Parasitological*, v. 129, p. 53–59, 2013.
- [54] PIRON, M; FISA, R; CASAMITJANA, N; et. al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, v. 103, p. 195–200, 2007.
- [55] SCHIJMAN, A. G; BISIO, M; ORELLANA, L; et. al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PloS Neglected tropical disease*, v. 5, e931, 2011.
- [56] CENCIG, S; COLTEL, N; TRUYENS, C; CARLIER, Y. Parasitic Loads in Tissues of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* and Treated with Ambisome. *PLOS Neglected tropical disease*, v. 6, e1216, 2011.
- [57] SHANKARA, S.; KALANUR, J.; SEETHARAMAPPA, J. et. al. Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 660–666, 2010.
- [58] GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E. et. al. New ruthenium(II) arene complexes of anthracenylappended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity. *Dalton Transactions*, 21;p.1203 2014.
- [59] PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. et. al. *Introduction to Spectroscopy*, 5th Edition. Editora: Cenage, 2009.
- [60] PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. *Introduction to Spectroscopy. A Guide for students of Organic Chemistry*. 2th Edition. Publishing, 1996.

- [61] DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Química nova*, v. 32, p. 2444-2457, 2009
- [62] CANCEADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazol. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, p. 29-37, 2002.
- [63] FILARDI, L. S, BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 755-759, 1987.
- [64] GUEDES, P.M.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W.L.; et. al.. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Tropical*, v. 84, p.9-17, 2002.
- [65] TIWARI, R.; PATHAK, K. Nanostructure lipid Carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *International Journal Pharmaceutics*, v. 415, 232-243, 2011.
- [66] LI, H. X.; MA, Y.; ZHAI G, L. I. L.; LOU, H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 133, p. 238-244, 2009.
- [67] BDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- [68] KAMIYA, S.; KURITA, T.; MIYAGISHIMA, A, et. al. Physical properties of griseofulvin-lipid nanoparticles in suspension and their novel interaction mechanism with saccharide during freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74, 461-466, 2010.
- [69] HOWARD, D. M.; LU, X.; JAY, M.; DZIUBLA, T. D. Optimization of the lyophilization process for long term stability of solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 201, p.1-10, 2012.
- [70] LEY, V.; ANDREWS, N. M.; ROBBINS, E. S.; et. al. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 168, p. 649-659, 1988.

[71] ANVISA - Agência Nacional de vigilância Sanitária. Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, acessado em www.portal.anvisa.gov.br em 17/09/2014.

[72] JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H.; The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reproductive Toxicology*, v. 11, p. 171-178, 1997.

[73] SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas disease. *Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo*, v. 35, p. 395-398, 1993.

[74] COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.

[75] ANDRADE, S. G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A. S.; et. al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, 87–200, 1991.

[76] TARLETON, R. L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *The International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 550-554, 2001.

[77] KUMAR, A.; PANT, S.; NARANG, S. Significance of alanine aminotransferase testing in diagnosis of acute and chronic HBV infection. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. v. 10, p. 1171-1172, 2009.

[78] PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*, v. 27, p. 1266-1271, 2000.

[79] COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal, *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p. 549-554, 2009.

[80] BURRA, M.; JUKANTI, R.; JANGA, K.Y.; et. al. Enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride via lyophilized solid lipid nanoparticles. *Advanced Powder Technology*, v. 24, p. 393-402, 2013.

- [81] SINGH, A.; AHMAD, I.; AKHTER, S.; et. al. Nanocarriers based formulation of Thymoquinone improves oral delivery: stability assessment, *in vitro* and *in vivo* studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 822-832, 2013.
- [82] CHALIKWAR, S. S.; BELGAMWAR, V. S.; TALELE, V.R.; et. al. Formulation and evaluation of Nimmodipine-loaded solid lipid nanoparticles delivered via lymphatic transport system, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 97, p. 109-116, 2012.
- [83] VENISHETTY, V. K.; CHEDE, R.; KOMURAVELLI, R.; et. al. Design and evaluation of polymer coated carvedilol loaded solid lipid nanoparticles to improve the oral bioavailability: a novel strategy to avoid intraduodenal administration. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 95, 1-9, 2012.
- [84] ZHANG, Z.; BU, H.; GAO, Z.; et. al. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. *The International Journal of Pharmaceutics*, v. 394, p. 147-153, 2010.
- [85] LI, H.; ZHAO, X.; MA, Y.; et. al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 133, p.238-244, 2009.
- [86] VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants, *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 1157-1163, 2012.
- [87] BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.431, 2000.
- [88] WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; et. al. Use of a polymerase simplified chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, p. 771-7, 1994.
- [89] WINCKER, P.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M. F.; et al. PCR-based diagnosis for Chagas disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology*, v. 114, p. 367-73, 1996.
- [90] SHANKARA, S.; KALANUR, J.; SEETHARAMAPPA, J.; et. al. Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum

albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 660–666, 2010.

[91] CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 9493–9508, 2012.

[92] TIAN, M. Y.; ZHANG, X. F.; XIE, L. et. al. The effect of Cu^{2+} on the interaction between an antitumor drug-mitoxantrone and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, v. 892, p. 20–24, 2008.

[93] FARIDBOD, F.; GANJALI, M. R.; LARIJANI, B.; et. al. Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 78, p. 96–101, 2011.

[94] JING, J.; QU, X.; TU, Z.; et. al. Spectroscopic investigations of the interaction of the anti hypertension drug valsartan with human serum albumin. *Molecular Medicine Reports*, V. 9, p. 2191-2196, 2014.

[95] SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA J.; KANDAGAL, P. B.; et. al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. *Dyes and Pigments*, v. 74, p. 665-671, 2007.

[96] YAMASAKI, K.; MARUYAMA, T.; KRAGH-HANSEN, U.; et. al. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1295, p. 147–157, 1996.

[97] SJOHOLM, I.; EKMAN, B.; KOBER, A.; et. al. Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles, *Molecular Pharmacology*, v. 16, 767–777, 1979.

[98] CHIAPPORI, F.; D'URSI, P.; MERELLI, I.; MILANESI, L.; ROVIDA, E. In silico saturation mutagenesis and docking screening for the analysis of protein–ligand interaction: the endothelial protein C receptor case study. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. S3, 2009.

[99] SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIKUZI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, v. 12, p. 439-446, 1999.

- [100] PAINTER, L.; HARDING, M. M.; BEEBY, P. J. Synthesis and interaction with Human Serum Albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of Bilirubin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, v. 18, p. 3041-3044, 1998.
- [101] WANG, Y. X.; LI, L.; SHENG, L. J.; et. al. Spectroscopic study on the inherent binding information of cationic perfluorinated surfactant with bovine serum albumin. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 132, p. 489–494, 2011.
- [102] CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 493–9508, 2012.
- [103] J.R. LAKOWICZ. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer Science, 2006.
- [104] SAMARI, F.; HEMMATEENEJAD, B.; SHAMSIPUR, M. et. al. Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt(II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins: A Spectroscopic Approach. *Inorganic Chemistry*, v. 51, p. 3454, 2011.
- [105] NAVARRO, R. M.; CANDELAS, I. C.; GONZÁLEZ, S. B.; et. al. Albumin Antioxidant Response to Stress in Diabetic Nephropathy Progression. *PLOS ONE*, v. 9, p. e106490, 2014.
- [106] SCATCHARD, G.; SCHEINBERG, I. H.; ARMSTRONG JR, H. S. Physical Chemistry of Protein Solutions. IV. The Combination of Human Serum Albumin with Chloride Ion. *Journal America Chemistry Society*, v. 72, p 535–540, 1950.
- [107] KOUMOUI, E. S.; ZAMPAKOU, M. RAPTOPOULOU, C. P.; et al. First Palladium(II) and Platinum(II) Complexes from Employment of 2,6-Diacetylpyridine Dioxime: Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization, and Biological Evaluation. *Inorganic Chemistry*, v. 51, p. 7699–7710, 2012.
- [108] HU, Y.; XU, S.; ZHU, X.; GONG, A. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.74, p.526-531, 2009.
- [109] ROSS, P.D; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. v.20, p.3096-3102, 1981.

