UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencialidade do uso de sistemas nanoestruturados contendo
ácido ursólico para a otimização da terapia da doença de Chagas**

Juliana Palma Abriata Barcellos

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencialidade do uso de sistemas nanoestruturados contendo
ácido ursólico para a otimização da terapia da doença de Chagas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Juliana Palma Abriata
Barcellos

Orientador(a): Profa. Dr^a Juliana
Maldonado Marchetti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no dia 07/02/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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.

Barcellos, Juliana Palma Abriata

Potencialidade do uso de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico para a otimização da terapia da doença de Chagas. Ribeirão Preto, 2014.

64 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Ácido ursólico. 2. Nanopartículas poliméricas. 3. Policaprolactona. 4. Sistemas de liberação de fármaco. 5. Nanoprecipitação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Palma Abriata Barcellos

Potencialidade do uso de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico para a otimização da terapia da doença de Chagas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador(a): Dr^a Juliana Maldonado
Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha filha Maria Clara, meus pais Nilza e Pedro, meu marido Rodrigo, minha avó Cacilda e meu irmão Orlando. Sem essa estrutura familiar seria impossível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Juliana Maldonado Marchetti por ter me aceitado como orientada e ter confiado em mim, pela orientação, dedicação, amizade e contribuição científica ao longo deste trabalho.

Ao professor Dr. Divaldo Lyra Jr, que sempre me incentivou à carreira acadêmica, me proporcionando iniciação científica, contribuindo para a construção do meu currículo.

Aos meus colegas companheiros de ácido ursólico: Josimar, Érika e Mayara, pelas longas discussões que colaboraram para o amadurecimento pessoal e científico.

Ao meu amigo Josimar Eloy, pela colaboração científica. Também pela amizade, paciência, companhia nos congressos, juntamente com a sua esposa Raquel Petrilli Eloy, e também pelo auxílio nas revisões de trabalhos.

À minha amiga e companheira Patrícia Mazureki Campos, pela paciência, dedicação, amizade sincera, companheirismo e contribuição científica.

Ao farmacêutico José Orestes Del Ciampo, do laboratório de tecnologia farmacêutica, pela amizade e pelas análises de tamanho das partículas.

À Dr^a Fabíola Praça, especialista de laboratório, pela amizade, contribuição científica e pelas análises de tamanho das partículas.

Ao técnico Henrique Diniz, pela amizade e pelas contribuições referentes ao meu trabalho.

A minha querida amiga Maria Aparecida de Paiva Mestriner, pelo carinho e revisão gramatical da dissertação.

A doutoranda Thalita Bachelli Riul, do laboratório de Glicoimunologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, e ao professor Dr. Marcelo Dias Baruffi, pela realização do estudo de citotoxicidade, atividade parasitária e estudo *in vivo* da atividade biológica do ácido ursólico.

Ao Dr. Rodrigo Silva, do Departamento de química da Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao técnico Clóvis, do Departamento de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelas análises de espectroscopia de infravermelho.

Aos amigos e colegas do laboratório de tecnologia farmacêutica, pela paciência, apoio e empenho de cada um para que todos realizássemos um trabalho excelente.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, especialmente à Professora Dr^a Mônica Tallarico Puppo e Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez, à chefe da seção Rosana Florêncio, aos secretários Eleni Angeli Passos e Rafael, pela compreensão e paciência.

Agradecimentos especiais

À minha pequena Maria Clara, que veio a este mundo para me dar força para encarar todas as dificuldades da vida e fazer com este sonho virasse realidade. Obrigada por ter vindo a este mundo. Sem você não estaria aqui.

Ao meu marido, Rodrigo de Azevedo Barcellos, pela paciência, companhia, amor, dedicação e por estar sempre ao meu lado, me ajudando. Agradeço as noites que foi dormir sozinho ou ficou com a Maria Clara para que eu pudesse terminar a leitura dos meus artigos e finalizar a minha dissertação. Obrigada pelo paizão que você é e por cuidar tão bem da nossa pequena.

A minha família, por me dar estrutura para a realização deste sonho. Meus pais Pedro e Nilza, por estarem sempre ao meu lado, sempre me incentivando a realizar este sonho. Obrigada pela dedicação, carinho, amor, paciência. Pelo suporte financeiro, emocional e psicológico; por sempre me ajudarem com a Maria Clara quando precisava ir para a Faculdade aos finais de semana para a realização das intermináveis análises.

À minha querida avó Cacilda, pelo amor, incentivo, dedicação, carinho, por estar sempre torcendo por mim. Obrigada pelas tardes de domingo em que ficou com a Maria Clara, brincando de bonecas enquanto eu estudava.

Ao meu irmão querido, pelo carinho, amizade, companhia, principalmente pelo incentivo.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim.

“Cada pessoa deve trabalhar para seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”. (Marie Curie)

RESUMO

BARCELLOS, J. P. A. **Potencialidade do uso de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico para a otimização da terapia da doença de Chagas.** 2014. 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e acomete milhões de pessoas, principalmente as de baixa renda em países subdesenvolvidos. É considerada uma doença negligenciada, não existindo uma terapia eficaz contra os parasitas na fase crônica da doença. Estudos preliminares demonstraram que o ácido ursólico apresenta atividade tripanocida, entretanto, este fármaco possui baixa solubilidade em água, o que prejudica a sua biodisponibilidade. Com o intuito de viabilizar a terapia com ácido ursólico, as nanopartículas poliméricas são sistemas de liberação promissores, devido a sua capacidade de liberação modificada. Além disso, os sistemas nanoencapsulados destacam-se pela alta eficiência de encapsulação do fármaco, proteção contra degradação, e menor possibilidade de causar toxicidade. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas de policaprolactona para a veiculação de ácido ursólico, visando à otimização da terapia da Doença de Chagas. O estudo teve início com o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico. A formulação obtida neste estudo pela técnica da nanoprecipitação apresentou menor valor de tamanho de partícula ($173,17 \pm 4,20$) e índice de polidispersividade ($0,09 \pm 24,77$), com perfil monomodal, potencial zeta de -36 mV e eficiência de encapsulação de $94,1 \pm 1,31\%$. O tamanho das partículas observado na microscopia eletrônica de varredura demonstrou ser compatível com os valores observados nas análises de espalhamento dinâmico de luz, embora tenha apresentado uma característica agregada e ligeiramente esférica. Através da determinação do coeficiente de partição do ácido ursólico foi possível avaliar a alta lipofilicidade do ácido ursólico. Na determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico, o lauril sulfato de sódio foi o tensoativo de escolha para o estudo *in vitro* do perfil de liberação, solubilizando aproximadamente $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fármaco, mas não foi possível a realização do estudo *in vitro* do perfil de liberação, devido a sua característica altamente lipofílica. O estudo da citotoxicidade por ensaio de resazurina mostrou que a formulação escolhida não alterou a viabilidade celular de células LLCMK2, portanto sem toxicidade para o meio biológico, bem como evidenciou a capacidade das nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico de reduzir a viabilidade dos parasitas em aproximadamente 50%. A avaliação da atividade biológica do ácido ursólico em camundongo C57BL/6 infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* apresentou uma redução acentuada ($p < 0,001$) dos tripomastigotas quando comparados ao grupo I, sugerindo uma liberação sustentada do ácido ursólico nesse modelo de nanopartículas poliméricas. Como conclusão, as nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico podem ser propostas como uma abordagem quimioprolática da doença de Chagas, considerando a necessidade dessa medida de segurança para pacientes que recebem transfusão sanguínea no Sistema Único de Saúde no Brasil.

Palavras-chave: sistemas de liberação de fármacos; policaprolactona; nanopartículas poliméricas; ácido ursólico; nanoprecipitação

ABSTRACT

BARCELLOS, J. P. A. **Potential use of nanostructured systems containing ursolic acid to optimize the therapy of Chagas disease.** 2014. 64f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chagas disease is caused by parasite *Trypanosoma cruzi* and affects millions of low-income in developing countries and because of that it is neglected by the pharmaceutical industry and there is no effective therapy against parasites in the chronic phase of the disease. Preliminary studies showed that ursolic acid presents tripanocidal activity, however, it has low water solubility, which reduces its bioavailability. Among the existing drug delivery systems, polymeric nanoparticles play a central role, due to their ability to sustain or control the release of drugs. Moreover, nanocoated systems are distinguished by high drug encapsulation efficiency, protection from degradation, and less likely to cause irritation. The aim of this work is development and characterization of the polymeric nanoparticles containing ursolic acid, aiming to optimize the treatment of Chagas disease. The study began with the development of polymeric nanoparticles containing ursolic acid. The formulation obtained in this study by the nanoprecipitation technique showed the lowest particle size (173.17 ± 4.20) and polydispersity index (0.09 ± 24.77), with monomodal profile, zeta potential of -36 mV and encapsulation efficiency was $94.1\% \pm 1.31$. The size of the particles observed by scanning electron microscopy showed to be compatible with the values observed in the analysis of dynamic light scattering, although it had an aggregate and slightly spherical characteristic. By determining the coefficient of ursolic acid partition was possible to evaluate the high lipophilicity of ursolic acid. In determining the solubility coefficient of ursolic acid, sodium lauryl sulfate was the surfactant of choice for studying *in vitro* release profile, solubilizing approximately $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of the drug, but it has not been possible to conduct the study *in vitro* release profile, due to its highly lipophilic character. The study of resazurin cytotoxicity assay showed that the formulation did not alter the cell viability of LLCMK2 cells, and therefore, without toxicity to the biological environment and demonstrated the ability of the polymeric nanoparticles containing ursolic acid to reduce the viability of parasites in approximately 50 %. The evaluation of biological activity of ursolic acid in mice C57BL/6 mice infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* showed a marked reduction ($p < 0.001$) of trypomastigotes when compared to group I, suggesting a sustained release of ursolic acid in polymeric nanoparticles model. In conclusion, polymeric nanoparticles containing ursolic acid may be proposed as a chemoprophylactic approach of Chagas disease, considering the need for this safety measure for patients receiving blood transfusion Health System in Brazil.

Keywords: drug delivery systems; polycaprolactone; polymeric nanoparticles; ursolic acid; nanoprecipitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 2 - Estrutura química do ácido ursólico	5
Figura 3 – Representação de nanoesfera (A) e nanocápsula (B)	8
Figura 4 - Estrutura química do polímero policaprolactona	10
Figura 5 - Representação esquemática da técnica de nanoprecipitação	18
Figura 6 - Ensaio colorimétrico da resazurina	25
Figura 7 - Gráfico do tamanho de partícula, sendo A: NP sem liofilizar, B: NP com trealose 0,5%, C: NP com trealose 1,0%, D: NP com trealose 1,5% e E: NP com trealose 2,0%	34
Figura 8 - Gráfico do tamanho de partícula, sendo A: NP sem liofilizar, B: NP com crioprotetor sucrose 10% e C: NP com crioprotetor sucrose 20%.....	35
Figura 9 - Representação da influência da dupla camada elétrica em análises de potencial zeta	37
Figura 10 - Análise do tamanho de partícula e polidispersividade nos meios dispersantes: água (A) e cloreto de potássio (B) em análise de espalhamento de luz	38
Figura 11- Fotomicrografias das nanopartículas de PCL contendo ácido ursólico, na proporção FO:FA 1:2 e AU:PCL 1:10. Aumento de 50.000 (A), 100.000 (B) e 30.000x (C); voltagem de 20KV	41
Figura 12 - Espectro de infravermelho de ácido ursólico puro, nanopartículas contendo ácido ursólico, policaprolactona e poloxamer 407	42
Figura 13 - Representação gráfica do perfil in vitro de liberação do ácido ursólico, no meio de dissolução solução tampão 30 mM e lauril sulfato de sódio 0,5%, sendo A: AU livre e B: AU encapsulado em NP	45
Figura 14 - Viabilidade celular das células LLCMK2 com a administração de benzonidazol, NP isentas de AU (NP-B) e NP contendo AU (NP-AU), sendo gráfico A: citotoxicidade 24 horas e gráfico B: citotoxicidade 48 horas. n = 5.....	49
Figura 15: Atividade antiparasitária contra formas tripomastigotas com a administração de benzonidazol, nanopartículas isentas de AU e nanopartículas contendo AU em meio RPMI-1640, sendo gráfico A: atividade antiparasitária 24 horas e gráfico B: atividade antiparasitária 48 horas. n = 5. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados com as nanopartículas isentas de ácido ursólico. *P<0,05, **P<0,01, ***P < 0,001	51

Figura 16 - Administração retro-orbital das formulações em camundongo C57BL/6	53
Figura 17 - Avaliação da atividade antiparasitária de NP de AU, NP isenta de AU com a administração de 13,15 µg/animal/dia, e solução de BZN 2,5 µg/animal/dia em camundongos infectados com a cepa Y de <i>T cruzi</i> , comparado ao controle positivo de infecção, apresentando diferença estatisticamente significativa, no 7º dia de infecção *** (p<0,001)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modificações realizadas no processo de preparo de nanopartículas de policaprolactona contendo ácido ursólico.....	18
Tabela 2 - Exatidão e precisão do método cromatográfico adaptado, utilizado na quantificação do ácido ursólico no meio de dissolução.....	30
Tabela 3: Diâmetro médio (nm), o índice de polidispersidade (Pdl), potencial zeta e eficiência de encapsulação (%) relacionada com diferentes tensoativos no preparo de nanopartículas de PCL contendo AU.	32
Tabela 4– Avaliação da água e cloreto de potássio como meio dispersante em análise de potencial zeta e condutividade elétrica	39
Tabela 5 - Solubilidade do ácido ursólico em tampão fosfato de sódio 30 mM e tensoativos	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Microgramas/militros
µL	Microlitros
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância entre grupos)
AU	Ácido ursólico
BZN	Benzonidazol
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no uso de animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
CV%	Coeficiente de variação %
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de encapsulação
EPM	Erro padrão da média
FA	Fase aquosa
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FO	Fase orgânica
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
MD	Meio de dissolução
mg/kg	Miligramas/kilogramas
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas
PCL	Policaprolactona
Prop.	Proporção
r	Coeficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Tratamento da Doença de Chagas	3
1.2.1 Tratamentos convencionais utilizados na Doença de Chagas	3
1.2.2 Ácido Ursólico	4
1.3 Desenvolvimento de novas terapias.....	6
1.4 Nanotecnologia e Sistemas de Liberação de Fármacos	6
1.4.1 Nanopartículas Poliméricas.....	7
1.4.2 Polímeros utilizados	8
1.4.2.1 Policaprolactona.....	9
1.4.3 Técnicas de preparo das nanopartículas.....	10
1.4.3.1 Nanoprecipitação	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Matérias-primas, reagentes e solventes.....	14
3.2 Método Analítico para quantificação do Ácido Ursólico.....	14
3.2.1 Adaptação do método validado para a quantificação do Ácido Ursólico	14
3.2.1.1 Condições cromatográficas	15
3.2.1.2 Preparo das soluções padrão.....	15