- [110] JAYABHARATHI, J.; THANIKACHALAN, V.; PERUMAL, M. Mechanistic investigation on binding interaction of bioactive imidazole with protein bovine serum albumin – A biophysical study. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 79, p. 502 – 507, 2011.
- [111] LACKOWITZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. ed. [S.l.]: Plenum Press, 2006.
- [112] SILVA, M. A. O. Avaliação de sistemas baseados em ponto de nuvem visando a remoção de albumina do plasma sanguíneo. Dissertação de Mestrado – Unicamp, 2008.
- [113] SREERAMA, N.; WOODY, R. W.; A self-consistent method for analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry*, v. 209, p. 32-44, 1993.
- [114] CHATTERJEE, T.; PAL, A.; DEY, S.; et. al. Interaction of Virstatin with Human Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Modeling. *PLoS ONE*, v. 7, p. e37468, 2012.
- [115] CHAO- LIN, Z.; HU, M.; WU, A. Z.; et. al. Investigation on the differences of four flavonoid with similar structure binding to human serum albumin *Journal of Pharmaceutical Analysis*, in press, 2014.
- [116] LI, D. D.; HUANG, F. P.; CHEN G. J.; et. al. Four new copper(II) complexes with 1,3-tpbd ligand: Synthesis, crystal structures, magnetism, oxidative and hydrolytic cleavage of DNA. *Journal Inorganic Biochemistry*, v. 104, p. 431-441, 2010.
- [117] CREMIEUX, A.; CHEVALIER, J.; SHARPLES, D. et. al. Antimicrobial activity of 9-oxo and thio acridines correlation with intercalation into DNA and effects on macromolecular biosynthesis. *Journal Research in Microbiology*, v. 146, p. 73-83, 1995.
- [118] JOBE, M.; ANWUZIA-IWEGBU, C.; BANFUL, A.; et. al. Differential *in vitro* activity of the DNA topoisomerase inhibitor idarubicin against *Trypanosoma rangeli* and *trypanosoma cruzi*. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 946-950 , 2012.
- [119] STEVERDING, D.; WANG, X. Trypanocidal activity of the proteasome inhibitor and anti-cancer drug bortezomib. *Parasites Vectors*, v. 2, p. 1-4, 2009.

[120] LATHA, P.; KODISUNDARAM, P.; SUNDARAJAN, M. L.; et. al. Synthesis, characterization, crystal structure and theoretical study of a compound with benzodiazole ring: Antimicrobial activity and DNA binding. *Spectrochimica Acta*, v. 129, p. 429-437, 2014.

[121] PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, p. 497-503, 2007.

[122] LI, X.; BI, C. B.; FANY. H.; et. al. Synthesis, Crystal Structure and DNA Interaction of a Novel Three-Nuclear Cobalt(II) Complex with Schiff Base Derived from 4-Chloroanthranilic Acid and 2,4-Dihydroxybenzaldehyde. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v. 24, p. 582–590, 2014.

ANEXOS

Anexo (Figura 1)

ChemNMR ¹H Estimation

Figura 1: Espectro de ¹H-RMN do composto H₂bdtc utilizando-se o *software* Chemdraw 12.

Anexo (Figura 2)

Figura 2: Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) para o composto H₂bdtc em pastilha de KBr.

Anexo (Figura 3)

Figura 3: Caminho de fragmentação do composto H₂bdtc, no modo negativo. Solvente metanol, energia de colisão 20 eV.

Anexo (Figura 4)

Figura 4: Caminho de fragmentação do composto H_2bdtc , no modo positivo. Solvente metanol, energia de colisão 20 eV.

Anexo (Figura 5)

Figura 5: Sobrevida de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com H₂bdtc-NLS (4,0 μ mol/kg/dia) e BZN na dose clínica (400,0 μ mol/kg/dia). Camundongos Swiss (7 por grupo) foram infectados com 2000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e a partir do 1º dia de parasitemia patente (5º dia de infecção), os camundongos foram tratados por gavagem, diariamente por 10 dias. O controle negativo foi tratado com PBS (controle).

Anexo (Figura 6)

Figura 6: Titulação espectrofotométrica do composto H₂bdtc 500 μM em tampão Tris-HCl, após adições sucessivas de tampão Tris-HCl (mesmo volume adicionado para CT-DNA).