3.2.1.3 Curva analítica e linearidade	15
3.2.1.4 Seletividade'	16
3.2.1.5 Exatidão e precisão	16
3.3 Preparo das nanopartículas	17
3.3.1 Nanoprecipitação	17
3.4 Seleção do crioprotetor e rendimento do processo	18
3.5 Caracterização das nanopartículas	19
3.5.1 Determinação da eficiência de encapsulação	19
3.6 Caracterização morfológica das nanopartículas.....	20
3.6.1 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas.....	20
3.6.2 Análise do potencial zeta.....	20
3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	20
3.7 Avaliação da influência do meio dispersante em análises de espalhamento dinâmico de luz	21
3.8 Avaliação química do fármaco e do polímero.....	21
3.8.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier (FTIR).....	21
3.9 Determinação do coeficiente de partilha o/a do ácido ursólico.....	22
3.10 Seleção do meio de dissolução	22
3.10.1 Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico	23
3.10.2 Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação do ácido ursólico a partir do sistema obtido.....	23
3.11 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária por ensaio de resazurina.....	24
3.11.1 Avaliação da citotoxicidade em células LLCMK2	25
3.11.2 Avaliação da atividade antiparasitária	26
3.12 Avaliação <i>in vivo</i> da atividade biológica do ácido ursólico encapsulado em nanopartículas de policaprolactona, em estudo em animais experimentalmente infectados com cepas Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27

3.13 Análise de resultados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Método Analítico para quantificação do ácido ursólico.....	29
4.1.1 Adaptação do método validado para a quantificação de ácido ursólico	29
4.1.1.1 Curva analítica e linearidade	29
4.1.1.2 Seletividade	29
4.1.1.3 Exatidão e precisão	30
4.2 Nanoprecipitação	30
4.3 Seleção do crioprotetor e a determinação do rendimento do processo	34
4.4 Avaliação da influência do meio dispersante em análise de espalhamento dinâmico de luz	35
4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
4.6 Avaliação química do fármaco e do polímero por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier (FTIR).....	42
4.7 Determinação do coeficiente de partição o/a do ácido ursólico.....	43
4.8 Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico	43
4.9 Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação do ácido ursólico a partir do sistema obtido.....	44
4.10 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária	46
4.10.1 Avaliação da citotoxicidade em células LLCMK2	47
4.10.2 Avaliação da atividade antiparasitária por ensaio de resazurina em células tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
4.11 Avaliação da atividade biológica do ácido ursólico em animais experimentalmente infectados com cepas Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou mal de Chagas, conhecida como Tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada por um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*. É reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das doenças tropicais negligenciadas e afeta principalmente populações vulneráveis, incluindo indígenas, grupos rurais, mulheres, crianças e idosos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Estima-se que há entre 7-8 milhões de infectados no mundo, principalmente na América Latina, deixando de ser uma doença exclusiva das Américas devido à imigração da população para outros países (WHO, 2013; NUNES, et al., 2013; PÉREZ-MOLINA et al., 2013). Das pessoas infectadas, 10 mil morrem, anualmente, na América Latina (MANARIN et al., 2013). Nos Estados Unidos vivem cerca de 300 mil pessoas com essa doença, em sua maioria imigrantes latino-americanos oriundos de regiões mais pobres (PUFF, 2013).

O *Trypanosoma cruzi* é transmitido pelo barbeiro, um inseto hematófago, podendo também ocorrer contaminação através de transfusão de sangue, pela via transplacentária, transplante de órgãos, acidente laboratorial, amamentação e pela via oral (PUNUKOLLU et al., 2007, WHO, 2013). A forma vetorial é ainda a mais comum, sendo transmitida através das fezes do barbeiro (ROMERO; MORILLA, 2010). No Brasil, a principal forma de contaminação é através da via oral, por meio da ingestão do barbeiro ou suas fezes contendo o parasita, moídos junto a sucos e alimentos (PUFF, 2013).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* (HOARE; WALLACE, 1966), e seu ciclo biológico, **Figura 1**, envolve diferentes formas parasitárias encontradas em dois hospedeiros: um vertebrado e outro invertebrado. No interior do vetor, encontra-se a forma epimastigota, que se multiplica por divisão binária, transformando-se em sua forma tripomastigota metacíclica, sendo eliminada juntamente com as fezes e urina, durante o repasto sanguíneo, na pele do hospedeiro vertebrado, que, ao se coçar faz com que ocorra a penetração do parasita no local da picada ou mucosas,

invadindo as células nucleadas. No interior dessas células, diferenciam-se na forma não flagelada, amastigota, que se replica por divisão binária, diferenciando-se em tripomastigotas, sendo liberadas dos tecidos parasitados para a corrente sanguínea, podendo, assim, infectar tecidos e locais distantes; invadir novas células nucleadas ou iniciar um novo ciclo (ENGMAN; LEON, 2002; BRENER, 1973; MAYA et al., 2007).

A Doença de Chagas possui curso clínico variável, **Figura 1**, apresentando-se em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda ocorre mais ou menos 2 meses após a infecção, podendo ou não apresentar sintomas, tais como: febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade respiratória, inchaço e dor abdominal. Durante essa fase, grande parte dos parasitas está na corrente circulatória. Já na fase crônica, os parasitas alojam-se principalmente na musculatura do coração e aparelho digestivo, principalmente no esôfago e cólon (WHO, 2013; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Essa fase é assintomática, podendo perdurar pelo resto da vida ou evoluir para a forma cardíaca, digestiva ou associada. Na forma cardíaca tem-se o acometimento cardíaco, que pode evoluir para uma cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, constituindo 30% dos casos crônicos, sendo responsável pela mortalidade. Na forma digestiva, responsável por 10% dos casos, tem-se o acometimento digestivo, podendo evoluir para megacólon ou megaesôfago. Por último, a forma associada é uma forma cardiodigestiva com lesões compatíveis com a forma cardíaca e digestiva (OLIVEIRA, et al., 2010; TARLETON et al., 2001; WHO, 2013; CABARIN-LIMA et al., 2013).

Figura 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Um século após a descoberta da Doença de Chagas, milhões de pacientes ainda permanecem sem tratamento adequado para essa doença silenciosa, considerada debilitante e potencialmente fatal. E, embora não existam dados oficiais globais, estima-se que somente 1% dos infectados recebem algum tipo de tratamento (RIBEIRO et al., 2009).

1.2 Tratamento da Doença de Chagas

1.2.1 Tratamentos convencionais utilizados na Doença de Chagas

Atualmente o benzonidazol (ROCHAGAN[®], ROCHE) é o único medicamento comercializado disponível, embora não haja consenso sobre o uso em larga escala desse fármaco para o tratamento da Doença de Chagas, devido à sua alta

toxicidade e baixa eficácia na fase crônica (OLIVEIRA et al., 2010; ABAD-FRANCH et al., 2010; FERREIRA et al., 2010a).

Desenvolvido pela Roche Laboratórios, em 1972, o benzonidazol age produzindo metabólitos que reagem com DNA, RNA, proteínas e possivelmente lipídeos, sendo sua atividade antiparasitária relacionada com a toxicidade inerente do fármaco, causando efeitos colaterais, tais como: dores de cabeça, perda da concentração, reações alérgicas dermatológicas e neuropatia periférica, principalmente em idosos (ABAD-FRANCH et al., 2010).

Apesar do grande número de pacientes pediátricos infectados, não existem formas farmacêuticas líquidas comercialmente disponíveis para o tratamento dessa tripanossomíase, mas o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em conjunto com iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), recentemente registrou no Brasil uma nova forma farmacêutica, um comprimido dispersível para administração oral (MANARIN et al., 2013).

Considera-se relevante o apoio a pesquisas que tratem do desenvolvimento de farmacoterapias mais eficazes para o tratamento dessa doença. Apesar dos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos sobre o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, e sobre a fisiopatologia da doença, ainda não existe um tratamento efetivo, principalmente em sua fase crônica. Como a doença acomete principalmente a população de baixa renda, em países subdesenvolvidos, mesmo após um século de descoberta dessa doença há pouco ou nenhum interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos medicamentos e, por isso, a mesma ainda representa uma grande ameaça por ser considerada negligenciada (MANARIN et al., 2013).

1.2.2 Ácido Ursólico

O ácido ursólico, cuja estrutura química está representada na **Figura 2**, pertence à classe de compostos triterpenóides e apresenta atividade analgésica, antiinflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, além de possuir propriedades antitumorais e efeitos antihiperlipêmicos (FERREIRA et al., 2010a; LIU et al, 1995a, ZHANG et al., 2013). Pesquisas realizadas por Ferreira et al. (2010a) demonstraram que o ácido ursólico também possui atividade antiparasitária contra espécies de *Trypanosoma sp.* Além disso, verificaram que a sua atividade tripanocida contra a

cepa Bolívia *T. cruzi* pode estar relacionada à presença do grupamento metila do carbono C₁₉, além da presença dos grupamentos carboxila e hidroxila.

O seu mecanismo de ação não está bem elucidado, mas estudos sugerem que o efeito tripanocida ocorre devido à indução da apoptose celular e inibição das enzimas topoisomerasas I e II (MIZUSHIMA et al., 2003).

Embora esse triterpenóide seja derivado de um componente natural e relativamente seguro, a toxicidade pode ocorrer em determinadas circunstâncias, dependendo da dose administrada (FERREIRA et al., 2010a; LIU et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura química do ácido ursólico
Fonte: ELOY et al (2012a)

Um dos problemas do uso do ácido ursólico é a baixa solubilidade aquosa, o que pode limitar a sua disponibilidade biológica e a farmacocinética *in vivo*, reduzindo a sua eficácia (ZHANG et al., 2013). Fármacos altamente hidrofóbicos são associados com a baixa absorção, podendo levar à biodisponibilidade inadequada ou variável (AHUJA et al., 2007; WAN et al., 2007). Algumas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar a solubilidade aquosa utilizando compostos quimicamente modificados. A complexação com ciclodextrinas, o uso de nanoemulsões (LIU et al., 2005b; XI et al., 2009), de dispersões sólidas (XI et al., 2009; ELOY et al., 2012b) e de nanopartículas poliméricas (ZHANG et al., 2013) constituem estratégias amplamente utilizadas para obter um aumento da biodisponibilidade de triterpenóides no organismo (LIU et al., 2005b).

1.3 Desenvolvimento de novas terapias

A Doença de Chagas é a doença parasitária mais relevante das Américas, embora os tratamentos não tenham evoluído para uma farmacoterapia mais eficiente, capaz de eliminar amastigotas presentes na forma indeterminada/ crônica, empregando fármacos menos tóxicos que o benzonidazol (ROMERO et al., 2010).

Pesquisas têm sido direcionadas a uma farmacoterapia mais confiável e segura, com a finalidade de eliminar os parasitas e encontrar um fármaco que possa ser administrado endovenosamente, e, como profilaxia, antes de uma transfusão de sangue, como uma abordagem quimioprolática. A violeta genciana tem sido usada com a finalidade quimioprolática, mas, embora seja eficaz na eliminação dos parasitas, restrições impedem que seja administrada. Essas restrições são prejudiciais ao organismo, pois interferem na preservação plaquetária, induzindo lise ou formação de grumos (FERREIRA et al., 2010a; SOARES et al., 2004).

1.4 Nanotecnologia e Sistemas de Liberação de Fármacos

O maior desafio da farmacoterapia é alcançar os parasitas que se disseminam no interior das células, já que barreiras físicas das células hospedeiras prejudicam a liberação do fármaco nos ninhos de amastigotas. Sendo assim, a farmacoterapia ideal para a doença de Chagas seria a obtenção de um fármaco com um alto volume de distribuição, um tempo de meia vida longo, sendo efetivo tanto na fase crônica como na aguda da doença (ROMERO et al., 2010; DATE et al., 2007). O fármaco comercialmente disponível, benzonidazol, possui um volume de distribuição alto, mas o seu acesso ao alvo intracelular é prejudicado, aumentando a sua concentração e toxicidade. Portanto, sistemas de liberação contendo componentes tripanocidas precisam ser desenvolvidos com o intuito de conter a disseminação parasitária, reduzindo efeitos adversos (DATE et al., 2007).

A nanotecnologia é uma tecnologia com capacidade de produção, manipulação e visualização de materiais em escala nanométrica, ou seja, um bilionésimo de metro, sendo muito promissora dentro de diversas áreas, tais como, médica, farmacêutica, biotecnológica, engenharia, telecomunicação e informação (HORTON, M. A., KHAN, A., 2006).

Essa tecnologia tem sido muito utilizada para a veiculação de vários fármacos. Nanocarreadores, como nanopartículas poliméricas, metálicas, lipossomas, micelas e dendrímeros, apresentam várias vantagens, dentre elas, o aumento da biodisponibilidade; a proteção do fármaco contra degradação e inativação; o aumento e controle da liberação do fármaco no tecido alvo, podendo promover seletividade, diminuindo, assim, a toxicidade (XIAO, et al., 2009; KUMAR, 2012). Além disso, podem aumentar a capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos dependendo da técnica empregada, controlam cinéticas de liberação do fármaco, otimizam a farmacocinética, aumentando assim a eficácia do fármaco (LEO et al, 2006).

1.4.1 Nanopartículas Poliméricas

Dentre os sistemas de liberação, destacam-se as nanopartículas, que são amplamente utilizadas nas áreas farmacêutica e cosmética para liberação modificada de compostos. O seu tamanho nanométrico permite maior captação intracelular do que outros sistemas. Podem melhorar a estabilidade dos fármacos e são biocompatíveis com os tecidos e células quando obtidos a partir de materiais biocompatíveis e/ou biodegradáveis (MORA-HUERTAS et al., 2009).

Devido às suas dimensões reduzidas, esses sistemas podem ser administrados por qualquer via, incluindo a via endovenosa, sem riscos de embolia, pois seu tamanho nanométrico não é capaz de obstruir os capilares sanguíneos (STORPITIS et al., 2009, SOPPIMATH et al., 2001). Além disso, estudos afirmam que o diâmetro médio da nanopartícula deve ser menor que 250 nm para evitar interações negativas com o sistema fagocitário mononuclear e garantir um tempo de vida adequado na corrente circulatória e uma liberação controlada (LINCE et al., 2008; VALENTE et al., 2012).

Dessa forma, o fármaco pode estar dissolvido, encapsulado, ou ligado ao sistema, dependendo da técnica de preparo, constituindo assim, uma nanoesfera ou nanocápsula. As nanocápsulas, **Figura 3B**, são sistemas denominados reservatórios, sendo consideradas um sistema não homogêneo, em que o fármaco está recoberto por uma membrana polimérica, sendo possível identificar o núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas, **Figura 3A**, são consideradas estruturas

monolíticas, onde o fármaco se encontra disperso em uma matriz polimérica ou cerosa (VAUTHIER et al., 2009; VALENTE et al., 2012).

Figura 3 – Representação de nanoesfera (A) e nanocápsula (B)

1.4.2 Polímeros utilizados

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos (SINHA et al., 2004) e os polímeros devem ser escolhidos de acordo com o tipo de liberação pretendida (OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M., 2006).

Os polímeros biodegradáveis, sintéticos e naturais, têm sido pesquisados como sistemas de liberação de fármaco, entretanto, somente alguns são biocompatíveis. Os polímeros naturais tais como colágeno, gelatina, albumina bovina e humana sérica, e hemoglobina têm sido muito estudados, mas devido à sua baixa pureza, dificuldade de reprodução de lotes e seu alto custo, seu uso tem sido limitado (JAIN et al., 1998).

A biodegradabilidade de um polímero é uma característica muito importante, pois previne a toxicidade crônica após a administração, principalmente endovenosa. Esses materiais são degradados em cadeias de baixa massa molecular e atóxicos que, após a liberação do fármaco, são metabolizados e eliminados ou absorvidos

pelo organismo (CHEN et al, 2000). A biocompatibilidade com os tecidos do organismo é considerada também uma característica importante, pois, quando um nanomaterial interage com o organismo não pode induzir resposta tóxica, imunogênica, trombogênica e carcinogênica (NAAHIDI et al., 2013).

Vários polímeros sintéticos têm sido utilizados como alternativa aos naturais. O ácido poli lático (PLA), poli (ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e policaprolactona (PCL) são exemplos de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. O polímero de escolha foi a policaprolactona.

1.4.2.1 Policaprolactona

A PCL, **Figura 4**, foi o primeiro polímero desenvolvido pelo grupo Carothers, em 1930, e tornou-se comercialmente disponível como um polímero sintético que pode ser degradado por microrganismos (WOODRUFF et al., 2010). Inicialmente foi pesquisada para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos e vacinas (NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T., 2007), mas tem sido muito usada em cirurgia ortopédica, oral e maxilar, sutura e para a regeneração de nervo (WOODRUFF et al., 2010).

É um polímero que possui um baixo ponto de fusão, entre 55-60°C e a temperatura de transição vítrea é de 60°C. O peso molecular médio das amostras pode variar entre 10.000 - 45.000 g/mol. A PCL sofre degradação hidrolítica, devido à presença de ligações ésteres alifáticas instáveis. É solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e nitropropano à temperatura ambiente; e possui uma baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila e acetonitrila (WOODRUFF et al., 2010; SINHA et al., 2004).

É um poliéster alifático sintético aprovado pela FDA, semi-cristalino, hidrofóbico, biodegradável, biocompatível e de baixo custo, e tem sido utilizado na encapsulação de diversos tipos de fármacos (SINHA et al., 2004; OSSA et al., 2012; TIAN et al., 2012). É adequado para liberação modificada de fármacos, atoxicidade (CHEN et al., 2000; SINHA et al., 2004; WOODRUFF., et al., 2010) e por permitir a administração pela via endovenosa (OSSA et al., 2012).

Figura 4 - Estrutura química do polímero policaprolactona

Fonte: LILI, Z. (2007)

1.4.3 Técnicas de preparo das nanopartículas

A técnica de preparo é muito importante na obtenção das nanopartículas. O fármaco pode estar dissolvido, encapsulado ou ligado e, dependendo da técnica de preparo e da composição, pode resultar em uma nanoesfera ou nanocápsula (SOPPIMATH et al., 2001). Além disso, as diferentes técnicas permitem obter nanopartículas com propriedades adequadas para garantir liberação do fármaco no alvo desejado (VAUTHIER et al., 2009). As nanopartículas podem ser preparadas por diversas técnicas, tais como, evaporação do solvente, nanoprecipitação, técnica de emulsão e difusão do solvente e por diálise (DASH et al., 2012). Este trabalho visa a avaliar o preparo de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.

1.4.3.1 Nanoprecipitação

A nanoprecipitação é, também, denominada deslocamento do solvente ou deposição interfacial. De acordo com Fessi et al. (1989), esta técnica consiste no gotejamento de uma fase orgânica, contendo solvente volátil miscível em água, de polaridade intermediária, fármaco e polímero, em uma solução aquosa, contendo ou não tensoativo, sob agitação moderada constante. O polímero, em contato com a solução aquosa, precipita juntamente com o fármaco, formando as nanopartículas. O solvente orgânico é eliminado por evaporação.

A deposição polimérica que ocorre na interface entre a água e o solvente orgânico causa uma rápida difusão do solvente, conduzindo a formação de uma suspensão coloidal (RUPALI et al, 2012).

A nanoprecipitação é uma técnica simples, rápida, econômica, de fácil transposição de escala e reprodutível de nanopartículas que apresentam estreita

distribuição de tamanho (FERREIRA et al, 2007; VAUTHIER et al, 2009, FESSI et al., 1989).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas de policaprolactona para a veiculação de ácido ursólico, visando à otimização da terapia da Doença de Chagas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de nanopartículas de policaprolactona (PCL) para veiculação de ácido ursólico por via endovenosa, utilizando a técnica de nanoprecipitação.
- Quantificação do ácido ursólico por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo método desenvolvido e validado pelo nosso grupo (ELOY et al, 2012a).
- Determinação da eficiência de encapsulação
- Seleção do crioprotetor e determinação do rendimento do processo.
- Caracterização morfológica do sistema obtido, utilizando-se técnicas de análise do tamanho e distribuição por espalhamento dinâmico de luz, análise do potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliação da influência do meio dispersante em análises de espalhamento dinâmico de luz.
- Avaliação da compatibilidade química entre fármaco e do polímero por meio de espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).
- Determinação do coeficiente de partição óleo/água do ácido ursólico.
- Avaliação *in vitro* do perfil de liberação do ácido ursólico encapsulados nas nanopartículas.
- Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico.
- Avaliação da citotoxicidade, por ensaio de resazurina, em células LLCMK2 tratadas por 24 e 48 horas com diferentes concentrações de AU em nanopartículas.
- Avaliação da atividade antiparasitária, por ensaio de resazurina, em células tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas por 24 e 48 horas com diferentes concentrações de AU em nanopartículas.

Objetivos _____

- Avaliação da atividade biológica do ácido ursólico, em nanopartículas de policaprolactona, em estudo em animais experimentalmente infectados com cepas Y do *Trypanosoma cruzi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matérias-primas, reagentes e solventes

- Acetona, P.A., lote 130651, Synth (Brasil)
- Acetonitrila, grau cromatográfico, lote K45066, J.T. Baker (EUA)
- Ácido ortofosfórico 85%, PA, lote: K07D60, Macron Chemicals (China)
- Ácido ursólico (Colastil[®]), lote 090201, Idealfarma (Brasil)
- Benzonidazol, lote: 17056, LAFEPE (Brasil)
- Brometo de cetiltrimetilamônio, lote 0904932, Vetec (Brasil)
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado, P.A., lote 93438, Synth (Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, P.A., lote 93438, Synth (Brasil)
- Lauril sulfato de sódio, lote HN7J315470, Henrifarma (Brasil)
- Octanol (álcool N-octílico), P.A., lote 33709, Dinâmica (Brasil)
- Poloxamer 188 (Lutrol[®] F68), lote WPOD583B, BASF (Alemanha)
- Poloxamer 407 (Lutrol[®] F127), lote 0001424146, Sigma Aldrich (EUA)
- Poloxamer 407 (Lutrol[®] F127), lote WPMF542B, BASF (Alemanha)
- Policaprolactona, lote 55996PJ, Sigma Aldrich (EUA)
- RPMI-1640, Life technology, Gibco (EUA)

3.2 Método Analítico para quantificação do Ácido Ursólico

3.2.1 Adaptação do método validado para a quantificação do Ácido Ursólico

A quantificação do ácido ursólico foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando método desenvolvido e validado anteriormente em nosso laboratório por Eloy et al. (2012a) e adaptado para o sistema estudado de acordo com as recomendações da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (2005) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).

3.2.1.1 Condições cromatográficas

O ácido ursólico foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando equipamento da marca Shimadzu[®], equipado com detector UV, uma bomba, um injetor manual e uma coluna de fase reversa C₁₈ (LiChroCART[®] 250-4 LiCrospher[®] Merck RP-18, Alemanha), com tamanho de partícula de 5 µm, associada a uma pré-coluna de mesma composição. O comprimento de onda do detector foi estabelecido em 203 nm.

A fase móvel usada para a quantificação do ácido ursólico nas nanopartículas foi acetonitrila:água, na proporção 88:12 (v/v). E para a quantificação do fármaco no meio de dissolução foi acetonitrila:solução de ácido fosfórico 0,1%, na proporção 80:20 (v/v), segundo Almeida et al. (2011), conforme condições anteriormente validadas por Eloy et al. (2012a). As análises foram realizadas utilizando uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹, em temperatura ambiente controlada de 25,0 ± 1,0 °C e volume de injeção correspondente a 20 µL. As amostras foram filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore[®]) antes da injeção. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão intradia.

3.2.1.2 Preparo das soluções padrão

A partir da solução estoque do AU 100 µg.mL⁻¹ em acetonitrila foram realizadas diluições para o preparo das soluções, também em acetonitrila, obtendo-se as concentrações de 1; 5; 10; 25 e 50 µg mL⁻¹.

3.2.1.3 Curva analítica e linearidade

A partir da solução estoque de AU (100,0 µg mL⁻¹) foram preparadas soluções em concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µg mL⁻¹ em acetonitrila. Os gráficos foram construídos relacionando os valores concentração no eixo das abscissas com os valores de absorvância no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da proporcionalidade entre a concentração e a resposta a partir do cálculo do coeficiente linear (b), do coeficiente angular (a) e do coeficiente de correlação (r). O coeficiente de correlação (r) mínimo aceitável, segundo Brasil (2003) é de 0,99 (ELOY et al, 2012a).

3.2.1.4 Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra, demonstrando que os resultados não são afetados pela presença de tais componentes. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão ficam comprometidas (RIBANI et al, 2004; BRASIL, 2003).

Sendo assim, a seletividade foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos de amostras do AU e análise das nanopartículas isentas de ácido ursólico, e pela comparação do ácido ursólico puro com o meio de dissolução.

✓ Nanopartículas inertes

A seletividade do método foi realizada para verificar possíveis interferentes da formulação. Dessa forma, a formulação das nanopartículas de PCL foi analisada, utilizando-se 100 µL de nanopartículas inertes rompidas em 900 µL de acetonitrila e banho de ultrassom por 10 minutos e adicionando-se concentrações conhecidas do fármaco. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore®), antes da análise por CLAE. As amostras foram analisadas em triplicata.

✓ Meio de dissolução

A seletividade foi realizada para o meio de dissolução, em que foi adicionado 0,5% de CTAB, 0,5% de poloxamer 407 e/ou 0,5% de lauril sulfato de sódio em 3 mL de tampão fosfato de sódio 30 mM. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore®) antes da análise por CLAE. As amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.1.5 Exatidão e precisão

A exatidão é um parâmetro que consiste no grau de concordância entre os resultados encontrados e um valor aceito como referência, avaliando nove determinações que contemplam o intervalo linear do procedimento, ou seja, triplicata de cada uma das 3 concentrações (BRASIL, 2003), segundo fórmula abaixo:

$\text{Exatidão: } \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em várias medições de uma mesma amostra. Foi avaliada a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesmo equipamento. Esta análise é denominada precisão intracorrida ou repetibilidade. A repetibilidade do método é realizada com o intuito de avaliar nove determinações que contemplam o intervalo linear do procedimento, ou seja, triplicata de cada uma das 3 concentrações (BRASIL, 2003), segundo fórmula abaixo:

$$\text{Precisão: } \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{conc. experimental}}$$

3.3 Preparo das nanopartículas

3.3.1 Nanoprecipitação

Para a obtenção da fase orgânica, o polímero (PCL) e o fármaco (ácido ursólico), em diferentes proporções (**Tabela 1**), foram solubilizados em acetona e submetidos a banho de ultrassom (modelo Q-335D, Quimis[®]), por 10 min. A fase aquosa foi composta de uma solução contendo tensoativo (poloxamer 407 ou 188). Após a dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi adicionada lentamente sob a fase aquosa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sob agitação, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação a 300 rpm, utilizando agitador magnético (modelo 752A, Fisatom[®]), em capela de exaustão e temperatura ambiente de $25,0 \pm 1^\circ\text{C}$, durante um período de 24 horas até total evaporação do solvente.

A suspensão de nanopartículas foi filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore[®]), para reter o fármaco não encapsulado, excesso de polímero, agregados e impurezas. E, segundo Tomoda (2010), a suspensão filtrada foi ultracentrifugada (modelo OPTIMA XL-70, BECKMAN[®]) a 40.000 rpm (100.000g), $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 30 minutos, para separar as nanopartículas da fase aquosa, que poderia conter fármaco não encapsulado (**Figura 5**).

Figura 5 - Representação esquemática da técnica de nanoprecipitação

Durante o desenvolvimento, foram avaliados o tipo de tensoativo utilizado, a proporção de fase orgânica/aquosa (FO:FA) e proporção de fármaco/polímero (AU:PCL), visando a obter um tamanho de partícula compatível com a via de administração endovenosa e uma eficiência de encapsulação máxima (**Tabela 1**).

Tabela 1- Modificações realizadas no processo de preparo de nanopartículas de policaprolactona contendo ácido ursólico.

Formulação	Condições utilizadas	Proporções utilizadas
1	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 188	1:10 / 1:2
2	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:10 / 1:1
3	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:10 / 1:2
4	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:10 / 1:3
5	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:3 / 1:2
6	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:4 / 1:2
7	AU:PCL / FO:FA / Poloxamer 407	1:5 / 1:2

Legenda: AU: ácido ursólico/PCL: policaprolactona/FO: fase orgânica/FA: fase aquosa.

3.4 Seleção do crioprotetor e rendimento do processo

Foi realizada a seleção do crioprotetor na tentativa de se obter partículas homogeneamente dispersas, apresentando um tamanho compatível com a via de administração pretendida. Além disso, o crioprotetor confere proteção ao processo de liofilização, que está diretamente ligado a estabilidade ao sistema.

Após o preparo das nanopartículas descrito no item 3.4, as nanopartículas foram ressuspensas em 1 mL de água Milli Q[®], congeladas e submetidas ao processo de liofilização para secagem e estabilização, utilizando-se liofilizador (modelo condensador 101, Liobras). Os crioprotetores testados foram a sucrose na concentração de 10 e 20% e a trealose nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (ABDELWAHED et al., 2006).

O rendimento do processo foi calculado após a liofilização através da fórmula abaixo, sendo considerada a massa pesada a somatória do peso do tensoativo, polímero, fármaco e crioprotetor:

$$R(\%) = \frac{\text{massa liofilizada}}{\text{massa pesada}} \times 100$$

3.5 Caracterização das nanopartículas

3.5.1 Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada através da quantificação do fármaco nas nanopartículas em suspensão, após a etapa de filtração, e do sobrenadante resultante do processo de separação das nanopartículas, após a ultracentrifugação (modelo OPTIMA XL-70, BECKMAN[®]) a 40.000 rpm (100.000g), por 30 minutos. A quantificação do ácido ursólico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência conforme descrito no item 3.3. Nesse processo, 500 µL da suspensão filtrada e do sobrenadante (após a ultracentrifugação) foram transferidos para um balão volumétrico de 5mL, completando-se o volume com acetonitrila. As soluções foram submetidas ao banho de ultrassom por 5 minutos, e filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore[®]). A concentração do ácido ursólico foi calculada utilizando a equação da curva analítica, considerando-se o fator de diluição (x10). A concentração teórica foi obtida com relacionando-se a massa do fármaco adicionada com o volume final da suspensão (após a evaporação da fase orgânica). A eficiência de encapsulação (EE) foi obtida em porcentagem utilizando-se a fórmula:

$$EE (\%) = \frac{(\% \text{ AU da suspensão filtrada} - \% \text{ AU do sobrenadante})}{\text{Concentração teórica (massa pesada)}} \times 100$$

3.6 Caracterização morfológica das nanopartículas

3.6.1 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas

O tamanho de partícula foi determinado em analisador por dispersão de luz Zetasizer (modelo Nano ZS, Malvern), utilizando temperatura controlada de 25°C, com ângulo de detecção de 173°. A suspensão de nanopartículas foi diluída na proporção de 1:10 (v/v) em água Milli Q® e inserida na câmara de análise, com o auxílio de uma cubeta. Foram obtidas medidas do diâmetro das partículas, bem como a distribuição por intensidade, representada pelo índice de polidispersividade (Pdl).

3.6.2 Análise do potencial zeta

A determinação do potencial zeta foi realizada para todas as formulações através da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer (modelo Nano ZS, Malvern®), em temperatura controlada de 25°C. Para isso, as nanopartículas em suspensão foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em água Milli Q® e transferidas para a cubeta de análise.

3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Inicialmente as partículas foram lavadas na tentativa de se retirar o tensoativo (poloxamer 407) das partículas. Essa lavagem foi realizada de acordo com o item 3.3.1 e após a ultracentrifugação das partículas, as mesmas foram ressuspensas em 1 mL de água Milli Q®, repetindo estas etapas por 2 vezes.

Após o preparo das partículas, as dispersões aquosas contendo as amostras, com e sem lavagem, foram gotejadas sobre placas de vidro de aproximadamente 0,5 cm² e submetidas à evaporação, visando à obtenção de partículas homogeneamente dispersas. Em seguida, as placas de vidro, contendo as amostras, foram aderidas em suportes de alumínio, utilizando fita adesiva à base de carbono.

Sequencialmente, todo o sistema foi recoberto com fina camada de ouro pulverizado, por 120 segundos, em um metalizador Bal-Tec (modelo SCD 050 Sputter Coater, Baltec®). A investigação morfológica das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico Zeiss (modelo EVO50, Zeiss®) utilizando voltagem entre 10,00 e 25,00 KV.

3.7 Avaliação da influência do meio dispersante em análises de espalhamento dinâmico de luz

Após o preparo das nanopartículas de ácido ursólico pela técnica de nanoprecipitação, foi realizada a avaliação da influência de diferentes meios dispersantes na análise do tamanho da partícula e potencial zeta, por um período de 28 dias.

O diâmetro médio e a polidispersividade foram determinados pelo espalhamento dinâmico de luz e o potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética utilizando o equipamento ZetaSizer (modelo Nano ZS, Malvern®). Em todas as análises, a suspensão de nanopartículas foi diluída 1:10 (v/v) em dois meios dispersantes: água ultrapurificada (Milli Q®) ou cloreto de potássio (1mM).

3.8 Avaliação química do fármaco e do polímero

3.8.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier (FTIR)

Essa análise foi realizada para averiguar possíveis interações moleculares ocorridas entre o ácido ursólico, policaprolactona e poloxamer 407. Assim, amostras do fármaco, polímero, tensoativo e nanopartículas contendo o ácido ursólico foram analisados separadamente.

Os experimentos foram realizados com o uso de equipamento (modelo IR Prestige-21, Shimadzu®). As amostras foram previamente trituras e compactadas com brometo de potássio (KBr) em prensa hidráulica para a formação de uma pastilha, com pressão de 6 Kgf cm⁻². As análises foram feitas com resolução de 2 cm⁻¹, de 5000 a 400 cm⁻¹.

3.9 Determinação do coeficiente de partilha o/a do ácido ursólico

De acordo com o método descrito por Lopes (2005), 50 mL de octanol foram saturados com o mesmo volume de água, agitando-se a mistura por aproximadamente 12 horas, em placa de agitação magnética (modelo MAG MULTI, MARTE) a 600 rpm. O octanol foi separado da água com o auxílio de um funil de separação, após repouso de 5 min., e, posteriormente centrifugado a 2.500 rpm (734g) por 10 min., e a água remanescente foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Um excesso de fármaco (5 mg) foi adicionado em 5 mL de uma solução aquosa de tampão 30 mM, contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio. Em seguida o sistema foi agitado em mesa de agitação magnética de 600 rpm por 30 minutos e mantida a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho termostatzado. As soluções contendo o ácido ursólico foram filtradas em membrana $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore®) para a retirada do precipitado e analisadas por CLAE, determinando-se a concentração de ácido ursólico na fase aquosa antes da partilha (C1).

Para a determinação do coeficiente de partilha o/a, 5 mL do octanol saturado foram adicionados a 5 mL da solução aquosa de ácido ursólico. A mistura foi agitada por 30 minutos e por 2 horas, a 600 rpm, a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As fases foram separadas por centrifugação (modelo centrifuge 5810R, Eppendorf®) e a fase aquosa foi quantificada após a partilha (C2), sendo, então, o coeficiente de partilha o/a determinado através da equação de Wells, 1988:

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

O experimento foi realizado em triplicata.

3.10 Seleção do meio de dissolução

3.10.1 Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico

O coeficiente de solubilidade do ácido ursólico em água foi determinado adicionando-se excesso do fármaco (5 mg) em 3 mL de água, e submetido a um processo de agitação magnética (modelo MAG MULTI, Marte) (600 rpm) até o

equilíbrio (24 h) a temperatura de $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$. A amostra foi filtrada em membrana $0,45\mu\text{m}$ (Millipore®) e analisada por CLAE para determinação da quantidade dissolvida. As determinações foram realizadas em triplicata.

Para verificar o meio de dissolução mais apropriado a ser utilizado nas etapas futuras de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas, foi verificada a solubilidade do fármaco em tampão acrescido ou não tensoativos. As amostras foram submetidas a um processo de agitação magnética (600 rpm) até o equilíbrio (24 h) à temperatura de $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$. As determinações foram realizadas em triplicata. As amostras foram diluídas 1:1 em fase móvel e filtradas em membrana $0,45\mu\text{m}$ (Millipore®) antes da injeção por CLAE. Os meios avaliados foram:

- Tampão fosfato de sódio 30 mM pH 7,4
- Tampão fosfato de sódio 30 mM pH 7,4 + poloxamer 407 0,5%
- Tampão fosfato de sódio 30 mM pH 7,4 + lauril sulfato de sódio 0,5%

3.10.2 Avaliação *in vitro* do perfil de liberação do ácido ursólico a partir do sistema obtido

Como o ácido ursólico possui uma baixa solubilidade em meio aquoso, foi necessária a adição de tensoativos no meio de dissolução.

Os experimentos *in vitro* de liberação foram realizados com as amostras de nanopartículas em suspensão. A quantidade de fármaco nas nanopartículas e de ácido ursólico puro foi correspondente a $27\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $30\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, no meio receptor, garantindo condições “*sink*”, pois corresponde a menos que 10% da solubilidade do fármaco determinado experimentalmente.

Foram testadas duas técnicas para a avaliação do perfil de liberação do ácido ursólico: a diálise e a ultrafiltração/centrifugação. As análises realizadas pela técnica de diálise foram realizadas em dissolutor (modelo SR8 Plus, marca Hanson Corporation®) utilizando mini-cubas com capacidade para 150 mL contendo 50 mL do meio e aparato adaptado, composto por cilindros de PVC envoltos por membrana de diálise celulose regenerada 12 KDa (Fisherbrand®), com velocidade de agitação de 150 rpm e a temperatura mantida em $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($n=3$). Alíquotas de 500 μL foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, sendo este volume repostado com o meio de dissolução fresco e filtradas em membrana $0,45\mu\text{m}$. A evaporação do meio de dissolução foi controlada diariamente antes da coleta,

corrigindo, assim, o volume de água evaporada. As amostras coletadas foram analisadas por CLAE em fase móvel 80:20 acetonitrila:solução ácido fosfórico 0,1%.

As análises realizadas pela técnica de ultrafiltração/centrifugação foram realizadas em dissolutor (modelo SR8 Plus, Hanson Corporation®) utilizando minicubas com capacidade para 150 mL contendo 50 mL do meio e aparato mini-pá, com velocidade de agitação de 150 rpm e a temperatura mantida em $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (n=3). Alíquotas de 500 μL foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, sendo este volume repostado com o meio de dissolução fresco. As alíquotas foram colocadas em tubos AMICON® de 50 KDa (Millipore®) e em seguida foi centrifugado a 1000g, por 15 minutos, a 25°C . A evaporação do meio de dissolução foi controlada diariamente antes da coleta, corrigindo, assim, o volume de água evaporada. As amostras retiradas do tubo foram analisadas por CLAE em fase móvel 80:20 acetonitrila:solução ácido fosfórico 0,1%, como descrito no item 3.2.1.1.

3.11 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária por ensaio de resazurina

A avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária foram realizadas em parceria com o laboratório de Glicoimunologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, coordenado pelo professor Dr. Marcelo Dias Baruffi.

O ensaio colorimétrico com resazurina ou Alamar Blue® está descrito desde 1950 para avaliar contaminação bacteriana em fluidos biológicos, função mitocondrial, proliferação de organismos vivos, qualidade do sêmen, e citotoxicidade de diferentes células. Este indicador tem sido muito utilizado para a identificação dos gêneros: *Trypanosoma* e alguns *Leishmania* spp. É um ensaio que utiliza uma reação de oxidação-redução, que através de reações enzimáticas ou químicas em células viáveis, a resazurina, de coloração azul, transforma-se em resofurina, rósea. A coloração rósea é indicativa de viabilidade celular (SILVA, M. R., 2009; NAKAYAMA et al, 1997, ROLON et al., 2006), segundo a **Figura 6**.

Figura 6 - Ensaio colorimétrico da resazurina

3.11.1 Avaliação da citotoxicidade em células LLCMK2

Inicialmente, foi realizado um cultivo das células de mamífero, LLCMK2, em meio RPMI-1640 (Life technologies – Gibco) em estufa a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 . Essas células foram tripsinizadas das garrafas, sendo centrifugadas (Modelo Excelsa II, FANEM[®]) a 1.200 rpm (300g) por 10 minutos para formar um pellet de células. A densidade celular/poço foi calculada e foi plaqueada 10^6 células/poço em 20 μL de suspensão de células em meio, em uma placa de 96 poços.

Foram realizadas diluições seriadas da formulação de nanopartículas contendo AU com o meio RPMI-1640 para as concentrações: 30, 60, 90 e 120 μM de AU. Para as nanopartículas isentas de AU foram realizadas diluições seriadas com o meio RPMI-1640 para as mesmas concentrações (30, 60, 90 e 120 μM) como se nessa formulação tivesse o fármaco, considerando em ambas as formulações o mesmo volume final de solução. Uma solução de benzonidazol, controle de morte, foi preparada a partir de uma solução estoque de 44,6 mM em DMSO, realizando-se diluições seriadas com o meio RPMI-1640 para atingir as concentrações: 15, 30 e 45 μM . A concentração final de DMSO em todas as formulações foi 0,5%, que não é tóxica para as células. 80 μL de formulação foram adicionados a 20 μL meio de cultura RPMI-1640 contendo as células LLCMK2 (REIMAO et al., 2011).

Após 24 e 48 horas foram adicionados 5 μL de solução de resazurina $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ por poço e as placas foram deixadas em estufa por 12 horas. Após esse período foi realizada a medição da absorvância em leitor de placas (modelo Synergy 2, Biotek[®]) no comprimento de onda de 490 nm.

A viabilidade celular foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{densidade óptica (poço teste)}}{\text{densidade óptica (poço referência)}} \times 100$$

3.11.2 Avaliação da atividade antiparasitária

Inicialmente, foram obtidas formas tripomastigotas de células de mamífero, LLCMK2 infectadas com *T. cruzi* em meio RPMI – 1640 (Life technologies – Gibco) em estufa a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 . O sobrenadante dessas culturas foi centrifugado em centrífuga (Modelo Excelsa II, FANEM) a 1.200 rpm (300g) por 10 minutos para a retirada das células LLCMK2, e ultracentrifugadas (modelo 5810R, Eppendorf®) a 2.800 rpm (700g), por 20 minutos para formar um pellet de células de *T. cruzi*. A densidade celular/poço foi calculada, 5×10^6 células/poço, e 12 μL dessas células foram plaqueadas em placa de 96 poços.

Foram realizadas diluições seriadas da formulação de nanopartículas contendo AU com o meio RPMI-1640 para as concentrações: 30, 60, 90 e 120 μM . Para as nanopartículas isentas de AU foram realizadas diluições seriadas com o meio RPMI-1640 para as mesmas concentrações (30, 60, 90 e 120 μM) como se nessa formulação tivesse o fármaco, considerando em ambas as formulações o mesmo volume final de solução. Uma solução de benzonidazol, controle de morte, foi preparada a partir de uma solução estoque de 44,6 mM em DMSO, realizando-se diluições seriadas com o meio RPMI-1640 para atingir as concentrações: 15, 30 e 45 μM . A concentração final de DMSO em todas as formulações foi 0,5%, que não é tóxica para as células. 80 μL de formulação foram adicionados a 12 μL de meio de cultura contendo tripomastigotas (REIMAO et al., 2011).

Após 24 e 48 horas foram adicionados 5 μL de solução de resazurina 25 $\mu\text{g/mL}$ e as placas foram deixadas em estufa por 12 horas. Após esse período foi realizada a medição da absorvância em leitor de placas (modelo Synergy 2, Biotek®) no comprimento de onda de 490 nm.

A viabilidade celular foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{densidade óptica (poço teste)}}{\text{densidade óptica (poço referência)}} \times 100$$

3.12 Avaliação *in vivo* da atividade biológica do ácido ursólico encapsulado em nanopartículas de policaprolactona, em estudo em animais experimentalmente infectados com cepas Y do *Trypanosoma cruzi*

O estudo *in vivo* foi realizado em parceria com o laboratório de Glicoimunologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, coordenado pelo professor Dr. Marcelo Dias Baruffi, com projeto aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade, com o protocolo nº: 13.1.834.53.4.

Foi realizada uma anestesia prévia à coleta de sangue dos camungongos Swiss infectados, que foram gentilmente fornecidos pela doutoranda Thalita Bachelli Riul (cujo projeto de Doutorado foi aprovado pelo CEUA - USP, Campus de Ribeirão Preto – sob o Protocolo nº 08.1.587.53.1). No sétimo dia de infecção, no pico parasitêmico, os animais foram anestesiados com ketamina 100 mg.kg⁻¹ e xilasina 5 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, por via intraperitoneal e foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca. Foi realizada a contagem das formas tripomastigotas, em microscópio Zeiss®, em aumento de 400x, conforme método descrito por Melo, Brener (1978).

A partir dessa contagem, os camundongos C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com cerca de 1000 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, diluídas em 0,2 mL de PBS. O tratamento foi iniciado com 48 horas de infecção.

O estudo da atividade biológica do AU foi composto de 4 grupos, sendo o:

Grupo I, o controle positivo com infecção, composto por 5 animais inoculados, intraperitonealmente, com 10³ tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, onde foi avaliado o perfil parasitêmico da cepa, frente aos animais utilizados;

Grupo II, fármaco controle, composto por 5 animais inoculados, intraperitonealmente, com 10³ tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, que, após 48h da inoculação foram tratados por via retro-orbital com Benzonidazol na dosagem correspondente a 2,5 µg/animal/dia diluídos em PBS, por 7 dias;

Grupo III, foi tratado após 48h da inoculação intraperitoneal dos parasitas (10³ tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y), os animais receberam por via retro-orbital a concentração correspondente a 13,15 µg/animal/dia do sistema contendo ácido ursólico, por 7 dias; e

Grupo IV, foi tratado após 48h da inoculação intraperitoneal dos parasitas (10³ tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y), os animais receberam por via retro-orbital o mesmo volume de nanopartícula isenta de AU que os animais do Grupo III

receberam, por 7 dias (RIUL, T. B., 2010; SARAIVA, J., et al., 2010; FERREIRA, D. S., 2010b).

O estudo foi realizado em quintuplicata. Após o estudo, os animais foram eutanasiados com a inalação de dióxido de carbono em câmara apropriada, sendo que a morte do animal foi confirmada através da parada respiratória, ausência de reflexo pupilar, insensibilidade cutânea por período superior a 15 minutos e temperatura corporal abaixo de 26°C. Os animais foram encaminhados ao biotério para incineração.

A parasitemia foi avaliada pela contagem de formas tripomastigotas em 5 µL de sangue fresco, segundo método descrito por Melo, Brener (1978), com o sangue coletado da veia caudal, no 5º, 7º, 9º e 12º dia de infecção, a partir do segundo dia de infecção. O sangue foi colocado em uma lâmina, coberto com uma lamínula para garantir a homogeneidade do sangue. Essa lâmina foi levada ao microscópio óptico Zeiss, em aumento de 400x, determinando-se o número de parasitas por campo, totalizando 100 campos, para depois, determinar a quantidade de parasitas por mm³ e mL (RIUL, T. B., 2010).

3.13 Análise de resultados

Os dados obtidos das análises da atividade biológica do AU foram avaliados por análise de variância ANOVA, de duas vias, para o estudo de parasitemia. Os dados obtidos das análises de citotoxicidade e atividade antiparasitária foram avaliados por análise de variância, ANOVA, uma via, seguida pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls, para determinação do nível de significância das diferenças. Foram considerados estatisticamente significativos: $P < 0,05 \rightarrow *$; $P < 0,01 \rightarrow **$; $P < 0,001 \rightarrow ***$. Os resultados foram expressos graficamente (GraphPad Software Prisma, versão 5.0, San Diego California, EUA), a partir dos valores absolutos, como porcentagem média em relação ao controle $\pm$ erro padrão da média (EPM), com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método Analítico para quantificação do ácido ursólico

4.1.1 Adaptação do método validado para a quantificação de ácido ursólico

4.1.1.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade de um método analítico refere-se à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida (BRASIL, 2003). As respostas obtidas são diretamente proporcionais à concentração da amostra para o intervalo compreendido de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considerando os valores de $r > 0,999$, $CV < 5\%$ para os pontos de 5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $CV = 10\%$ para o limite de quantificação inferior (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

O método adaptado mostrou-se linear tanto para a quantificação do ácido ursólico nas nanopartículas, apresentando equação da reta: $y = 12973x + 12222$, com $r = 0,999$, quanto para a quantificação do fármaco no meio de dissolução, apresentando equação da reta: $y = 0,284x + 0,025$, com $r = 0,9999$.

4.1.1.2 Seletividade

Frente à necessidade de se avaliar a presença de interferentes na análise que pudessem refletir na veracidade dos resultados, foi realizada a avaliação da seletividade nas nanopartículas isentas de AU e não foram observados interferentes que prejudicassem as análises.

A seletividade realizada no meio de dissolução mostrou que o tampão fosfato de sódio 30 mM, associado ou não a tensoativos (lauril sulfato de sódio e poloxamer 407), não interferiram nas análises. Já o tampão adicionado de CTAB 0,5% interferiu nas análises, sendo descartado do estudo.

A seletividade do ácido ursólico no meio de dissolução com tensoativos foi realizada com a fase móvel acidificada, de acordo com Almeida et al. (2011), pois o AU é um ácido fraco, de $pK_a = 5,29$ (DU et al., 2009), em um meio de dissolução de

pH 7,4 encontra-se em sua forma ionizada. Em uma fase móvel acidificada, ocorrerá uma supressão iônica, fazendo com que o fármaco interaja mais com a coluna C₁₈, retardando o aparecimento do pico, diminuindo possíveis interferentes, ou da formulação ou do meio de dissolução.

4.1.1.3 Exatidão e precisão

O resultado mostrou que o método analítico desenvolvido e validado por Eloy et al. (2012a), revelou-se robusto frente a alterações na proporção da fase móvel e do pH, mantendo-se linear, exato e preciso tanto para a quantificação do AU nas nanopartículas, quanto para o AU no meio de dissolução, conforme **Tabela 2**.

Tabela 2 - Exatidão e precisão do método cromatográfico adaptado, utilizado na quantificação do ácido ursólico no meio de dissolução

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)		Precisão (%)	
	AU-NP	AU-MD	AU-NP	AU-MD
1	+7,8	+5	10,43	10,88
25	+1	+0,35	2,84	3,81
50	-0,34	-0,18	0,33	1,41

Legenda: AU-NP: quantificação do ácido ursólico nas nanopartículas; AU-MD: quantificação do ácido ursólico no meio de dissolução.

4.2 Nanoprecipitação

Esse processo é eficaz, econômico, de simples execução e transposição de escala e utiliza solventes de menor toxicidade. O tamanho das nanopartículas preparadas por essa técnica varia normalmente entre 100 a 500 nm (HIRSJÄRV, 2008; LEGRAND et al., 2007). Este deve ser estritamente controlado principalmente para a administração endovenosa, pois os menores capilares sanguíneos possuem diâmetro entre 4-7 μm e o tamanho nanométrico das partículas evita a oclusão destes (CHORNY M., S. C. et al., 2002; MAINARDES et al., 2005) e facilita a distribuição do fármaco (XU et al., 2005). Estudos afirmam que o diâmetro médio da nanopartícula deve ser menor que 250 nm para evitar interações negativas com o sistema fagocitário mononuclear e garantir um tempo de vida adequado na corrente circulatória e uma liberação controlada (LINCE et al., 2008; VALENTE et al., 2012).

Para a otimização da produção das nanopartículas, inicialmente foram preparadas duas formulações com 0,5% de poloxamer 407 ou 188, e, segundo a **Tabela 3**, a formulação obtida com o poloxamer 407 apresentou menor tamanho de partícula ($173,17 \pm 4,20$) e menor índice de polidispersividade, gerando um perfil monomodal; o valor do potencial zeta correspondeu a -36 mV, podendo ser considerada uma suspensão de nanopartícula estável e com alta eficiência de encapsulação. Além disso, Dunn et al. (1997) comparou nanopartículas revestidas com poloxamer 407 e 188, em estudos *in vivo*, demonstrou que as nanopartículas revestidas com o poloxamer 188 foram rapidamente metabolizadas, apresentando um rápido clearance hepático e esplênico, e as nanopartículas revestidas com poloxamer 407 prolongaram a ação do fármaco na corrente circulatória, o que pode ser muito importante para a administração *in vivo* do ácido ursólico.

A maior eficiência de encapsulação com o poloxamer 407 pode ser explicada pela maior solubilidade do ácido ursólico nesse tensoativo, já que este apresenta maiores domínios hidrofóbicos que o poloxamer 188 (PATEL et al., 2009; URBAN-MORLAN et al, 2008).

Dessa forma, o poloxamer 188 foi descartado do estudo.

Tabela 3: Diâmetro médio (nm), o índice de polidispersidade (Pdl), potencial zeta e eficiência de encapsulação (%) relacionada com diferentes tensoativos no preparo de nanopartículas de PCL contendo AU.

Formulação (Prop. AU:PCL/FO:FA/Tensoativo)	Diâmetro médio (nm) ± CV (%)	Pdl ± CV (%)	Potencial Zeta (mV) ± CV (%)	Eficiência de encapsulação (%) ± CV (%)
1 - 1:10 / 1:2 / P 188	198,67±33,09	0,26±37,77	-40±11,47	63,65±7,67
2 - 1:10 / 1:1 / P 407	267,8±7,23	0,17±32,47	-23,75±16,97	77,40±1,23
3 - 1:10 / 1:2 / P 407	173,17±4,20	0,09±24,77	-36±9,43	94,1±1,31
4 - 1:10 / 1:3 / P 407	180,85±1,21	0,14±16,72	-19,27±22,87	69,57±1,98
5 - 1:3 / 1:2 / P 407	156,9±1,83	0,06±31,32	-18,2±20,8	36,5±5,73
6 - 1:4 / 1:2 / P 407	156,4±0,09	0,1±17,59	-17,1±9,69	50,16±3,47
7 - 1:5 / 1:2 / P 407	167,5±6,84	0,17±12,78	-13,8±7,96	36,44±4,87

Legenda: Prop.: proporção/ AU: ácido ursólico/ PCL: poli-ε-caprolactona/ FO: fase orgânica/ FA: fase aquosa/ ± CV(%): coeficiente de variação /Tens: tensoativo

A proporção da fase orgânica:aquosa é um dos parâmetros mais críticos para a formação espontânea de partículas coloidais pela técnica da nanoprecipitação. Estudos posteriores foram realizados com poloxamer 407 e foram testadas três proporções de fase orgânica:aquosa (FO:FA), as formulações 2, 3 e 4 (**Tabela 3**). Observou-se que, modificando a proporção de fase orgânica:aquosa de 1:1 para 1:2 ocorreu um aumento da eficiência de encapsulação e uma diminuição do tamanho de partícula. E, aumentando a proporção de 1:1 para 1:3, observou-se a diminuição do tamanho de partícula, diminuindo assim a eficiência de encapsulação, o que pode ser justificado devido ao aumento da área superficial específica causada pela formação de pequenas gotas durante a precipitação, ocorrendo a difusão do fármaco para a fase externa juntamente com o solvente, diminuindo, assim, a eficiência de encapsulação (FONSECA et al., 2002). Sendo assim, a proporção 1:2 de fase orgânica:aquosa foi a que apresentou melhor resultado, prosseguindo-se os estudos.

Foram testadas, também, diferentes proporções de fármaco/polímero. E, como pode ser observado nas formulações 3, 5, 6 e 7, a melhor formulação com relação ao diâmetro médio desejado (<200nm) foi a proporção 1:10 de fármaco polímero (formulação 3). O tamanho das partículas está diretamente relacionado com a quantidade de polímero adicionado, sendo que as menores concentrações de PCL (1:3, 1:4 e 1:5) obtiveram os menores tamanhos de partículas e seus valores foram próximos, mas obtiveram eficiência de encapsulação baixa, pois, quanto

menor a concentração do polímero, menos polímero estará disponível para cada gota de solução precipitar, resultando em uma partícula de PCL menor (CHENG ET al. 2010), ou seja, o tamanho reduzido da nanopartícula reduz a capacidade da matriz polimérica de incorporar o fármaco (FONSECA et al., 2002). Dessa forma, com a proporção 1:10 de AU:PCL, obteve-se um melhor resultado e prosseguiu-se os estudos.

O índice de polidispersividade é um parâmetro que define a distribuição do tamanho de partículas através da análise de espectroscopia de correlação de fótons. As dimensões em torno de 0,01 são consideradas monodispersas e amostras com dimensões acima de 0,7 são consideradas polidispersas. A formulação 3, **Tabela 3**, apresentou um índice de polidispersividade de aproximadamente 0,095, apresentando um perfil monomodal. O tamanho e a distribuição do tamanho das partículas são fatores críticos na performance das nanopartículas, podendo afetar na liberação do fármaco, biodisponibilidade e eficácia da formulação (KHARIA; SINGHAI, 2012).

A determinação do potencial zeta, **Tabela 3**, é um parâmetro importante para nanopartículas em suspensão e esse valor está relacionado com a estabilidade da dispersão e com as propriedades de superfície da partícula (RUPALI et al, 2012). O potencial zeta reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, o qual é influenciado pela carga dos diferentes componentes das nanopartículas, como polímero, fármaco e tensoativos (COUVREUR et al, 2002; MORA-HUERTAS et al., 2009). Valores em módulo igual a 30 mV indicam suspensões de nanopartículas mais estáveis, devido à força de repulsão gerada entre as partículas, prevenindo, assim, a agregação (VALENTE et al., 2012). O potencial zeta da formulação 3 indica uma suspensão estável. Esse comportamento pode ocorrer devido à presença de um monômero com grupamento funcional de carga negativa empregado na polimerização do polímero (LINCE et al., 2008) e também pela adsorção do agente estabilizante na superfície das nanopartículas, em que as cadeias de hidrocarbonetos do tensoativo interagem com as regiões hidrofóbicas da parede do polímero (PCL) e a porção hidrofílica do tensoativo fica exposta na fase aquosa, gerando o potencial zeta negativo (MORA-HUERTAS et al., 2009).

4.3 Seleção do crioprotetor e a determinação do rendimento do processo

A liofilização é um processo muito utilizado em nanosuspensões e remove a água de amostras através da sublimação. Com o intuito de proteger as partículas do estresse causado por esse processo, congelamento e desidratação, e promover a estabilidade do sistema, adiciona-se crioprotetores às nanosuspensões. A imobilização das nanopartículas dentro da matriz congelada do crioprotetor pode prevenir agregação e proteger de estresse mecânico causado pelos cristais de gelo. Normalmente utiliza-se uma maior concentração de crioprotetor e um rápido congelamento, o que resulta em uma melhor redispersibilidade das partículas (ABDELWAHED et al., 2006, LI et al., 2009).

Inicialmente foi utilizado a trealose como crioprotetor, sendo testadas as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. Esse crioprotetor é usado, pois é menos higroscópico, não possui ligações de hidrogênio em sua molécula permitindo uma maior formação de pontes de hidrogênio com as nanopartículas durante a liofilização, possui uma reatividade química baixa e alta temperatura de transição vítrea (ABDELWAHED et al., 2006). As nanopartículas preparadas com trealose apresentaram tamanhos de partículas acima de 636,45 nm e uma alta polidispersividade (no máximo de 0,9) (**Figura 7**), o que pode ser justificado devido a esse crioprotetor ser mais efetivo para a estabilização de nanopartículas lipídicas sólidas em uma concentração acima de 15% (ABDELWAHED et al., 2006).

Figura 7 - Gráfico do tamanho de partícula, sendo A: NP sem liofilizar, B: NP com trealose 0,5%, C: NP com trealose 1,0%, D: NP com trealose 1,5% e E: NP com trealose 2,0%

A sucrose também foi testada como crioprotetor nas concentrações 10 e 20%, apresentando um tamanho de partícula de 316 e 265 nm, respectivamente, e índice de polidispersividade de 0,29 e 0,19, respectivamente, conforme apresentado na **Figura 8**.

Figura 8 - Gráfico do tamanho de partícula, sendo A: NP sem liofilizar, B: NP com crioprotetor sucrose 10% e C: NP com crioprotetor sucrose 20%

O processo de liofilização, juntamente com o crioprotetor, resultou em um rendimento de $92,8 \pm 3,70\%$. O rendimento foi calculado com sucrose 20%, pois essa concentração apresentou menor tamanho de partícula e índice de polidispersividade. Mas não foi possível continuar os estudos com a formulação liofilizada, pois, para ser administrada na corrente sanguínea, sem o risco de causar embolia e ser reconhecido pelo sistema mononuclear fagocitário, o tamanho de partícula deve ser menor que 250 nm.

4.4 Avaliação da influência do meio dispersante em análise de espalhamento dinâmico de luz

A caracterização das nanopartículas poliméricas é muito importante para avaliar e entender os parâmetros que afetam a sua estrutura e seus efeitos biológicos. A força iônica da solução, o pH, carga superficial e o revestimento superficial são parâmetros importantes e governam o estado e a estabilidade das nanopartículas (JIANG et al., 2009). Dessa forma, visto a importância da caracterização físico-química das nanopartículas, decidiu-se avaliar o meio dispersante nas análises de espalhamento dinâmico de luz. Essa análise é essencial

para a caracterização das partículas já que o meio dispersante influencia significativamente nos parâmetros de diâmetro e potencial zeta.

Na técnica de espalhamento dinâmico de luz a flutuação de espalhamento de luz, proveniente de partículas em solução iluminadas por um laser, são medidas e correlacionadas com o diâmetro das partículas. As flutuações de luz espalhada se devem ao movimento browniano que é o movimento aleatório das partículas que ocorre devido ao bombardeamento de moléculas do solvente com as partículas. A velocidade do movimento Browniano é definida por uma propriedade conhecida como coeficiente de difusão translacional (D) que depende não só do tamanho da partícula, mas também, da composição da superfície das partículas e da concentração e do tipo de íons do meio dispersante. Dessa forma, a composição do meio dispersante influencia nas medidas realizadas por espalhamento dinâmico de luz, sendo que o diâmetro das partículas é calculado a partir do coeficiente de difusão translacional usando a equação de Stokes-Einstein (MALVERN, 2013):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

onde d (H) é o diâmetro hidrodinâmico da partícula, que refere ao tamanho da partícula em um líquido; D o coeficiente translacional de difusão; T a temperatura absoluta, que deve permanecer estável nas análises para uma correta interpretação dos dados; η é a viscosidade (MALVERN, 2013).

Outra medida realizada é o potencial zeta, isto é, a carga superficial das partículas. A medida de potencial zeta é realizada pela mobilidade eletroforética, que é a técnica utilizada para medir a mobilidade eletroforética das partículas em dispersão ou moléculas em solução.

O potencial zeta pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio dispersante. Na maioria dos sistemas dispersos aquosos as cargas são oriundas principalmente da ionização de grupos funcionais ou da adsorção de íons da solução. Essa carga superficial das partículas modifica a distribuição dos íons ao redor das mesmas, resultando na formação de uma camada ao redor das partículas formada por contra-íons. Esta camada, chamada de camada de Stern, terá carga oposta a da partícula. Em seguida, outra camada é formada com carga oposta a da

camada de Stern, chamada de camada difusa. A camada de Stern e a difusa compõem a dupla camada elétrica ao redor da partícula. Com o movimento Browniano essa camada se move como se fosse parte da partícula e portanto influencia nos parâmetro de diâmetro e carga superficial (MALVERN, 2013).

Figura 9 - Representação da influência da dupla camada elétrica em análises de potencial zeta
Adaptado: MALVERN (2013)

O potencial zeta é medido no ponto desta camada, denominada plano de cisalhamento (*slipping plane*), como demonstrado na **Figura 9**. E a carga neste ponto é muito sensível às variações de concentração e tipo de íons do meio dispersante (MALVERN, 2013).

Sendo assim, de acordo com a **Figura 10**, os tamanhos das nanopartículas diluídas em água Milli Q[®] variaram de 168,8 a 246,6 nm, durante o período de 28 dias. Por outro lado, as nanopartículas diluídas em cloreto de potássio permaneceram em torno de 186 nm, em 28 dias. O índice de polidispersividade manteve-se próximo de 0,2 para todas as análises. Pode-se afirmar que o diâmetro das nanopartículas diluídas com cloreto de potássio não alterou significativamente em função do tempo, indicando que esse meio dispersante é mais adequado, já que

apresenta concentração de íons capaz de formar uma dupla camada elétrica compacta, diminuindo, assim, a influência desta nas análises.

Figura 10 - Análise do tamanho de partícula e polidispersividade nos meios dispersantes: água (A) e cloreto de potássio (B) em análise de espalhamento de luz

Segundo a **Tabela 4**, o potencial zeta das nanopartículas, diluídas em água Milli Q®, alterou significativamente durante o período estudado: -25 mV (24 h); -19,6 (7 dias); -27,8 (14 dias); -3,44 (21 dias) e -14,9 mV (28 dias), enquanto que os valores de potencial zeta das nanopartículas, diluídas em cloreto de potássio, permaneceram estáveis durante os 28 dias, confirmando que esse meio dispersante é mais adequado, apresentando concentração de íons capaz de formar a dupla camada elétrica compacta, diminuindo, assim, a influência dessa camada nas análises. Além disso, nas análises de potencial zeta, a concentração usada de

cloreto de potássio também foi adequada, exibindo uma condutividade elétrica em torno de 0,3 mS/cm, maior que quando comparada ao meio dispersante água, garantindo, assim, uma concentração de íons suficiente para formar a dupla camada e, portanto, fornecendo um valor correto de potencial zeta.

Tabela 4– Avaliação da água e cloreto de potássio como meio dispersante em análise de potencial zeta e condutividade elétrica

	Potencial zeta (mV)		Condutividade elétrica (mS/cm)	
	Água	KCl	Água	KCl
24 horas	-25	-16,1	0,008	0,1601
7 dias	-19,6	-13,1	0,03	0,369
14 dias	-27,8	-17,3	0,085	0,23
21 dias	-3,44	-8,51	0,029	0,201
28 dias	-14,9	-12,2	0,014	0,411

Assim, o meio dispersante mais apropriado para a caracterização e maior conhecimento das nanopartículas poliméricas foi o meio contendo cloreto de potássio (1 mM).

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Essa técnica se baseia na irradiação de um feixe fino de elétrons sobre uma amostra, permitindo a obtenção de informações estruturais e químicas de diversas amostras (STORPIRTIS et al., 2009).

Todas as fotomicrografias (**Figura 11 A, B e C**) das análises das preparações de nanopartículas PCL, contendo AU, mostraram partículas agregadas e ligeiramente esféricas, sendo que essa agregação pode ocorrer devido ao processo de secagem das nanopartículas, o que é necessário para a análise; devido ao poloxamer 407 que recobre as partículas; ou pode ser característico do polímero utilizado, a policaprolactona.

Na tentativa de se retirar poloxamer 407 da suspensão para melhorar o aspecto das nanopartículas, foram preparadas duas amostras, uma sem e outra com lavagem e não foram observadas diferenças significativas entre elas (**Figuras 11 A, B e C**, sem (**A e B**) e com lavagem (**C**)).

As fotomicrografias da literatura com policaprolactona, contendo lovastatina funcionalizadas com fosfato β -tricálcio, mostraram que as nanopartículas apresentam uma característica agregada semelhante à encontrada neste trabalho, demonstrando a natureza vítrea do polímero (TARAFDER et al., 2013).

Dessa forma, podemos concluir que o método utilizado para o preparo das partículas foi adequado para obtenção de nanopartículas de PCL contendo ácido ursólico apresentando características morfológicas adequadas aos objetivos propostos, pois o tamanho das partículas demonstrou ser compatível com os valores observados nas análises de espalhamento dinâmico de luz, de aproximadamente 200 nm, apresentando também um perfil monodisperso com um índice de polidispersividade de $0,095 \pm 7,44\%$.

Figura 11- Fotomicrografias das nanopartículas de PCL contendo ácido ursólico, na proporção FO:FA 1:2 e AU:PCL 1:10. Aumento de 50.000 (A), 100.000 (B) e 30.000x (C); voltagem de 20KV

4.6 Avaliação química do fármaco e do polímero por meio de espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A compatibilidade fármaco/polímero é muito importante no desenvolvimento da formulação, sendo que esta pode ter seus parâmetros modificados para melhorar a biodisponibilidade do fármaco e a sua atividade terapêutica (DUPEYRON et al., 2013).

As análises de infravermelho têm sido muito utilizadas em várias aplicações, para as análises de líquidos, gases e substâncias sólidas na caracterização detalhada de cada estado físico. Uma propriedade fundamental das ligações químicas é que cada uma delas exibe vibrações em frequências distintas. Essa análise serve também como ferramenta de diagnóstico, permitindo elucidar informações estruturais de inúmeras amostras biológicas (JAMKOGIEWICK et al., 2012).

Figura 12 - Espectro de infravermelho de ácido ursólico puro, nanopartículas contendo ácido ursólico, policaprolactona e poloxamer 407

O ácido ursólico possui duas bandas características, o grupo carbonila e o grupo hidroxila. A forte absorção a 1750 cm⁻¹, correspondente ao

grupamento carbonila (C=O) é muito intensa, sendo a forma e a intensidade desse pico único e exclusivo desse grupamento funcional. O grupamento hidroxila possui absorção em 3400 cm^{-1} (LAMPMAN, P.; VYVYAN, K. 2009).

Visto que a PCL possui grupamento carbonila e hidroxila, e o poloxamer 407 possui grupamento hidroxila, os espectros das moléculas isoladas e nanopartículas de AU não permitiram uma visualização dos grupamentos das nanopartículas de AU. Além disso, a análise das nanopartículas foi realizada com a amostra líquida. As amostras líquidas apresentam em sua composição água, levando a formação de uma banda larga na região de absorção da hidroxila, limitando a detecção de outros compostos na amostra analisada (JAMRÓGIEWICZ, M., 2012).

4.7 Determinação do coeficiente de partição o/a do ácido ursólico

Embora a via de administração pretendida seja a via endovenosa, a determinação do coeficiente de partilha do fármaco nos permite avaliar a lipofilicidade e o comportamento do mesmo em sistemas biológicos (WISCHKE et al., 2008). Este estudo foi realizado com a adição de tensoativo, pois o ácido ursólico é um fármaco com característica muito lipofílica, que impede a molhabilidade do mesmo.

Com este estudo, verificou-se que a solubilidade do ácido ursólico em uma solução aquosa de lauril sulfato de sódio foi aproximadamente de $151\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, com relação ao coeficiente de partição, mesmo com a utilização de tensoativo, o ácido ursólico partilhou totalmente para o solvente, não sendo quantificado na solução aquosa com tensoativo, demonstrando a sua alta lipofilicidade.

4.8 Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico

O ácido ursólico apresenta uma solubilidade menor que $1,0\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ em água, não sendo observado o pico do fármaco, indicativo de sua alta lipofilicidade.

Os resultados dos testes de solubilidade em água e tampão fosfato de sódio 30 mM pH 7,4, mostraram que o método utilizando a CLAE não apresentou sensibilidade suficiente para a quantificação do fármaco. O resultado dos testes de solubilidade do ácido ursólico em solução tampão, com a adição de tensoativos, está apresentado na **Tabela 5**, onde fica evidente que o meio de dissolução ideal para os

ensaios *in vitro* do perfil de liberação é o tampão fosfato de sódio pH 7,4 adicionado de poloxamer 407 0,5%, por apresentar uma solubilização de AU maior que 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Tabela 5 - Solubilidade do ácido ursólico em tampão fosfato de sódio 30 mM e tensoativos

Solução tampão	Tensoativo	solubilidade / 24h ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Fosfato de sódio 30 mM pH 7,4	-	< 1,0	-
Fosfato de sódio 30 mM pH 7,4	Poloxamer 407 0,5%	1026,39	5,54
Fosfato de sódio 30 mM pH 7,4	LSS 0,5%	299,12	20,03

Legenda: CV%: coeficiente de variação expresso em porcentagem.

Segundo Dumortier et al. (2006), o poloxamer 407, embora tenha solubilizado aproximadamente 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, em temperaturas elevadas, tem a propriedade de se agregar e formar micelas. Essa micelização pode ocorrer devido à desidratação de blocos de óxido de propileno, representando o primeiro passo de geleificação. Essa hipótese foi confirmada com a retirada de uma alíquota do meio de dissolução e submetida à análise de espalhamento dinâmico de luz, apresentando um tamanho de partícula de 1.109 nm, sendo, então, descartado do estudo em questão.

Sendo assim, o lauril sulfato de sódio foi o tensoativo de escolha para o estudo *in vitro* do perfil de liberação, solubilizando aproximadamente 300 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ácido ursólico.

4.9 Avaliação *in vitro* do perfil de liberação do ácido ursólico a partir do sistema obtido

É de suma importância avaliar a quantidade de fármaco que é liberada de uma forma farmacêutica por unidade de tempo, sendo este ensaio realizado após o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. Os dados obtidos podem ser usados como um parâmetro de controle de qualidade e/ou para predizer os mecanismos de liberação (WASHINGTON et al., 1989).

Os estudos de liberação possuem especificações nas Farmacopéias para formas farmacêuticas convencionais, mas não há nenhuma especificação para liberação de fármacos encapsulados em nano/micropartículas. Entretanto, deve-se manter as condições “*sink*” (WISCHKE et al., 2008), em que a concentração do fármaco liberado no meio de dissolução não deve exceder 10% da sua concentração de saturação no meio selecionado (MAROTTA-OLIVEIRA, 2009).

A avaliação *in vitro* do perfil de liberação do ácido ursólico pela técnica de diálise foi realizada utilizando lauril sulfato de sódio 0,5%, tensoativo no qual houve solubilização do fármaco de aproximadamente $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração do ácido ursólico encapsulado nas nanopartículas usada neste estudo foi de aproximadamente $27 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração de ácido ursólico puro, $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mantendo as condições *sink*. Segundo a **Figura 13**, a liberação do ácido ursólico das nanopartículas, em 12 horas, atingiu 10%, sendo que em 120 horas de estudo atingiu aproximadamente 20%. Já o ácido ursólico puro solubilizou, em 12 horas, 40% e, em 120 horas, aproximadamente 75%.

Figura 13 - Representação gráfica do perfil *in vitro* de liberação do ácido ursólico, no meio de dissolução solução tampão 30 mM e lauril sulfato de sódio 0,5%, sendo A: AU livre e B: AU encapsulado em NP

Diante do exposto, pode-se sugerir que ou a membrana de diálise prejudicou a liberação do ácido ursólico ou o lauril sulfato de sódio não está solubilizando adequadamente o ácido ursólico, não permitindo a sua quantificação no meio receptor. Zambito et al.(2012) questionaram se o método de diálise é confiável para o estudo de liberação do fármaco de sistemas nanoparticulados e compararam a liberação pelo método da diálise e ultrafiltração/centrifugação. Os autores afirmaram

que a membrana de diálise é um fator limitante para a liberação de fármacos hidrofóbicos.

Sendo assim, foi realizada a técnica de ultrafiltração/centrifugação com o tensoativo lauril sulfato de sódio 0,5%, nas mesmas condições anteriores, também não foi possível quantificar do ácido ursólico. Segundo Mascher, E.; Lundahl, P. (1989), a concentração micelar crítica do lauril sulfato de sódio corresponde a 1,8 mM em uma solução de força iônica 0,10 M. Como esse tensoativo encontra-se em uma solução tampão 30 mM, a concentração micelar crítica, para que ocorra a formação de micelas, é 0,54 mM. Portanto, considerando que o meio receptor apresente uma mesma força iônica que a solução iônica 0,10 M, uma hipótese para o problema de quantificação do ácido ursólico no meio de dissolução é a formação de micelas que impedem a filtração do solubilizado pelo método da ultrafiltração/centrifugação.

Portanto, não foi possível a conclusão deste estudo, pois o comportamento altamente hidrofóbico desse fármaco não permitiu a avaliação *in vitro* do perfil de liberação.

4.10 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária

Inicialmente foi realizado o ensaio por MTT para avaliar a citotoxicidade e a atividade antiparasitária após tratamento com as nanopartículas contendo ácido ursólico. Para o ensaio de MTT é feita a avaliação das células viáveis que são capazes de reduzir o sal de tetrazolium, de coloração amarela solúvel em água, em formazan, de coloração azul. A quantidade de cristais de formazan formada foi determinada por espectrofotometria após a solubilização destes em DMSO, que é proporcional à atividade metabólica mitocondrial, e o número de células em cada poço (SIEUWERTS, A. M., et al., 1995).

As concentrações de ácido ursólico utilizadas das nanopartículas foram baseadas em Zhang et al. (2013), o qual utilizou as concentrações de ácido ursólico de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μM em nanopartículas de policaprolactona peguiladas, com avaliação em ensaio por MTT.

No presente estudo também foi avaliada a atividade antiparasitária das nanopartículas isentas de AU e nanopartículas de AU, porém, não houve morte

significativa das formas tripomastigotas com essas concentrações, talvez devido aos tripomastigotas não serem células aderentes assim como as células LLCMK2.

Dessa forma, o ensaio colorimétrico por resazurina foi proposto para avaliar a citotoxicidade e atividade parasitária de compostos tripanocidas. Na reação de redução-oxidação de resazurina não ocorre precipitação após a redução, tal qual ocorre no ensaio com MTT, essa redução está diretamente relacionada com o meio de crescimento e a taxa de proliferação de organismos vivos, pois quanto maior a viabilidade celular, maior a redução transformando a resazurina, de coloração azul em resofurina, de coloração rosa (ROLON et al., 2006).

Foram testadas outras concentrações 30, 60, 90 e 120 μM , abrangendo concentrações maiores de ácido ursólico no meio de cultura, avaliando a citotoxicidade em células LLCMK2 e a atividade parasitária das NP com AU em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

4.10.1 Avaliação da citotoxicidade em células LLCMK2

A atividade citotóxica das nanopartículas contendo ácido ursólico, nanopartículas isentas de ácido ursólico e do fármaco comercialmente disponível, benzonidazol, foram avaliadas em ensaio de viabilidade celular por resazurina, utilizando células de fibroblastos de mamíferos, LLCMK2. As células foram incubadas por 24 e 48 horas com as concentrações de AU nas nanopartículas de 30, 60, 90 e 120 μM e solução de BZN de 15, 30 e 45 μM , todas em meio RPMI-1640. O mesmo volume utilizado para a incubação das NP contendo AU nas diversas concentrações foi utilizado quando se avaliou as nanopartículas isentas de ácido ursólico.

As concentrações de BZN, 15, 30 e 45 μM , foram selecionadas de acordo com Saraiva et al. (2007), que utilizaram formas parasitárias epimastigotas e uma solução de BZN de concentração 30,89 μM ; Grecco et al. (2010), que utilizaram tripomastigotas e uma solução de BZN de 47,54 μM ; e Cotinguiba et al. (2009), que trabalharam com epimastigotas, utilizando uma concentração de BZN de 42,7 μM . Na tentativa de abranger três concentrações de BZN, chegou-se as concentrações de 15, 30 e 45 μM .

Segundo **Figura 14**, os valores de viabilidade celular após 24 horas de tratamento foram $102,34 \pm 3,82\%$, $101,58 \pm 0,34\%$, $98,18 \pm 0,84\%$ para BZN,

nanopartículas isentas de AU e nanopartículas contendo AU, respectivamente. Com isso, pode-se afirmar que não houve redução significativa da viabilidade celular nesse período. Já para o período de 48 horas foram obtidos valores de viabilidade celular de $92,28 \pm 2,57\%$, $89,74 \pm 2,96\%$, $92,72 \pm 3,39\%$, para BZN, nanopartículas isentas de AU e nanopartículas contendo AU, respectivamente, também sem redução significativa da viabilidade celular, o que torna o tratamento viável, sendo muito importante para administração da formulação no meio biológico. A análise de toxicidade celular é uma ferramenta importante para conhecer e avaliar como os biomateriais se comportam em nível celular, sabendo que essa reação direta com o meio biológico pode resultar em efeitos tóxicos (SOARES, V. C. G.; VARANDA, G. A.; RADDI, M. S. G., 2006; HANKS, C. T.; WATAHAZ, J. C.; SUNI, Z., 1996).

Figura 14 - Viabilidade celular das células LLCMK2 com a administração de benzonidazol, NP isentas de AU (NP-B) e NP contendo AU (NP-AU), sendo gráfico A: citotoxicidade 24 horas e gráfico B: citotoxicidade 48 horas. n = 5

Com o intuito de eliminar possíveis efeitos citotóxicos atribuídos aos componentes da formulação, a viabilidade celular também foi avaliada com a incubação de células com diferentes concentrações de NP sem ácido ursólico. No presente estudo, as NP sem AU não provocaram diminuição da viabilidade celular em função das substâncias que compõem as nanopartículas, conforme **Figura 14**, indicando que o polímero e o tensoativo utilizados no preparo das nanopartículas não são tóxicos para as células.

4.10.2 Avaliação da atividade antiparasitária por ensaio de resazurina em células tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As concentrações avaliadas foram iguais ao estudo de citotoxicidade em células LLMCK9, descrito no item 4.10.1., sendo: 30, 60, 90 e 120 μM , abrangendo concentrações maiores de ácido ursólico no meio de cultura, avaliando a citotoxicidade em células LLCMK2 e a atividade antiparasitária em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Também foram avaliadas concentrações de BZN de acordo com Saraiva et al. (2007), Grecco et al. (2010) e Cotinguiba et al. (2009). Esses autores utilizaram as concentrações 30,89; 47,54 e 42,7 μM , respectivamente, para avaliar a atividade antiparasitária do BZN.

Figura 15: Atividade antiparasitária contra formas tripomastigotas com a administração de benzonidazol, nanopartículas isentas de AU e nanopartículas contendo AU em meio RPMI-1640, sendo gráfico A: atividade antiparasitária 24 horas e gráfico B: atividade antiparasitária 48 horas. $n = 5$. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados com as nanopartículas isentas de ácido ursólico. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Pode-se observar, na **Figura 15**, que no ensaio de 24 horas houve uma diminuição da atividade antiparasitária para $46,70 \pm 3,81\%$, $39,93 \pm 2,88\%$, $33,33 \pm 2,49\%$ para as concentrações de 15, 30 e 45 μM de benzonidazol (controle positivo), respectivamente o mesmo perfil de inibição da atividade parasitária foi conseguido para as NP contendo ácido ursólico, $56,85 \pm 5,70\%$, $61,42 \pm 2,21\%$, $65,48 \pm 1,52\%$, $57,87 \pm 1,52\%$ para as concentrações 30, 60, 90 e 120 μM , respectivamente, evidenciando o potencial terapêutico das NP contendo ácido ursólico contra formas tripomastigotas. Quando avaliado o período de tratamento de 48 horas, manteve-se

uma atividade parasitária diminuída para $37,95 \pm 3,12\%$, $29,31 \pm 1,66\%$, $31,40 \pm 1,56\%$ para as concentrações de 15, 30 e 45 μM de benzonidazol, respectivamente, bem como perfil de atividade parasitária diminuída para as NP contendo ácido ursólico em $64,73 \pm 1,36\%$, $67,26 \pm 5,70\%$, $54,91 \pm 5,32\%$, $50,00 \pm 2,90\%$ para as concentrações 30, 60, 90 e 120 μM , respectivamente.

Na **Figura 15 A**, conforme a análise estatística ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls, há diferença estatística de $p < 0,05$ entre os grupos em que foram administrados NP contendo AU e solução de BZN, comparado com NP isentas de AU. Já em 48 horas de tratamento, **Figura 15 B**, com a mesma análise estatística foi possível perceber diferença estatística entre os grupos: BZN e NP isentas de AU ($p < 0,001$), bem como entre NP isenta de AU e NP contendo AU ($p < 0,01$). Podemos afirmar que a formulação de NP contendo AU tem uma ação eficaz contra tripomastigotas em análises da atividade antiparasitária.

4.11 Avaliação da atividade biológica do ácido ursólico em animais experimentalmente infectados com cepas Y do *Trypanosoma cruzi*

A via de administração endovenosa, através da veia caudal, inicialmente proposta, foi substituída pela via retro-orbital, devido à dificuldade de administração. Os camundongos possuíam baixo peso corpóreo, cerca de 12 g, sendo difícil a localização e administração pela veia caudal.

Estudos relatam que a via retro-orbital, **Figura 16**, é uma alternativa interessante e tecnicamente simples para a administração de substâncias com baixa massa molecular e que as substâncias absorvidas no plexo retro-orbital são amplamente distribuídas pela corrente sanguínea (LI, S., et al., 2011).

Nanni, C. et al. (2007) demonstraram que a administração retro-orbital é uma técnica de simples execução, sendo sua eficácia equivalente à da administração endovenosa, pois a região retro-orbital do camundongo é altamente vascularizada e a taxa de absorção é rápida, sendo comparável a via endovenosa. O radiofármaco estudado por este grupo possui meia vida curta de 20 minutos e a administração retro-orbital faz com que este seja rapidamente distribuído na corrente sanguínea, dentro de 10 minutos.

Figura 16 - Administração retro-orbital das formulações em camundongo C57BL/6

Os parasitas circulantes foram avaliados segundo método descrito por Melo, Brener (1978) e a evolução da parasitemia nos grupos de tratamento está apresentada na **Figura 17**.

Foi realizada análise de variância ANOVA, de duas vias, para a comparação entre os grupos experimentais, avaliando a parasitemia no decorrer do tratamento, representado pela parasitemia versus tempo (dias).

O Grupo I, que é o controle positivo é o controle de infecção da parasitemia, no qual se observa um pico parasitêmico no 7º dia pós-infecção na cepa Y. A cepa Y é uma cepa isolada de pacientes na fase aguda da doença e possui um pico parasitêmico no 7º dia pós-infecção, que diminui no decorrer do tempo.

No Grupo II, os camundongos foram tratados com o fármaco controle, Benzonidazol na concentração de 2,5 µg/animal/dia, por 7 dias, e pode se observar uma redução acentuada (***) $p < 0,001$ dos tripomastigotas, quando comparados ao Grupo I, controle positivo de infecção, o qual não teve a parasitemia reduzida. Morilla et al.(2004) desenvolveram lipossomas contendo benzonidazol e compararam com uma solução isotônica de benzonidazol 0,4 mg/kg, administrada endovenosamente, para a avaliação da atividade antiparasitária contra a cepa pantrópica/reticulotrópica (RA), de 2 a 3 vezes por semana. Ambos os grupos apresentaram praticamente o mesmo pico de parasitemia em 20 dias pós-infecção, mostrando que o tratamento não foi efetivo no estudo. Molina et al. (2001) utilizaram a cepa Y e nanoesferas de PLA-PEG contendo o fármaco DO870 para administração endovenosa; e comparou com uma solução de benzonidazol 100 mg/kg/dia, para administração oral. As nanoesferas que continham o fármaco a 3 mg/kg/dia, tiveram 60% de cura, enquanto que o grupo tratado com o benzonidazol teve 40% de cura. Ferreira et al.

(2013), trabalharam com a cepa Y e conseguiram zerar a parasitemia, porém por via diferente, a via oral, e dose maior, 50 mg/kg/dia de BZN.

No Grupo III, os camundongos foram tratados diariamente com nanopartículas de ácido ursólico, na concentração de 13,15 µg/animal/dia, por 7 dias. Segundo a **Figura 17**, o tratamento foi capaz de reduzir a parasitemia, no 7º dia, sendo estatisticamente significativo (***) $p < 0,001$).

Quando comparado ao Grupo I, controle de infecção da parasitemia, há valores reduzidos de parasitemia, o que evidencia o potencial terapêutico das NP contendo AU no ensaio experimental realizado.

Uma hipótese para essa diminuição da parasitemia é que pode haver uma liberação sustentada nesse modelo de NP de ácido ursólico, assim como Zhang et al. (2013) obtiveram, o que mantém os níveis plasmáticos do fármaco na corrente sanguínea.

Figura 17 - Avaliação da atividade antiparasitária de NP de AU, NP isenta de AU com a administração de 13,15 µg/animal/dia, e solução de BZN 2,5 µg/animal/dia em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, comparado ao controle positivo de infecção, apresentando diferença estatisticamente significativa, no 7º dia de infecção * ($p < 0,001$)**

Diante do exposto, as nanopartículas são sistemas de liberação capazes de melhorar a biodisponibilidade e a atividade tripanocida *in vivo* do ácido ursólico. O sistema desenvolvido e avaliado neste trabalho demonstrou ser efetivo para a morte

dos tripomastigotas, porém, estudos para confirmar se realmente houve a morte dos parasitas ou se os parasitas disseminaram-se pelo sangue para órgãos e tecidos deverão ser realizados.

O sistema de liberação desenvolvido, além de proteger o fármaco contra degradação protegeu o ácido ursólico do meio biológico e de suas interações, sendo também capaz de promover uma liberação sustentada, podendo manter a concentração plasmática do ácido ursólico em níveis terapêuticos.

O sistema obtido pode ser proposto para uma ação profilática, visto que a doença de Chagas é silenciosa e de diagnóstico tardio, e muitos pacientes que necessitam de transfusão sanguínea de urgência recebem sangue de pessoas que podem ter essa doença e não possuem o conhecimento por não apresentar nenhum sintoma. Então, como uma abordagem quimioprofilática (FERREIRA et al., 2010a), pode ser sugerida a administração endovenosa desse sistema nanoparticulado contendo AU para conter a disseminação parasitária, antes que os parasitas disseminem do sangue para órgãos e tecidos.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a técnica utilizada para o preparo das partículas, a nanopecipitação, foi adequado para obtenção de nanopartículas de PCL contendo ácido ursólico. A formulação obtida (3) com a utilização de poloxamer 407 como agente estabilizante apresentou menor valor de tamanho de partícula ($173,17 \pm 4,20$ nm) e menor valor de índice de polidispersividade, gerando um perfil monomodal; o valor do potencial zeta correspondeu a -36 mV e a eficiência de encapsulação foi de $94,1 \pm 1,31\%$. O tamanho das nanopartículas observados na microscopia eletrônica de varredura demonstrou ser compatível com os valores obtidos nas análises de espalhamento dinâmico de luz, embora tenha apresentado uma característica agregada e ligeiramente esférica.

O estudo da citotoxicidade por ensaio de resazurina mostrou que a formulação obtida não alterou a viabilidade celular, não sendo tóxica para as células, porém foi capaz de reduzir a viabilidade dos parasitas em aproximadamente 50% para a concentração de 120 μ M, em 48 horas.

O sistema obtido tem um grande potencial terapêutico, assim como foi comprovado em estudo *in vivo* da atividade biológica do ácido ursólico, em nanopartículas, com animais experimentalmente infectados com cepas Y do *Trypanosoma cruzi*. O estudo apresentou uma redução acentuada ($p < 0,001$) dos tripomastigotas, quando comparados ao controle positivo de infecção, o que pode ser decorrente da liberação sustentada nesse modelo de nanopartículas poliméricas. Com base nesses resultados, pode-se propor uma abordagem quimioprolática, considerando que no Sistema Único de Saúde existe a necessidade dessa medida de segurança para pacientes que recebem transfusão sanguínea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F., SANTOS, W. S., SCHOFIELD, C. J. Research needs for Chagas disease prevention. **Acta tropica** 115(1-2), 44–54. 2010.

ABDELWAHED ET AL. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol 58. pag 1688–1713. 2006

AHUJA, N., KATARE, O. P., SINGH, B. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**. Vol 65. pag 26–38. 2007.

ALMEIDA et al, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, jun. 2003. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 de abril de 2012.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**. Vol 27. P 347-382. 1973.

CABARIN-LIMA, A. ET AL. Chagas disease (American trypanosomiasis in Mexico: Na update. **Acta tropica** 127. Pag 126-135. 2013.

CHEN, D. R., BEI, J. Z., WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. vol 67. p. 455–459. 2000.

CHENG, X.; LIU, R.; HE, Y. A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Vol 76. p. 336-341. 2010.

CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**. vol 83. p. 389–400.

COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry research**. Vol 18. Pag 703-711. 2009.

COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**. vol 115. p. 5–13. 2010.

COUVREUR, P. ET AL. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**.vol. 19. p. 99-134, 2002.

CSUK, R., SIEWERT, B. A convenient separation of ursolic and oleanolic acid. **Tetrahedron Letters**. vol 52. pag 6616–6618. 2011.

DASH, T. K., & KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**. vol 158. p. 15–33. 2012.

DATE, A. A. et al. Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. vol 59. pag 505-521. 2007.

DUNN, S. E. et al. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. **Jornal of Controlled Release**.vol 44. p. 65-76. 1997.

DUPEYRON, D. et al. Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant. **International journal of nanomedicine**.Vol 8. p. 3467-3477.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**.Vol 23. 2006.

ELOY, J. O.et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**. Vol 35. p. 1036–1040. 2012 a.

ELOY, J.O. et al. Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**. vol 13. p. 1436–1445. 2012 b.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Review article. **Acta Tropica**. vol 81. pag 123-132. 2002.

FERREIRA, A. G. Preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas. Dissertação (Mestrado em Farmácia), 2007 - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FERREIRA, D. D. S. ET AL. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology research**. vol 106. p. 985–9. 2010a.

FERREIRA, D. S. Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental. Tese (Doutorado em farmácia), 2010. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, 2010b.

FESSI, H. ET AL. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, vol 55, p. R1 – R4, 1989.

FONSECA, C., SIMÕES, S., GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**. vol 83. p. 273–286. 2002.

GRECCO, S. S. et al. Isolation of a antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Parasitology research**. Vol 106. Pag 1245-1248. 2010.

HANKS, C. T.; WATAHAZ, J. C.; SUNI, Z. In vitro models of biocompatibility: A review. **Dent Mater**. vol 12. pag. 186 - 193. 1996.

HIRSJÄRVI, S. Preparation and Characterization of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles for Pharmaceutical Use. *Dissertationes bioscientiarum molecularium Universitatis Helsingiensis in Viikki, 2/2008* - Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finland. 2008.

HOARE, C. A; WALLACE, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**. vol 212.p. 1385-1386, 1966.

HORTON, M. A., KHAN, A. Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for nanotechnology. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*. vol 2. p. 42-28. 2006.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Current Step 4 version. 2005.

JAIN, R.; SHAN, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. T. Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches. **Drug development and industrial pharmacy**. Amsterdam. Vol 24. p. 703-727. 1998.

JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol 66. pag 1-10. 2012.

JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of nanoparticle research*. Vol 11. pag 77-89. 2009.

KHARIA, A. A.; SINGHAI, A. K. Formulation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles of an Antiviral Drug for Gastroretention. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**. Vol 24. 2012

KUMAR, A.; SINGH, S.; SINGH, N.; ARORA, S. Nanotechnology: a review; Journal of pharmacy research. Vol 5. pag 3630-3634. 2012

LAMPMAN, P.; VYVYAN, K. Introduction to spectroscopy. 4th edition. 2009

LEE, M. K. et al. Cryoprotectants for Freeze Drying of Drug Nano-Suspensions: Effect of Freezing Rate. **Journal of pharmaceutical sciences**. Vol 98. Pag 4808-4817. 2009.

LILI, Z. Síntese e caracterização do copolímero tribloco anfifílico biodegradável poli (L,L-lactídeo-L-lactídeo-stat-caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli (L,L-lactídeo-stat-caprolactona). Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de engenharia metalúrgica e de materiais da escola politécnica da Universidade de São Paulo. 2007.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**. vol 344. p.33 – 43, 2007.

LEO, E. et al. Polymeric Nanoparticles as Drug controlled Release Systems: A New Formulation Strategy for Drugs with Small or Large Molecular Weight. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. vol 6, 2006.

LI, S. et al. Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels. **Molecular Vision**. vol 17. 2011

LINCE, F.; MARCHISIO, D. L.; BARRESI, A. A. Strategies to control the particle size distribution of polycaprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of colloid and interface science**. Vol 322. p. 505-515. 2008.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. vol 49. p. 57-68, 1995a.

LIU, J. Oleanolic acid and Ursolic acid: Research Prospectives. **Journal of Ethnopharmacology**. vol 100, p. 92-94, 2005b.

LOPES, L. B. Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação e moléculas carreadoras. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), 2005 - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MALVERN. Disponível:
<http://www.malvern.com.br/labpor/products/zetasizer/zetasizer.htm?gclid=ClfMpYyQgLsCFeJF7AodmmsA-A>. Acesso: 20/08/2013.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol 290. p. 137-144. 2005.

MANARIN, R. et al. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology international**. vol 62. p. 79–81. 2013.

MAROTTA_OLIVEIRA, S. S. Preparação e caracterização in vitro de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2009.

MASCHER, E.; LUNDAHL, P. Sodium dodecyl sulphate-protein complexes changes in size or shape below the critical micelle concentration, as monitored by high-performance agarose gel chromatography. **Journal of Chromatography**. vol 476. pag 147-158. 1989.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**. vol146. p. 601–20. 2007.

MELO, R. C., BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of parasitology**. vol 64. p. 457-482. 1978.

MIZUSHINA Y. et al. Inhibition of DNA polymerases and DNA topoisomerase II by triterpenes produced by plant callus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 305:365–373. 2003.

MOLINA, J. et al. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Vol 47. Pag 101-104. 2001.

MORA-HUERTAS, C. E. et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 2009.

MORILLA, M. J. et al. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol 278. Pag 311-318. 2004.

NAAHIDI et al. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled release**. Vol 166. Pag 182-194. 2013.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**. Vol 32. Pag 762-798. 2007.

NAKAYAMA et al. Assessment of the Alamar Blue assay for the cellular growth and viability in vitro. **Journal of immunological methods**. Vol 204. Pag 205-208. 1997.

NANNI C. et al. Retro-orbital injection is an effective route for radiopharmaceutical administration in mice during small-animal PET studies. **Nuclear Medicine Communications**. Vol 28. p. 547-53. 2007.

- NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**. 2013.
- OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. *Revista eletrônica de farmácia*. Vol 3. p. 29-35. 2006.
- OLIVEIRA, L. F. A. et al. Heart rate variability in chronic Chagas patients before and after treatment with benznidazole. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**. vol158. p. 118–22. 2010.
- OSSA, D. H. et al. Poly-ε-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. **Journal of Controlled Release**. vol 161. p. 927-932. 2012.
- PATEL, H. R.; PATEL, R.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of Pharm Tech Research**. Vol 1. Pag 299-303.
- PEREZ-MOLINA, J. A. et al. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. **Acta tropica** 127. p.101-104. 2013.
- PUFF, J. Estudo causa polêmica ao comparar Doença de Chagas à AIDS. BBC Brasil. SP. 31/05/2012. Disponível em:<http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2012/05/120530_doenca_chagas_abre_jp.shtml> Acesso em: 21/02/2013.
- PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**. vol 115. p. 279–83. 2007.
- REIMAO et al. *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. **Experimental parasitology**. Vol 128. p. 111-115. 2011.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. Vol. 27.771-780. 2004.
- RIBEIRO, I. et al. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. **PLOS Neglected Tropical Disease**, vol 3, p. 484, 2009.
- RIUL, T. B. Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Farmácia. 2010.
- ROLON, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Research**. vol 99. p. 103-107. 2006.
- ROMERO, E. L., MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced drug delivery reviews**. vol62. p. 576–88. 2010.

RUPALI, S.; SAYANTAN, M.; LAXMI, G. Nanotechnology: the coming revolution in modern biology and medicine. **International research jornal of pharmacy**.vol.3.n 5. 2012.

SARAIVA, J. Avaliação de rotas metabólicas como mecanismo de ação da atividade tripanocida de lignano-lactonas. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. 2007.

SARAIVA et al. Hinokinin-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles for Chagas disease. *Parasitol research*. vol 106. pag 703-708. 2010.

SIEUWERTS, A. M. et al. Tetrazolium Salt Assay Scrutinized:How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*.vol 33. p. 813-823. 1995.

SILVA, M. R. Padronização de método colorimétrico para a avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo. 2009.

SINHA, V. R. et al. Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview. vol 278. p. 1–23. 2004.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.Review.**Journal of Controlled Release**.vol 70.p. 1–20, 2001.

SOARES, V. C. G.; VARANDA, G. A.; RADDI, M. S. G. In vitro basal and metabolism - mediated cytotoxicity of flavonoids.**Food and chemical toxicology**.vol 44. p. 835-838. 2006.

SOARES, S. et al. Efeito de dois agentes tripanosomicidas, violeta de genciana e WR6026, na preservação de concentrado de plaquetas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 37. p. 248-251. 2004.

STORPIRTIS, S, et al. Biofarmacotécnica. Ciências Farmacêuticas. Guanabara Koogan. p. 72-95. 2009.

TARAFDER, S. et al. Lovastatin release from polycaprolactone coated β -tricalcium phosphate: Effects of pH, concentration and drug-polymer interactions. **Materials science and engineering C**. vol 33. pag 3121-3128. 2013.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagasdisease.**International journal for parasitology**, vol 31. p. 550–4. 2001.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**.vol 37. p. 237–280. 2012.

TOMODA, K., et al. Enhanced transdermal delivery of indomethacin-loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, vol88. p. 706–10. 2011.

URBAN-MORLAN et al. Determination of poloxamer 188 and poloxamer 407 using high-performance thin-layer chromatography in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis**. vol 46. pag 799-803. 2008.

VALENTE, I. et al. Nanoprecipitation in confined impinging jets mixers: Production, characterization and scale-up of pegylated nanospheres and nanocapsules for pharmaceutical use. **Chemical Engineering Science**.vol 77. p.217–227. 2012.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**. vol26. pag 1025–58. 2009.

VILLANOVA, J. C. O., OREFICE, R. L. , CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**.vol 20. p. 51-64. 2010.

WAN, W. K., YANG, L., PADAVAN, D. T. Use of degradable and nondegradable nanomaterials for controlled release. **Nanomedicine**. vol2. p. 483–509. 2007.

WASHINGTON, C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *International journal of pharmaceutics*. vol 56. pag 71-74. 1989.

WISCHKE, C., SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International journal of pharmaceutics**. vol 364. p. 298–327. 2008.

WHO.World Health Organization.Chagas disease (American trypanosomiasis).2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 22/07/2013.

WOODRUFF, M. A., HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**. vol 35. p. 1217–1256. 2010.

XI, J, et al. Formulation Development and Bioavailability Evaluation of a Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **AAPS PharmSciTech**, Vol. 10. 2009.

XIAU, K., et al. A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer.*Biomaterials*.Vol 30. p. 6006-6016. 2009.

ZAMBITO, Y.; PEDRESCHI, G.; COLO, G. D. Is dialyses a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? – A case study. **International journal of pharmaceutics**. Vol 434. Pag 28-34. 2012.

ZHANG, H. et al. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **International journal of pharmaceutics**. vol 441. p. 261–8. 2013.